



HAL
open science

Contribution du modèle Age-Période-Cohorte à l'étude de l'épizootie d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine en France et en Europe

Carole-Aline Sala

► **To cite this version:**

Carole-Aline Sala. Contribution du modèle Age-Période-Cohorte à l'étude de l'épizootie d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine en France et en Europe. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10280 . tel-00830603

HAL Id: tel-00830603

<https://theses.hal.science/tel-00830603>

Submitted on 5 Jun 2013

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

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

THESE

présentée
devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention
du DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le
15 décembre 2009

par

Mlle Carole-Aline SALA

Contribution du modèle Age-Période-Cohorte à l'étude de l'épizootie
d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine en France et en Europe

Directeur de thèse
M. le Dr Didier CALAVAS

JURY

M. le Pr Pascal Roy	Président du Jury
M. le Dr Pierre-Yves Boëlle,	Rapporteur
M. le Dr Rodolphe Thiébaud	Rapporteur
M. le Dr Marc Savey	Membre
M. le Dr Didier Calavas	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu le Docteur Didier Calavas pour avoir encadré ce travail, mais également pour m'avoir offert l'opportunité de passer du terrain à la recherche, dans un domaine que j'affectionnais particulièrement.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Professeur Pascal Roy pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse et m'avoir initié, non sans douleur, aux modèles linéaires généralisés.

Je suis reconnaissante au Docteur Rodolphe Thiébaud et au Docteur Pierre-Yves Boelle d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également Monsieur Marc Savey pour avoir accepté de faire partie du jury et l'intérêt porté à ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Docteur Dominique Costagliola pour m'avoir consacré de son temps et pour la richesse et la pertinence de ces remarques qui m'ont permis d'améliorer ce travail.

Je tiens également à remercier Christian Ducrot pour avoir suivi et contribué à ce travail avec bonne humeur et tact, et m'avoir intégrée dans le projet NeuroPrion « BSE trend » en m'offrant ainsi l'opportunité de travailler au niveau européen.

Un grand merci à Benoit Durand pour le temps consacré à ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance sans limite aux personnes permanentes ou provisoires de l'Unité Epidémiologie qui m'ont chaleureusement accueillie et qui m'ont tout appris, du savant dosage du café au débouillage de l'imprimante couleur recto-verso. Un énorme merci à Christelle pour m'avoir supportée dans son bureau pendant plus d'un an et sa parfaite compatibilité thermique, à Nathalie pour sa bonne humeur permanente, à Géraldine pour sa disponibilité et sa capacité à retrouver en deux clics toutes les fonctions mystérieuses d'office, à Myriam sans qui la gestion bibliographie serait un enfer et l'ostéopathie toujours un projet, à Eric pour son expertise et son appui statistique mais également sa contribution à la protection

de la planète, à Jean-Luc, futur créateur du Bouton-Unique-Qui-Fait-Tout, merci à Jean-Baptiste pour supporter mes remarques désobligeantes sur ses créations culinaires, à Emilie pour ses remarques pertinentes sur le manuscrit, à Marie-Anne sans qui le retour sur les bancs de l'école aurait été encore plus difficile, à Pascal pour ses scoops et enfin à Didier, pour m'avoir fait confiance et être persuadé qu'un jour, j'améliorerai mon anglais et raccourcirai mes phrases.

Un grand merci à Anne-Gaëlle, Jean-Noël et Thierry pour leurs éclaircissements sur les prions et à Corinne pour sa disponibilité, son efficacité et sa bonne humeur.

Merci à Laureline, Yohan et Emilie qui ont essayé les plâtres de mes premiers encadrements.

Un grand merci aux membres du projet « BSE trend » avec lesquels j'ai eu plaisir à échanger, et en particulier à Giuseppe pour son animation toute italienne des réunions de travail.

Merci à tous ceux qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à ce travail

A mes parents,
qui m'ont toujours soutenue même dans mes idées les plus fantasques.

Production scientifique

Articles publiés

Sala, C.,E. Morignat, et al. (2009). "Modelling the trend of bovine spongiform encephalopathy prevalence in France: Use of restricted cubic spline regression in age-period-cohort models to estimate the efficiency of control measures." *Preventive Veterinary Medicine* 90(1-2): 90-101.

Sala, C. and G. Ru (2009). "Time trends in exposure of cattle to bovine spongiform encephalopathy and cohort effect in France and Italy: value of the classical Age-Period-Cohort approach." *BMC Veterinary Research* 5(1): 34.

Articles soumis

C. Ducrot, **C. Sala**, G. Ru, A. De Koeijer, H. Sheridan, C. Saegerman, T. Selhorst, M. Arnold, D. Calavas. Modelling BSE trend over time in Europe, a risk assessment perspective, soumis à *European Journal of Epidemiology* le 6 juillet 2009.

C. Sala, B. Durand, D. Costagliola, C. Ducrot, D. Calavas. Age-period-cohort modeling in an epidemic context: a simulation approach to explain the period effect evidenced for the bovine spongiform encephalopathy in France, soumis à *Statistics in Medicine* le 29 septembre 2009.

Communications orales

C.Sala, E. Morignat, D.Calavas. Application du modèle âge-période-cohorte à l'étude de l'évolution de l'ESB en France. Journées d'animation scientifique du département de santé animale de l'INRA. Tours, 25-27 juin 2007.

C.Sala, E. Morignat, D.Calavas. Contribution du modèle âge-période-cohorte à l'étude de l'ESB en France : évolution de la prévalence au cours de la période 2001-2007. Journées scientifiques de l'Association pour l'Etude de l'Epidémiologie des Maladies Animale. Maisons-Alfort, 23 mai 2008. *Epidémiologie et Santé Animale* **53**: 85-95.

C.Sala, E. Morignat, D.Calavas. Modelling the trend of the BSE: comparative approach of trend analyses and application to French and European data. 3RD NeuroPrion Student Event. Ecole d'été du réseau d'excellence du NeuroPrion. Bratislava, Slovaquie, 9 août 2008.

C. Ducrot, **C. Sala**, G. Ru, A. De Koeijer, H. Sheridan, C. Saegerman, T. Selhorst, M. Arnold, D. Calavas. Comparative analysis of the trend of the BSE epidemic across Europe, in relationship with control measures. *Prion* 2008. Madrid, Espagne, 8 octobre 2008.

C.Sala. Approche comparative des modèles permettant l'étude de l'évolution de la prévalence de l'ESB. Application aux données françaises et européennes. 2^{ème} journée des doctorants de l'Afssa, Maisons-Alfort, 8 décembre 2008.

Ducrot, C., **C. Sala**, et al. (2009). Comparative analysis of the trend of BSE epidemic across Europe, in relationship with control measures. 12th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Durban, Afrique du Sud, 10-14 août 2009.

Posters

Sala, C., E. Morignat, et al. (2006). Seasonality of exposure of cattle to BSE in France. Prion 2006, Strategies, advances and trends towards protection of society, Torino, Neuroprion.

Sommaire

LISTE DES TERMES	11
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	15
INTRODUCTION	17
CHAPITRE 1 - L'ENCEPHALOPATHIE SPONGIFORME BOVINE	23
1.1. Biologie des encéphalopathies spongiformes transmissibles	25
Etiologie, physiopathologie et diagnostic ; notions de souche et de barrière d'espèce	25
1.1.1. Un agent infectieux protéique ?	25
1.1.2. Anatomo-physiopathologie	27
1.1.3. Possibilités diagnostiques des EST	28
1.1.4. Caractérisation des EST	32
1.1.5. Notions de souche et de barrière d'espèce	33
1.2. Epidémiologie de l'ESB	34
1.2.1. Une origine controversée	34
1.2.2. Modalités de transmission de l'ESB en situation naturelle	35
1.2.3. Période d'incubation et âge des animaux à l'infection	37
1.2.4. Facteurs de risque de l'ESB/facteurs influençant la prévalence apparente	38
1.2.5. Les ESB atypiques : vers une origine bovine de l'ESB ?	45
1.3. Réglementation de l'ESB : contexte, évolution et état des lieux	47
1.3.1. Mesures de surveillance de l'ESB : mise en place et évolution au niveau européen et adaptation au niveau français	47
1.3.2. Mesures de contrôle de l'ESB : réglementation européenne et adaptation au niveau français	52
1.4. L'épizootie d'ESB en Europe : évolution et état des lieux en forme de conclusion	59
CHAPITRE 2 – LE MODELE AGE-PERIODE-COHORTE	61
2.1. Le diagramme de Lexis	62
2.1.1. Construction du diagramme de Lexis	62
2.1.2. Exploitation du diagramme de Lexis : présentation des données, calcul des taux et modélisation	64
2.2. Le modèle âge-période-cohorte	68
2.2.1. Les graphiques préalables à l'analyse	68
2.2.2. Formulations du modèle âge-période-cohorte	69
2.2.3. Estimation des effets d'âge, de période et de cohorte	77
2.2.4. Prise en compte des interactions dans le modèle APC	84
2.2.5. Inférence à partir du modèle APC	86
2.2.6. Impact du regroupement des données sur l'estimation du modèle APC	88
2.3. Proposition d'un procédé d'ajustement du modèle	88

CHAPITRE 3- MODELISATION APC DES DONNEES DE SURVEILLANCE DE L'ESB 91

3.1. Matériel et méthode	91
3.1.1. Définitions des variables du modèle APC dans le cas de l'ESB	91
3.1.2. Les données utilisées	93
3.1.3. Méthodes d'analyse APC utilisées	95
3.2. Modélisation de l'épizootie française	97
"Modelling the trend of bovine spongiform encephalopathy prevalence in France: use of restricted cubic spline regression in age-period-cohort models to estimate the efficiency of control measures"	97
3.2.1. Introduction	98
3.2.2. Material and method	100
3.2.3. Results	105
3.2.4. Discussion	106
3.3. Comparaison de l'évolution de l'épizootie en France et en Italie : analyse catégorielle et examen des différences secondes	127
"Time trends in exposure of cattle to bovine spongiform encephalopathy and cohort effect in France and Italy: value of the classical Age-Period-Cohort approach"	127
3.3.1. Background	128
3.3.2. Method	129
3.3.3. Analysis	131
3.3.4. Results	132
3.3.5. Discussion	133
Appendix	137
3.4. Modélisation des données européennes : analyse APC catégorielle couplée au calcul du nombre reproductif de base (R_0)	151
"Modelling BSE trend over time in Europe, a risk assessment perspective"	151
3.4.1. Introduction	152
3.4.2. Material and method	154
3.4.3. Results	156
3.4.4. Discussion	157

CHAPITRE 4 - EVALUATION DU MODELE APC DANS LE CADRE DE SON APPLICATION A L'EPIZOOTIE D'ESB EN FRANCE : UNE APPROCHE PAR SIMULATION 169

4.1. Matériel et méthode	170
4.1.1. Paramètres de la simulation	171
4.1.2. Processus de la simulation	177
4.1.3. Analyse APC	178
4.1.4. Exploitation des résultats	179
4.2. Evaluation du modèle APC en situation épidémique	181
"Age-Period-Cohort modelling in an epidemic context: a simulation approach to explain the period effect evidenced for the bovine spongiform encephalopathy epidemic in France"	181
4.2.1. Introduction	182
4.2.2. BSE context	183
4.2.3. Material and method	183
4.2.4. Results	187
4.2.5. Discussion	189
Appendix	203
4.3. Impact d'une augmentation de la durée moyenne d'incubation de l'ESB sur les résultats du modèle APC	205

4.3.1. Proportion d'animaux infectés détectés	205
4.3.2. Détection de l'effet période	208
4.3.3. Performance du modèle APC dans l'estimation de l'effet cohorte lors d'un allongement de la durée moyenne de la période d'incubation de l'ESB	210
CHAPITRE 5 – DISCUSSION GENERALE	215
5.1. Modélisation de l'épizootie d'ESB en France et en Europe	215
5.1.1. Matériel et méthode	215
5.1.2. Résultats	220
5.2. Evaluation du modèle APC dans le cadre de son application à l'ESB : une approche par simulation	226
5.2.1. Matériel et méthode	226
5.2.2. Résultats	229
CONCLUSION	233
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	235
ANNEXES	245
Annexe I - Script de la simulation sous R	247
Annexe II - Proportion d'analyses dans lesquelles un effet période (modèles AP ou APC) a été détecté avec et sans variation de la durée d'incubation de l'ESB. Résultats détaillés	253
Annexe III - Texte de la présentation orale de l'AEEMA	259

Liste des termes

AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AIC	Akaike Information Criterion, critère d'Akaiké
APDI	arrêté portant déclaration d'infection
APMS	arrêté portant mise sous surveillance
ATNC	agent transmissible non conventionnel
BASE	bovine amyloidic spongiform encephalopathy
CEA	Commissariat à l'Energie Atomique
CNEVA	Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires
EFSA	European Food Safety Agency
ESB	encéphalopathie spongiforme bovine
EST	encéphalopathie spongiforme transmissible
FVO	farines de viande et d'os
GALT	gut associated lymphoid tissue
IC	intervalle de confiance
IHC	immunohistochimie
MCJ	maladie de Creutzfeldt-Jakob
APC (modèle)	modèle âge-période-cohorte
MRS	matériaux à risque spécifié
NBA (réseau)	réseau neuropathologie des bovins adultes
NAIF (cas)	cas ESB né après l'interdiction de l'utilisation des farines de viande et d'os
OIE	Office International des Epizooties ; nouvellement : organisation mondiale de la santé animale
OR	odds ratio
PMCA	protein misfolding cyclic amplification
PNS ESB	programme national de surveillance de l'ESB
PPS ESB	programme pilote de surveillance de l'ESB
PrPc	protéine prion cellulaire
PrPsc	protéine prion pathologique
R0	nombre reproductif de base
RR	risque relatif
RU	Royaume-Uni
SNA	système nerveux autonome
SNC	système nerveux central
vMCJ	variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
WB	western immunoblotting

Liste des figures

Figure 1.1 - Modèle de conformation tridimensionnelle proposé pour la PrP ^c et la PrP ^{sc}	26
Figure 1.2 - Modifications observées dans le SNC en première transmission de l'ESB chez la souris bovinisée (TgbovXV).	27
Figure 1.3 - Profils électrophorétiques de la PrP ^{sc} après digestion par la protéinase K et marquage par un anticorps anti-PrP : RB1 (A) ou P4 (B) (technique du western immunoblotting).....	30
Figure 1.4 - Nombre de cas ESB détectés au Royaume-Uni et en Europe entre 1987 et 2009.....	37
Figure 1.5 - Nombre de cas ESB détectés dans chaque cohorte de naissance, en France, entre janvier 1991 et septembre 2009.	40
Figure 1.6 - Distribution de l'âge des animaux au diagnostic en France entre janvier 1991 et septembre 2009.	42
Figure 1.7 - Evolution du ratio d'incidence standardisé du risque ESB sur quatre périodes de naissance.	43
Figure 1.8 - Evolution du nombre de cas d'ESB détectés entre 1987 et 2008 en Europe géographique, hors Royaume-Uni.....	43
Figure 1.9 - Profils électrophorétiques (A) et ratios de glycoformes (B) des différentes formes d'ESB.....	46
Figure 1.10 - Nombre de suspicions portées et de cas d'ESB détectés annuellement entre 1991 et 2007 dans le cadre du réseau de surveillance clinique de l'ESB.....	50
Figure 1.11 - Répartition en fonction du programme de surveillance, du nombre de cas ESB détectés en France entre janvier 1991 et septembre 2009.	51
Figure 1.12 - Nombre cas d'ESB détectés en Europe (18 pays) hors Royaume-Uni entre 1987 et septembre 2009.....	59
Figure 1.13 - Evolution du nombre de cas d'ESB détectés dans les pays ayant déclaré plus de 50 cas d'ESB depuis 1989.	60
Figure 2.14 - Diagramme de Lexis âge-période.	63
Figure 2.15 - Représentation des individus dans le diagramme de Lexis.....	63
Figure 2.16 - Représentations âge-cohorte et cohorte-période du diagramme de Lexis.....	64
Figure 2.17 - Les différentes combinaisons des variables dans le diagramme de Lexis.....	65
Figure 2.18 - Effectifs dans les différentes cellules du diagramme de Lexis.	66
Figure 2.19 - Moyenne lors d'une répartition des données en triangles.....	67
Figure 2.20 - Taux spécifiques bruts d'ESB par âge, cohorte et période observés en France pour la période d'observation 2001-2006.	69
Figure 2.21 - Diagramme âge-cohorte : répartition du nombre d'animaux testés pour l'ESB en France entre juillet 2001 et décembre 2007 (représentation partielle).	87
Figure 2.22 - Processus d'ajustement proposé par Clayton et Schiffler.....	89
Figure 3.23 - Comparison of the BSE prevalence between the crude and calculated observation period using the linear relationship period = age + cohort.....	120
Figure 3.24 - Smoothed effects of the age at testing (a), birth cohort(b) and observation period (c) using restricted cubic regression splines in age-cohort-period models.	121
Figure 3.25 - Effects of the age at testing (a), birth cohort (b) and observation period (c) using age-cohort period model with parameterised step functions to model the effects of the covariates (categorical analysis).	122

<i>Figure 3.26 - Overlapping intervals of the calculated period.....</i>	<i>146</i>
<i>Figure 3.27 - Results of the AC modelling of the French data and second differences.....</i>	<i>146</i>
<i>Figure 3.28 - Results of the APC and AC modelling of the Italian data and second differences.</i>	<i>147</i>
<i>Figure 3.29 - The classical plots for observation data of the Lexis diagram in the case of BSE in France.....</i>	<i>148</i>
<i>Figure 3.30 - Plot (log scale) of the reproduction ratio (R_0) and Odds ratio (compared to a reference cohort defined per country ($OR=1$)), per birth cohort per country.....</i>	<i>166</i>
<i>Figure 3.31 - Schematic time schedule of the main control measures and trend of the BSE epidemic per country.</i>	<i>167</i>
<i>Figure 4.32 - Probabilité de survie de la population française bovine.</i>	<i>171</i>
<i>Figure 4.33 - Probabilité cumulée de l'âge à l'infection.....</i>	<i>173</i>
<i>Figure 4.34 - Densité de probabilité de la période d'incubation de l'ESB.</i>	<i>173</i>
<i>Figure 4.35 - Profils d'infection : nombre d'animaux infectés annuellement.</i>	<i>175</i>
<i>Figure 4.36 - Number of infected animals for each infection profile a) per year of infection, b) per birth cohort (mean for 100 simulations) at the end of the 16-year infection period.....</i>	<i>196</i>
<i>Figure 4.37 - Percentage (mean for 100 iterations) of infected animals detected for each infection profile and surveillance period; a) left-reduction of the 1985-2014 surveillance period, b) right-extension of the 1985-1991 surveillance period.....</i>	<i>196</i>
<i>Figure 4.38 - Prevalence in 6-year old animals per infection profile and year of surveillance.....</i>	<i>196</i>
<i>Figure 4.39 - Mean of standardised bias by birth cohort (a and b) and surveillance period (c and d).</i>	<i>197</i>
<i>Figure 4.40 - French cattle survival distribution.....</i>	<i>203</i>
<i>Figure 4.41 - BSE parameters (estimated from Supervie et al).....</i>	<i>203</i>
<i>Figure 4.42 - Pourcentage d'animaux infectés détectés en fonction du profil d'infection, de la période d'observation et la durée d'incubation (stable ou croissante).....</i>	<i>207</i>
<i>Figure 5.43 - Résultats du modèle AC pour le Royaume-Uni : effet cohorte (OR et IC à 95%) ajusté sur l'âge des animaux au diagnostic.....</i>	<i>222</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau 1.1 - Nombre de cas ESB autochtones détectés depuis 1987 en Europe (Europe géographique).....</i>	<i>24</i>
<i>Tableau 1.2 - Evolution de la liste des matériaux à risque spécifié dans l'Union Européenne.....</i>	<i>54</i>
<i>Tableau 2.3 - Calcul du nombre de personnes-années à risque dans les cellules du diagramme de Lexis.</i>	<i>67</i>
<i>Table 3.4 - Age-cohort Lexis diagram: prevalence and number of cases per age and birth cohort in France from July 2001 to December 2007.....</i>	<i>124</i>
<i>Table 3.5 - Details on the six best models using spline regression: knot location for the cohort, AIC, AIC weight, evidence ratio, residual deviance, degrees of freedom and p-value.....</i>	<i>125</i>
<i>Table 3.6 - Categorical analysis: stepwise adjustment of the APC models using parameterised step functions.....</i>	<i>125</i>
<i>Table 3.7 - Date and content of main control measures enforced in France, Italy and Europe to control BSE.....</i>	<i>149</i>
<i>Table 3.8 - Data available and data included in the analysis.</i>	<i>149</i>
<i>Table 3.9 - List of the APC models fitted and selection of the best models.....</i>	<i>150</i>
<i>Table 3.10 - Data per country included for APC analysis and R_0 estimation.....</i>	<i>164</i>
<i>Table 3.11 - Best APC model per country, effect of adding each variable to the model and goodness of fit.</i>	<i>165</i>
<i>Tableau 4.12 - Nombre total d'animaux infectés par profil d'infection.....</i>	<i>175</i>
<i>Tableau 4.13 - Moyenne de la période d'incubation en fonction de la valeur du paramètre γ_2 de la fonction (4.3).....</i>	<i>176</i>
<i>Tableau 4.14 - Number of age, age-drift, age-cohort, age-period and age-period-cohort models selected from the 100 datasets analysed for each observation period and infection profile;.....</i>	<i>198</i>
<i>Table 4.15 - Distribution of the standardised bias calculated between the cohort prevalence estimated by the APC or AC models and the simulated prevalence for 6-year old animals and in infected birth cohorts.....</i>	<i>202</i>
<i>Tableau 4.16 - Pourcentage moyen (sur 100 itérations) d'animaux infectés détectés au cours de la période d'observation 1985-2014, par cohorte de naissance, tous profils d'infection confondus.....</i>	<i>206</i>
<i>Tableau 4.17 - Proportion (%) de modèles AP et APC sélectionnés, avec et sans variation de la durée moyenne d'incubation.....</i>	<i>209</i>
<i>Tableau 4.18 - Proportion d'analyses dans lesquelles un effet période (modèles AP ou APC) a été détecté avec et sans variation de la durée d'incubation de l'ESB. Extension à gauche et à droite de la période 2001-2007, profils 4 et 5. ...</i>	<i>210</i>
<i>Tableau 4.19 - Distribution des biais standardisés entre la prévalence estimée par les modèles AC ou APC et la prévalence simulée, pour la cohorte de naissance.</i>	<i>212</i>
<i>Tableau 4.20 - Distribution des biais standardisés entre prévalence par cohorte issue des modèles AC et prévalence par cohorte issue de la simulation, avec et sans variation de la durée moyenne d'incubation de l'ESB.....</i>	<i>213</i>

Introduction

L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) a été décrite pour la première fois en Grande-Bretagne en 1987 [Wells *et al.* 1987]. Les lésions anatomopathologiques observées sur les premiers cas ont alors permis d'apparenter cette maladie aux encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST). Les premières descriptions d'EST sont relativement anciennes (fin du 18^{ème} siècle pour la tremblante et années 1920 pour la maladie de Creutzfeldt-Jakob, [Prusiner 1993]), mais la nature exacte de l'agent pathogène responsable de ces maladies est restée longtemps inconnue, aucun virus ou bactérie n'ayant pu être isolé. En 1982, Prusiner, reprenant une idée émise quelques 15 ans auparavant [Alper *et al.* 1966; Alper *et al.* 1967; Latarjet and Muel 1970], proposa que l'agent infectieux responsable des EST était une protéine qu'il dénomma prion, anagramme de « proteinaceous infectious particle » [Prusiner 1982]. La « théorie du prion » est depuis communément admise, même si sujette à discussion quant à savoir si la protéine prion est l'unique agent pathogène, un des agents pathogènes ou simplement un marqueur de la maladie [Weissmann 1991].

Selon cette théorie, les EST sont définies comme des maladies neuro-dégénératives, évolutives et fatales du système nerveux central des mammifères, caractérisées par l'accumulation dans les cellules, d'une forme anormale d'une protéine cellulaire naturellement présente chez l'hôte. Les EST ne sont pas les seules maladies à prion connues, mais elles se différencient de la maladie d'Alzheimer et de la maladie de Parkinson par leur caractère transmissible. Actuellement quatre maladies humaines (maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) et son variant (vMCJ), syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, insomnie familiale fatale et Kuru) et cinq maladies animales (tremblante, ESB, maladie du dépérissement chronique des cervidés, encéphalopathie du vison et encéphalopathie du chat) sont classées au sein du groupe des maladies à prion transmissibles. Une particularité de ces maladies est d'avoir, pour une même entité définie, des étiologies variées, tant génétique, que « sporadique » ou acquise [Prusiner 1993; DeArmond and Bouzamondo 2002; Collins *et al.* 2004]. Les formes génétiques sont associées à des mutations du gène PRNP codant pour la protéine prion et concernent l'insomnie familiale fatale, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker et la forme familiale de la MCJ [Prusiner 1993; Deslys *et al.* 1998; Collins *et al.* 2001]. Quant aux formes acquises d'EST, elles peuvent être d'origine iatrogène, comme la forme iatrogène de la MCJ (contamination via l'injection d'hormone de croissance entre autre), ou liées à une exposition alimentaire (Kuru, vMCJ, ESB, tremblante...) [Prusiner 1993]. Les formes « sporadiques », telle la forme sporadique de la MCJ et plus récemment les formes atypiques d'ESB et de tremblante,

correspondent aux EST dont l'étiologie n'est en fait pas établie. Pour certaines EST sporadiques ou acquises, animales et humaines, une prédisposition génétique module l'expression de la maladie (tremblante classique et atypique, vMCJ) [Collinge *et al.* 1991; Partanen 2003]. Ainsi pour le vMCJ, lié à l'exposition à l'agent de l'ESB, la totalité des 212 cas¹ cliniques, diagnostiqués jusqu'à présent, sont tous homozygotes méthionine au codon 129 du gène codant pour la protéine prion [Partanen 2003]. Cependant une inconnue demeure quant à savoir si ces personnes sont les seules sensibles à la maladie ou ont simplement une sensibilité accrue, qui s'exprimerait par une plus forte prévalence de la maladie, associée à une plus courte période d'incubation par rapport à des individus hétérozygotes méthionine-valine ou homozygotes valine [Ducrot *et al.* 2009]. La susceptibilité génétique des individus reste une question importante dans l'estimation du nombre de cas attendus de vMCJ lié à l'épizootie d'ESB et dans l'évaluation du risque sanitaire représenté par les EST animales et humaines.

Dès l'identification des premiers cas d'ESB, la possibilité de la transmission de cette maladie à l'homme avait été évoquée, du fait de la similitude des lésions histologiques et anatomopathologiques et du classement de l'ESB dans un groupe de maladies comportant des maladies humaines. Suite à une surveillance accrue de la MCJ, un variant de cette maladie fut identifié chez quelques sujets relativement jeunes. La signature moléculaire particulière de ce variant, différente de celles des formes de MCJ décrites jusqu'alors [Collinge and Rossor 1996; Collinge *et al.* 1996], la brutalité d'apparition des cas et leur répartition dans des pays infectés par l'ESB, suggérèrent l'apparition d'un nouveau facteur de risque et un lien possible entre ESB et vMCJ. La preuve de ce lien fut apportée par Bruce en 1997, qui conclut, après transmission de l'ESB et du vMCJ à la souris, que le même agent était à l'origine des deux maladies [Bruce *et al.* 1997]. L'évaluation du risque pour l'homme, la détermination du nombre de personnes exposées à l'ESB et/ou susceptibles de développer le vMCJ et par conséquent l'estimation de la taille de l'épizootie d'ESB, devinrent alors des questions prioritaires de santé publique.

Les premières estimations de l'ampleur de l'épizootie d'ESB ont été obtenues par la méthode du rétrocalcul, permettant de relier l'incidence de la maladie (cas observés), l'incidence de l'infection (nombre réel d'animaux infectés) et la période d'incubation de la maladie. A partir des cas ESB issus de la surveillance clinique -unique système de surveillance de l'ESB jusqu'en 2000- et d'hypothèses sur la distribution de la période d'incubation et du niveau de déclaration des cas, le nombre réel d'animaux infectés a été évalué une première fois en

¹ <http://www.cjd.ed.ac.uk/vcjdworld.htm>, consulté le 24 septembre 2009

France et au Royaume-Uni [Anderson *et al.* 1996; Ferguson *et al.* 1997; Donnelly 2000]. Cependant, la méthode du rétrocalcul suppose qu'un certain nombre de paramètres est connu, tels la période d'incubation de la maladie, la survie des bovins et le niveau d'efficacité de la surveillance clinique. Lors de ces premières estimations, en France, peu de cas ESB avait été détectés par la surveillance clinique, et la dynamique de la population bovine française ainsi que le niveau de sous-déclaration des cas cliniques n'étaient pas connus avec précision. Les estimations ultérieures de Supervie *et al.* [Supervie and Costagliola 2004; Supervie and Costagliola 2006] ont ainsi montré que les estimations de Donnelly [Donnelly 2000] avaient été trop optimistes et l'épizootie sous évaluée, probablement en raison d'une surestimation du taux de déclaration des cas et de l'utilisation d'une courbe de survie non adaptée à la population bovine française, ces paramètres influençant de manière importante l'estimation du nombre d'infections. En effet, plus la sous déclaration des cas et la censure par cause de mort compétitive (abattage et maladies) sont importantes, plus le nombre d'animaux infectés atteignant la phase clinique de la maladie et donc, détectables, est faible.

En 1999, le développement de tests de dépistage rapides, utilisables à grande échelle, permit d'améliorer considérablement la surveillance de l'ESB. Dès 2000, des programmes pilotes furent mis en place en France afin d'évaluer la prévalence de l'ESB dans des populations bovines à risque (animaux accidentés ou morts en ferme). Ces études révélèrent la faible efficacité de la surveillance clinique dans la détection des cas ESB. La surveillance active de l'ESB fut alors généralisée à tous les pays de l'Union Européenne. A partir de janvier 2001, le dépistage systématique des bovins de plus de 30 mois fut imposé à l'abattoir, avant d'être étendu à l'équarrissage six mois plus tard. Cette surveillance exhaustive accrut la qualité et la quantité des données disponibles. Ces données permirent ainsi d'améliorer et de réévaluer les estimations des modèles de rétrocalcul [Donnelly *et al.* 2002; Supervie and Costagliola 2007] et d'utiliser des méthodes plus simples, ne requérant pas les hypothèses nécessaires au rétrocalcul pour évaluer l'évolution, au cours du temps, de l'exposition des bovins à l'ESB [Cohen-Sabas *et al.* 2004; La Bonnardière *et al.* 2004; Morignat *et al.* 2004; Saegerman *et al.* 2006]. En effet, dès le début de l'épizootie au Royaume-Uni, des mesures de contrôle avaient été mises en place en France et dans un certain nombre de pays européens, afin de diminuer l'exposition des bovins à l'agent responsable de l'ESB. Les études épidémiologiques ayant démontré le rôle des farines de viande et d'os (FVO) dans la contamination des animaux [Wilesmith *et al.* 1988], puis, plus tard, le rôle des contaminations croisées entre aliments destinés aux ruminants et aliments pour animaux monogastriques [Hoinville 1994; Hill 2005; Sheridan *et al.* 2005; Jarrige *et al.* 2007], différentes mesures d'interdiction d'utilisation des

FVO en alimentation animale et de sécurisation de ces farines furent mises en place entre 1990 et 2000 en Europe. En supposant que la contamination des bovins par l'ESB est essentiellement, sinon exclusivement, alimentaire, l'application de ces mesures devait avoir réduit l'exposition des bovins à l'ESB et par conséquent être à l'origine d'une décroissance de l'incidence de la maladie.

En 2006, six ans après la mise en place du dépistage exhaustif de l'ESB et de l'interdiction totale de l'utilisation des FVO dans l'alimentation des animaux destinés à la consommation humaine, le nombre de cas d'ESB était en forte diminution, indiquant le déclin de l'épizootie dans la plupart des pays affectés par la maladie et ayant appliqué les mesures de contrôle prévues par la réglementation européenne. Face à une épizootie manifestement maîtrisée, au coût de la surveillance et du manque à gagner en terme de valorisation des déchets de la filière viande, de nombreuses pressions ont été exercées par les parties prenantes afin que les mesures de surveillance et de contrôle soient allégées. La Commission Européenne, suite à la difficulté rencontrée à maîtriser l'exposition des bovins à l'ESB, a alors défini les conditions à remplir *a minima* pour envisager un allègement de certaines mesures². Parmi les conditions à l'allègement de la surveillance figurait la démonstration de la maîtrise de l'épizootie notamment par la mise en évidence d'une décroissance significative du risque ESB au cours du temps, en relation avec l'application des mesures de contrôle.

Le travail de thèse a été mis en place dans un contexte où il était nécessaire de (ré)évaluer la tendance de l'épizootie d'ESB à la lumière des données de surveillance les plus récentes, en relation avec les mesures de contrôle. Cette (ré)évaluation, indispensable à la candidature des pays européens à l'allègement des mesures de surveillance, n'avait été réalisée ni en France, les évaluations les plus récentes de l'épizootie française n'ayant utilisé les données de surveillance que jusqu'en 2004, ni dans la plupart des pays candidats à l'allègement des mesures. Ce travail de thèse a ainsi pris place au sein du projet « BSE trend » du réseau d'excellence NeuroPrion, dont l'objectif était l'évaluation comparative de l'évolution de l'ESB dans les différents pays européens.

L'objectif premier du travail de thèse a été de développer une méthode simple, ne mobilisant d'hypothèse ni sur les caractéristiques de l'ESB, ni sur celle de la population bovine, et adaptable aux données de surveillance de l'ESB de différents pays. Cette méthode devait permettre d'estimer l'évolution au cours du temps de l'épizootie d'ESB et de mettre en relation cette évolution avec les principales mesures de contrôle adoptées à l'encontre de

² TSE road map 2005, http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/roadmap_en.pdf, consulté le 23 septembre 2009

l'ESB. Pour répondre à ces objectifs, en raison des caractéristiques particulières de l'ESB, nous avons choisi d'adapter le modèle âge-période-cohorte (APC) à l'étude de l'ESB.

Le second objectif du travail a été de déterminer l'origine et l'impact de l'effet période détecté lors de la modélisation des données françaises et d'évaluer de manière plus générale le comportement du modèle APC dans le cadre de son application à l'ESB, maladie de type épidémique, alors que le modèle APC était utilisé essentiellement pour modéliser la tendance de maladies chroniques.

Après un premier chapitre passant en revue la biologie des EST et les spécificités épidémiologiques et réglementaires de l'ESB, le deuxième chapitre présente les particularités du modèle APC ainsi que les solutions proposées à son problème de non-identification. Le troisième chapitre est consacré à la modélisation APC de l'épizootie d'ESB en France et en Europe et présente les résultats de ces modélisations sous la forme de trois articles. Un quatrième chapitre présente la méthode de simulation que nous avons développée afin d'évaluer les performances du modèle APC dans le cadre de son application à l'étude de l'ESB en France. Une partie des résultats est présentée sous forme d'article. Enfin, une discussion générale permet de faire le point sur les méthodes employées et les résultats obtenus avant de conclure sur l'intérêt et l'apport de ce travail.

Chapitre 1 - L'encéphalopathie spongiforme bovine

En 1986 une nouvelle maladie neurologique était décrite en Grande Bretagne sur une dizaine de bovins adultes présentant des signes nerveux évolutifs [Wells *et al.* 1987]. D'un point de vue anatomopathologique, cette maladie était caractérisée par une dégénérescence vacuolaire des cellules du système nerveux central semblable à celle observée dans la tremblante du mouton et certaines encéphalopathies humaines transmissibles. Wells *et al.* proposèrent de dénommer cette maladie « encéphalopathie spongiforme bovine » [Wells *et al.* 1987] et de l'apparenter aux EST déjà connues (tremblante, MCJ et Kuru) et identifiées comme étant dûes à des agents transmissibles non conventionnels (ATNC) se distinguant des virus et des bactéries [Alper *et al.* 1966].

Au Royaume-Uni, le caractère rapidement épizootique de la maladie, de moins de 10 cas par mois en 1986 à 60 cas mensuels fin 1988, fit ressentir l'urgence d'investigations épidémiologiques. Publiés en décembre 1988, les résultats des premières études établirent que l'ESB était liée à la consommation de FVO contaminées, utilisées comme complément protéique dans l'alimentation des bovins depuis les années 40 [Wilesmith *et al.* 1988]. L'hypothèse d'une origine ovine de l'ESB, par adaptation de l'agent de la tremblante au bovin, fut émise, aucune EST bovine n'ayant été identifiée jusqu'alors. De ce fait, dès le début de l'épizootie d'ESB, la question du passage de la barrière d'espèce et celle du risque pour l'homme se posa. La surveillance de la MCJ fut alors renforcée dans l'hypothèse que, si l'ESB était transmissible à l'homme, un des premiers indicateurs serait un changement de l'incidence de cette maladie. En 1995, une nouvelle forme de la MCJ fut diagnostiquée sur des sujets inhabituellement jeunes et présentant des symptômes différents de ceux observés classiquement pour cette maladie [Will *et al.* 1996]. En 1996, l'évocation que ce variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob puisse être dû à une exposition à l'agent pathogène responsable de l'ESB déclencha une crise sanitaire mondiale sans précédent, connue sous le nom de « première crise de la vache folle ». L'année suivante, le lien entre ESB et vMCJ était établi [Bruce *et al.* 1997], modifiant la perception que l'on avait du risque ESB pour l'homme. L'ESB devint alors un problème de santé publique majeur, au regard de la gravité de la maladie et de l'étendue de l'épizootie. En effet, en 1996, quatre autres pays étaient déjà concernés par l'ESB : l'Irlande ayant déclaré son premier cas autochtone en février 1989, suivie par la Suisse (1990), la France (1991) et le Portugal (1992) (tableau 1.1).

Tableau 1.1 - Nombre de cas ESB autochtones détectés depuis 1987 en Europe (Europe géographique).

(source OIE, http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm, consulté le 14 septembre 2009)

Pays	Année de détection																				Total par pays			
	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006		2007	2008	2009
Allemagne														7	125	106	54	65	32	16	4	2		411
Autriche															1	0	0	0	2	2	1	0		6
Belgique											1	6	3	9	46	38	15	11	2	2	0	0		133
Danemark																	2	1	1	0	0	0		4
Espagne														2	82	127	167	137	98	68	36	25		742
Finlande															1	0	0	0	0	0	0	0		1
France					5	0	1	4	3	12	6	18	30	164	276	240	142	54	32	7	9	7	7	1017
Grèce															1	0	0	0	0	0	0	0		1
Irlande			10	13	15	16	16	18	15	73	80	83	91	149	246	333	183	126	69	41	25	23	5	1630
Italie															48	38	29	7	8	7	2	1		140
Luxembourg											1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		2
Pays-Bas											2	2	2	2	20	24	19	6	3	2	2	1		85
Pologne																4	5	11	19	10	9	5	4	67
Portugal								12	15	31	30	127	159	148	110	86	133	91	46	33	14	18		1053
République Tchèque															2	2	4	7	8	3	2	0		28
Royaume Uni	446	2514	7228	14407	25359	37280	35090	24438	14652	8149	4393	3235	2301	1443	1202	1144	611	343	225	114	67	25	6	184672
Slovaquie															5	6	2	7	3	0	1	0		24
Slovénie															1	1	1	2	1	1	1	0		8
Suède																				1	0	0		1
Suisse				2	8	15	29	64	68	45	38	14	50	33	42	24	21	3	3	5	0	0		464
Total hors RU	0	0	10	15	28	31	46	98	101	161	158	250	335	511	1004	1029	772	528	327	199	106	83	9	5801

La nécessité de se munir d'une législation commune et d'améliorer la surveillance de l'ESB devint urgente. La mise au point de tests de dépistage utilisables à grande échelle, l'adoption d'une réglementation européenne concernant la surveillance des EST animales et le développement de nombreux programmes de recherche permirent d'accroître considérablement l'effort de surveillance et les connaissances sur ces maladies rares et jusqu'à présent, incurables.

Dans ce chapitre, une première partie permettra d'aborder l'étiologie et la physiopathologie des EST afin de mieux comprendre les possibilités diagnostiques de ces maladies ainsi que la notion de souche et de barrière d'espèce. Une deuxième partie, consacrée à une revue de l'épidémiologie de l'ESB « classique » et des différences observées dans les formes atypiques de la maladie, nous permettra de faire le point sur les connaissances du moment et d'aborder les questions récentes soulevées par la mise en évidence des formes atypiques d'ESB. Enfin, l'ensemble de ces connaissances permettra de mieux comprendre les mesures de surveillance et de contrôle françaises et européennes adoptées à l'encontre de l'ESB. Ces mesures, à l'origine de la décroissance de l'épizootie en Europe, seront présentées en troisième partie.

1.1. Biologie des encéphalopathies spongiformes transmissibles

Etiologie, physiopathologie et diagnostic ; notions de souche et de barrière d'espèce

1.1.1. Un agent infectieux protéique ?

La nature exacte de l'agent pathogène des EST a été, et est toujours, l'objet de controverses et si les théories ayant cours actuellement diffèrent (virus lié à une protéine, protéine seule ou protéine associée à un acide nucléique), toutes s'accordent sur le fait que cet agent est pour tout ou partie de nature protéique [Weissmann 1991; Prusiner 1999; Manuelidis 2004; Bastian and Fermin 2005]. L'idée d'un agent infectieux protéique remonte aux années 1966-1967. La très grande résistance de cet agent aux procédés d'inactivation des virus et des bactéries permit de supposer qu'il pouvait être dépourvu d'acide nucléique et être une simple protéine [Alper *et al.* 1966; Alper *et al.* 1967; Latarjet and Muel 1970]. Griffith proposa même un modèle d'auto-réplication de cet agent compatible avec le caractère transmissible ou spontanée des EST [Griffith 1967]. Cependant, à l'époque, faute de preuves expérimentales, le

concept fut abandonné. Il fallut attendre les travaux de Prusiner, démontrant le lien entre la purification de la PrP^{sc} et l'infectiosité des tissus, pour que la preuve de l'implication d'une protéine membranaire soit apportée et la « théorie du prion » progressivement acceptée [Bolton *et al.* 1982; Prusiner 1982; Prusiner *et al.* 1982; Prusiner *et al.* 1984].

Les EST sont ainsi caractérisées par l'accumulation dans les cellules du système nerveux central (SNC) d'un isoforme anormal, également appelé prion, d'une protéine cellulaire (PrP^c) codée par le gène PRNP de l'hôte [Oesch *et al.* 1985]. La fonction exacte de la protéine cellulaire reste mal connue. Cette protéine jouerait un rôle dans le stress oxydatif des cellules et le transport des ions métalliques [Cazaubon *et al.* 2007; Bousset and Melki 2009]. Cependant, cette protéine semble dispensable, son absence n'affectant pas la survie des animaux privés du gène PRNP [Büeler *et al.* 1992; Weissmann and Flechsig 2003].

La forme anormale de la protéine, notée PrP^{sc} (Protease résistant Protéin scrapie-like), possède la même structure primaire que la forme cellulaire normale, mais s'en distingue par sa conformation tridimensionnelle (figure 1.1) qui lui confère une meilleure thermo-stabilité, des capacités d'agrégation, une insolubilité et une résistance partielle aux protéases [Bousset and Melki 2009].

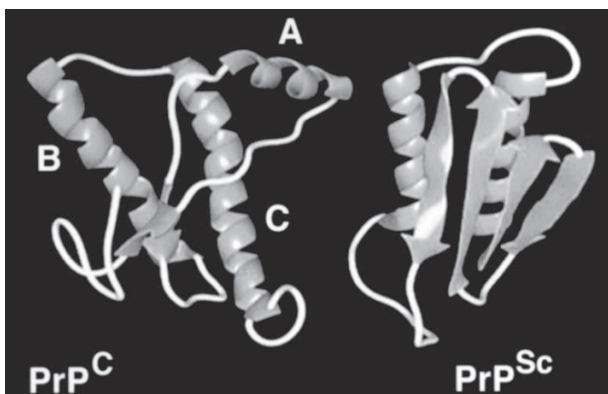


Figure 1.1 - Modèle de conformation tridimensionnelle proposé pour la PrP^c et la PrP^{sc}.

La PrP^c présente une structure majoritairement en hélice alpha (structure spiralée); la PrP^{sc} s'en distingue par une structure plus riche en feuillet bêta (structure plissée)

[DeArmond and Bouzamondo 2002]

La PrP^{sc} dériverait de la PrP^c par une modification transconformationnelle dont le mécanisme demeure inconnu. La propagation de la PrP^{sc} dans les cellules serait assurée par une interaction PrP^{sc}/PrP^c. Les modèles expérimentaux suggèrent que la PrP^{sc}, inoculée ou d'apparition spontanée, jouerait le rôle de promoteur pour les conversions ultérieures de la protéine normale en protéine anormale selon un processus auto catalytique [Collinge and Clarke 2007]. L'apparition spontanée de la PrP^{sc} serait un événement rare qui pourrait expliquer les formes sporadiques d'EST et être favorisée par certaines mutations du gène PRNP [Deleault *et al.* 2007].

Cependant, malgré l'acceptation de plus en plus large de la théorie du prion, de nombreuses incertitudes demeurent quant à savoir si la protéine prion est simplement le marqueur de la maladie ou l'agent pathogène lui-même, et au quel cas s'il agit seul ou en synergie avec d'autres facteurs (virus, protéine, acide nucléique...) [Weissmann 1991; Adler *et al.* 2003].

1.1.2. Anatomopathologie

D'un point de vue anatomopathologique, les EST sont caractérisées par des lésions histologiques localisées principalement dans le SNC incluant une spongiose (vacuolisation spongiforme des neurones), une astrogliose (prolifération des cellules gliales et astrocytaires) et parfois la présence de plaques amyloïdes (agrégation de PrP^{sc}) (figure 1.2). Ces lésions font suite à l'accumulation de PrP^{sc} dans les cellules mais les mécanismes de dégénérescence cellulaire et le rôle exact de la PrP^{sc} dans cette dégénérescence sont mal connus. Il est cependant possible que la PrP^{sc} ait un rôle cytotoxique direct [Collinge and Clarke 2007].

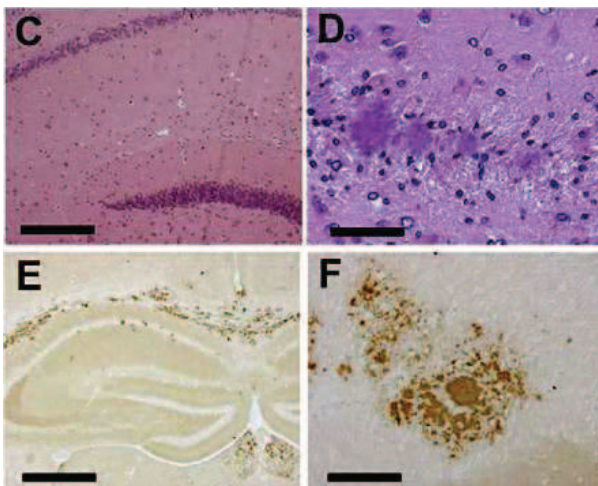


Figure 1.2 - Modifications observées dans le SNC en première transmission de l'ESB chez la souris bovinisée (TgbovXV).

Vacuolisation (C et D) et dépôt de plaque amyloïdes révélées par immunohistochimie (E et F)

[Capobianco *et al.* 2007]

L'intensité et la distribution cérébrale des lésions varient en fonction de la maladie, voire de la souche d'EST (cf. partie 1.1.4.). Pour l'ESB, si ces lésions sont retrouvées dans les différentes parties du SNC (mésencéphale, protubérance annulaire, bulbe rachidien, cervelet, hémisphères cérébraux), l'obex (partie du tronc cérébral) a été identifié comme le site préférentiel d'accumulation de la PrP^{sc} et de concentration des lésions.

L'accumulation de la PrP^{sc} dans le SNC, de même que les lésions cérébrales, sont des phénomènes tardifs décelables seulement en fin de période d'incubation de la maladie. La majeure partie de la période d'incubation est silencieuse d'un point de vue lésionnel et correspond à la diffusion du prion dans l'organisme. La cinétique de diffusion de la PrP^{sc}

dépend du fond génétique de l'hôte, de la souche d'EST et du mode de contamination et conditionne l'infectiosité des tissus [Béringue *et al.* 2008]. La connaissance des modalités de diffusion de l'agent infectieux dans l'organisme est donc primordiale à la détermination du niveau d'infectiosité des tissus ainsi qu'à la compréhension des modalités de transmission de la maladie.

Dans le cas des EST acquises de manière naturelle, correspondant généralement à une contamination orale, une phase de contamination précoce permettant la pénétration de l'agent infectieux dans l'organisme précède la phase neuro-invasive permettant au prion de gagner le SNC via le système nerveux autonome (SNA). En phase de contamination, les plaques de Peyer (organe lymphoïde de la muqueuse intestinale faisant partie du GALT, gut associated lymphoid tissue) sont le siège du transfert du prion, de la lumière intestinale dans l'organisme. La PrP^{sc} est ainsi retrouvée de manière précoce dans les structures lymphoïdes de la sphère intestinale. L'invasion du SNA se ferait au contact des organes lymphoïdes infectés, mais le mécanisme de progression de l'agent pathogène vers le SNC n'est pas totalement établi. En fonction de la souche d'EST et de l'hôte, une phase invasive précoce et facultative des organes lymphoïdes secondaires peut avoir lieu entre les phases de contamination et de neuro-invasion. Ce phénomène, très fréquent dans certaines EST (tremblante classique), semble marginal dans le processus physiopathologique de l'ESB. Aussi, dans le cas de l'ESB, si la PrP^{sc} peut être retrouvée dans certains organes, cette présence est généralement transitoire et la PrP^{sc} est essentiellement concentrée dans système nerveux [Lacroux and Andréoletti 2009].

1.1.3. Possibilités diagnostiques des EST

D'un point de vue clinique, les EST sont caractérisées par des symptômes tardifs, non spécifiques, reflétant l'atteinte du SNC et font suite à une longue période d'incubation. La structure primaire de la protéine pathologique étant identique à celle de la protéine codée par le génome de l'hôte et naturellement présente dans les cellules, aucune réaction immunitaire n'est décelable au cours de la totalité du processus physiopathologique de la maladie. Aucun marqueur biologique de la maladie n'ayant été mis en évidence en dehors du SNC, le diagnostic de certitude des EST repose encore actuellement sur la mise en évidence de la PrP^{sc} dans le SNC lui même [Deslys and Grassi 2005; Grassi *et al.* 2008].

1.1.3.1. Une symptomatologie polymorphe peu spécifique

La phase clinique de la maladie est caractérisée par l'apparition de signes nerveux évolutifs aboutissant de manière inéluctable à la mort. Dans le cas de l'ESB, la durée de la période clinique de la maladie est très variable, de quelques semaines à quelques mois. Le début de la manifestation clinique de la maladie est difficile à identifier de manière précise, du fait de la discrétion et de la non spécificité des premiers symptômes (diminution de la production laitière, léger changement de comportement). Le tableau clinique de l'ESB regroupe des signes généraux (diminution de production laitière, perte de poids), des modifications du comportement et de la sensibilité de l'animal (isolement, anxiété, hyperesthésie) ainsi que des troubles locomoteurs et musculaires (ataxie et chutes, trémulations musculaires) [Wilesmith *et al.* 1988; Hoinville 1993; Hörnlimann and Braun 1994; Cazeau *et al.* 2002]. La fréquence et l'intensité de ces signes sont rapportées de manière variable selon le type de production de l'animal et le pays, probablement en raison de la variabilité de l'attention portée quotidiennement à l'animal et d'un manque d'homogénéité dans la définition des termes cliniques employés [Cazeau *et al.* 2002].

Le polymorphisme, l'hétérogénéité et l'absence de spécificité des symptômes rendent le diagnostic clinique de l'ESB difficile. Aucun signe ou association de signes clinique n'est pathognomonique de la maladie. En production bovine, diverses neuropathologies d'origine centrale, infectieuse ou métabolique présentent des symptômes similaires à ceux de l'ESB ; par conséquent le diagnostic différentiel n'est pas aisé [Saegerman *et al.* 2003; Cockcroft 2004].

Aussi, malgré la détermination de tableaux cliniques très évocateurs de la maladie [Cockcroft 1999; Cockcroft 2000], les symptômes observés ne permettent d'établir, au final, qu'une suspicion d'ESB.

1.1.3.2. Un diagnostic de certitude post-mortem

En l'absence de symptômes pathognomoniques de la maladie, de réaction immunitaire ou de modifications biochimiques décelables chez l'hôte, le diagnostic de certitude de l'ESB fait appel à la mise en évidence de la PrP^{sc} dans le SNC et/ou des lésions caractéristiques des EST (cf. supra). Ce diagnostic est ainsi, encore actuellement, uniquement post-mortem et réalisé à partir d'un prélèvement de tronc cérébral.

Les méthodes de diagnostic conventionnelles

Initialement, le diagnostic des EST reposait sur la mise en évidence, en microscopie optique, des lésions dégénératives du SNC caractéristiques de ces maladies (figure 1.2).

Cet examen histologique a été supplanté par les techniques d'immuno-histochimie (IHC), plus sensibles, permettant de mettre en évidence les accumulations de PrP^{sc} grâce à des anticorps spécifiques. Actuellement l'IHC est toujours une méthode de référence dans le diagnostic des EST [Grassi *et al.* 2008]. Cependant, la méthode du western immunoblotting (WB), basée sur la mise en évidence de l'empreinte immunologique de la PrP^{sc}, est la plus utilisée, notamment pour la caractérisation des souches d'EST (cf. partie 1.1.4.). Après une phase de traitement de l'échantillon par la protéinase K, permettant l'élimination de la PrP^c naturellement présente dans les tissus, l'échantillon subit un traitement aux détergents et une analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La PrP^{sc} dénaturée est alors transférée sur un support solide et détectée au moyen d'anticorps marqués par une enzyme. L'empreinte ainsi obtenue présente trois bandes de poids moléculaires différents, correspondant aux trois états de glycosylation (non glycosylé, mono- et di-glycosylé) des fragments de la PrP^{sc} obtenus après digestion partielle par la protéinase K (figure 1.3). Cette empreinte et l'intensité du signal sont, pour un anticorps donné, une des caractéristiques de la souche de prion.

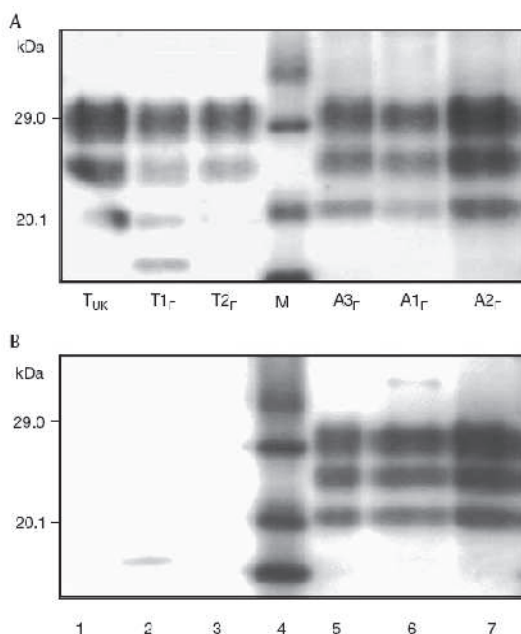


Figure 1.3 - Profils électrophorétiques de la PrP^{sc} après digestion par la protéinase K et marquage par un anticorps anti-PrP : RB1 (A) ou P4 (B) (technique du western immunoblotting).

ESB classique en T_{UK}, T_{1F}, T_{2F}, 1, 2 et 3, ESB atypique en A_{3F}, A_{1F}, A_{2F}, 4, 5 et 6.

D'après Biacabe, 2004 [Biacabe *et al.* 2004].

Enfin, la méthode la plus sensible, mais également la plus lourde à mettre en place, est l'infection expérimentale, généralement menée sur rongeurs (souris, hamster...) pour des raisons pratiques. Cette méthode consiste à injecter un homogénat préparé à partir d'un tissu

infecté, ou potentiellement infecté, à un animal, et à surveiller l'apparition des symptômes. Après la mort de l'animal, la confirmation du développement de la maladie est réalisée au moyen des techniques décrites précédemment. Le développement de lignées de souris transgéniques exprimant ou sur exprimant le gène PRNP de l'espèce donneuse a permis de grandes avancées en raccourcissant les délais expérimentaux [Deslys and Grassi 2005; Grassi *et al.* 2008].

Cependant, aucune des méthodes décrites ici n'est adaptée à un diagnostic à grande échelle. Suite à la première « crise de la vache folle » et à la mise en évidence de la transmissibilité de l'ESB à l'homme, le développement de tests de diagnostic permettant un criblage à grande échelle devint une priorité. Il était en effet devenu indispensable de mettre en place un large dépistage de la maladie en vue d'en évaluer la prévalence et d'écarter tout bovin atteint d'ESB de la consommation humaine et animale.

Les tests de diagnostic rapides

Une nouvelle génération de tests de diagnostic dits « rapides », utilisant les propriétés biochimiques distinguant la PrP^{sc} de la PrP^c (résistance partielle à la protéinase K ou propriétés d'agrégation) et basés sur la détection immunologique de la PrP^{sc}, fut développée. En 1999, sur quatre tests évalués par la Commission Européenne, trois furent retenus pour un développement industriel [Moynagh and Schimmel 1999; Moynagh *et al.* 1999] : les tests Enfer (Enfer technologie Ltd, Newbridge, Irlande), Prionics (Prionics, Zurich, Suisse) et CEA (Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France) exploité par la société Bio-Rad. Les nouvelles évaluations, menées en 2002 et 2003, permirent de valider huit autres tests dont quatre ont été ou sont encore utilisés en France : Prionics-Chek LIA et Prionics-Chek Prio-Strip (Prionics), TSE Kit version 2.0 (Enfer), Herd-Chek BSE Test Kit (IDEXX, Westbrook, USA). Ces tests sont pour la plupart de type ELISA (Enzyme Like Immunosorbent Assay) sauf un test Prionics (WB), le Prio-Strip (test de type immuno-chromatographique) ainsi que le test Herd-Chek d'Idexx (capture spécifique de la PrP^{sc}) [Moynagh *et al.* 2002; Anonyme 2003]. Ces tests permettent d'obtenir un résultat en moins de 24 heures, délai compatible avec la libération des carcasses pour la consommation.

Les évaluations menées par la Commission Européenne ont conclu à une sensibilité, une spécificité et des limites de détection équivalentes pour tous ces tests. Cependant, les tests initialement évalués ont subi certaines évolutions au cours du temps sans nécessairement être réévalués, du fait d'un changement non majeur de leur technologie. Il semble ainsi qu'une

augmentation de la sensibilité des tests ait eu lieu au cours du temps et que certains tests aient une meilleure sensibilité que d'autres [Grassi *et al.* 2001; Arzac *et al.* 2007; Grassi *et al.* 2008]. Il faut également noter que tous les tests ne permettent pas une différenciation des souches d'ESB dites atypiques.

Malheureusement, les tests de dépistage rapides, de même que les méthodes de diagnostic conventionnelles, ne permettent pas de détecter la maladie pendant la plus grande partie de la période préclinique. Les études menées en condition expérimentales sur bovins, et les modélisations des résultats de ces expériences, indiquent une probabilité de détection de 0,5 dans les 2 à 3 mois précédant les symptômes, sans supériorité de l'IHC sur les tests rapides [Wells and Simmons 1996; Wells *et al.* 1998; Grassi *et al.* 2001; Wells *et al.* 2005; Arnold *et al.* 2007]. Le diagnostic tardif et post-mortem des EST pose un problème, notamment dans le cas où l'infectiosité n'est pas limitée au SNC et à quelques organes et que la quantité de PrP^{sc} présente dans les tissus et/ou liquides périphériques est insuffisante pour être mise en évidence par les méthodes décrites précédemment. L'apparition de cas de vMCJ suite à des transfusions sanguines a rendu prioritaire le développement d'outils diagnostic ante-mortem. Actuellement la technique la plus prometteuse est la PMCA (protein misfolding cyclic amplification), méthode consistant à amplifier la PrP^{sc} présente dans l'échantillon afin de la rendre détectable [Saa *et al.* 2006 ; Saa *et al.* 2006]. Cependant, des études récentes ayant montré l'apparition spontanée et aléatoire de PrP^{sc} dans l'échantillon, il est nécessaire d'être prudent quant à la spécificité de cette méthode [Deleault *et al.* 2007].

1.1.4. Caractérisation des EST

La nature particulière de l'agent responsable des EST, sa transmissibilité ainsi que la physiopathologie de ces maladies sont à l'origine de la notion de souche et de barrière d'espèce. Ces notions sont nécessaires à la compréhension d'une partie de l'épidémiologie de la maladie et des mesures réglementaires adoptées en vue de contrôler l'ESB et de limiter le risque pour l'homme.

La caractérisation des EST était initialement basée sur l'observation des symptômes et du profil lésionnel (intensité et localisation des lésions cérébrales). Cependant ces méthodes étaient insuffisantes pour différencier certaines EST. En effet, si, dans le cas de l'ESB classique, le profil lésionnel est relativement homogène d'un animal à l'autre, dans la tremblante ce profil semble influencé non seulement par l'agent infectieux mais également par les

caractéristiques de l'animal (âge, race, génétique). De même, chez un même hôte, l'ESB et la tremblante peuvent donner un même profil lésionnel. La caractérisation par une analyse de la PrP^{sc} est devenue indispensable à la différenciation des EST. La combinaison des techniques d'IHC, d'ELISA et du WB (cf. partie 1.1.3.), et les prétraitements nécessaires à leur réalisation (digestion enzymatique, solubilisation, agrégation) permettent de déterminer les propriétés biochimiques et conformationnelles de la PrP^{sc}, et de différencier un prion d'un autre.

Enfin, la transmission expérimentale à la souris, nécessaire à la définition de souche, est actuellement considérée comme une méthode complémentaire incontournable dans la caractérisation des prions.

1.1.5. Notions de souche et de barrière d'espèce

1.1.5.1. Transmission expérimentale et caractérisation des agents

La caractérisation des agents responsables des EST par transmission expérimentale est généralement effectuée par inoculation intracérébrale ou périphérique (voies orale, intrapéritonéale...) à la souris conventionnelle, c'est à dire non modifiée génétiquement. Après un certain nombre de transmissions par passages en série, deux à trois généralement, un phénomène d'adaptation de l'agent infectieux au nouvel hôte apparaît. On note alors, le plus souvent, une réduction de la période d'incubation de la maladie et une augmentation de l'efficacité de la transmission avec augmentation du taux d'attaque (nombre de malades/nombre d'inoculés) [Béringue *et al.* 2008]. L'agent infectieux adapté est alors caractérisable, sur une lignée de souris donnée, par la symptomatologie, la période d'incubation, le profil lésionnel, la distribution de la PrP^{sc} dans le SNC et les caractéristiques biochimiques et immunohistochimiques de la PrP^{sc}. Ce sont ces caractéristiques phénotypiques de la PrP^{sc} et de la maladie, après adaptation du prion au nouvel hôte par passages en série, qui permettent d'identifier la souche de prion. La transmissibilité à la souris conventionnelle est ainsi indispensable à la notion de souche de prion.

1.1.5.2. Barrière d'espèce et barrière de transmission

L'adaptation de l'agent infectieux à une nouvelle espèce correspond à la disparition de la barrière de transmission interspécifique ou barrière d'espèce. La notion de barrière d'espèce représente la difficulté d'adaptation d'un agent infectieux d'une espèce à l'autre et est caractérisée par l'impossibilité ou la moindre efficacité de la transmission de cet agent entre espèces donneuse et receveuse. Dans le cas des EST, cette barrière d'espèce est très influencée

par le gène PRNP, certaines mutations de ce gène entraînant une susceptibilité accrue (tremblante, vMCJ). Elle semble également conditionnée au degré de similitude entre la séquence primaire de la PrP^{sc} des espèces donneuse et receveuse ainsi qu'aux conformations que les PrP peuvent adopter pour interagir [Collinge and Clarke 2007; Béringue *et al.* 2008]. La voie de transmission semble également jouer un rôle important, certaines souches n'étant pas transmissibles par inoculation périphérique. Au final, il semble que la plupart des barrières d'espèce soient des barrière de transmission.

1.1.5.3. Barrière de souche et concept de souche

Le gène PRNP et la structure tridimensionnelle de la PrP^c sont hautement conservés chez les mammifères et l'adaptation de la PrP^{sc} au sein d'un nouvel hôte ne correspond pas tout à fait à un saut d'une espèce à l'autre. La possibilité de transmission de certaines souches à de nombreux hôtes différents et l'impossibilité d'en transmettre certaines à une espèce autre que celle d'origine, révèlent l'existence de barrière de souches. Les résultats des transmissions expérimentales récentes de différentes souches à différents hôtes sont également assez troublants [Béringue *et al.* 2008; Laude and Beringue 2009]. Certaines souches acquièrent ainsi en premier passage des caractéristiques d'autres souches, leur tropisme d'organe et leur caractéristiques étant modifiées, ces souches pouvant retrouver éventuellement leurs caractéristiques initiales lors du repassage sur l'hôte d'origine. Certaines souches semblent ne pas être transmissibles avec un premier passage silencieux, l'animal ne développant pas la maladie ; cependant au second passage sur le même hôte ou un autre hôte, l'infectiosité réapparaît avec des caractéristiques similaires à la souche d'origine ou totalement différentes. Ces glissement phénotypiques et phénomènes de convergence phénotypique assez imprévisibles amènent la question de la définition réelle de souche et du concept de souche en matière d'EST.

1.2. Epidémiologie de l'ESB

1.2.1. Une origine controversée

Si le rôle joué par les FVO contaminées dans le développement de l'épizootie d'ESB ne fait plus aucun doute depuis longtemps, l'origine de la maladie elle-même a été, et est toujours, sujette à controverse [Wilesmith *et al.* 1991 ; Colchester and Colchester 2005; Baron and Biacabe 2006]. Lors de l'identification de la maladie au Royaume-Uni, une des hypothèses à son

apparition était l'adaptation chez le bovin, de l'agent infectieux responsable de la tremblante [Wilesmith *et al.* 1988; Wilesmith *et al.* 1991]. Cette hypothèse était fondée d'une part, sur les similitudes lésionnelles entre la tremblante et l'ESB et d'autre part, sur la concomitance entre le développement de l'élevage ovin au Royaume-Uni -développement associé à une hausse de la prévalence de la tremblante dans les troupeaux- et la date supposée du début de l'exposition des bovins à l'ESB (années 1970). Les expériences de transmission de l'ESB et de la tremblante sur modèle murin n'ont, cependant, jamais permis de confirmer une telle hypothèse [Bruce *et al.* 1994; Béringue *et al.* 2008]. Cette thèse domina malgré tout longtemps les autres : amplification et recyclage d'un prion bovin apparu suite à une mutation, ou maladie bovine naturelle sporadique non diagnostiquée du fait de sa faible prévalence et amplifiée et recyclée dans les FVO [Wilesmith *et al.* 1988].

Récemment, la mise en évidence de formes atypiques d'EST chez les ruminants (tremblante atypique et ESB de type L et H) et les résultats des transmissions de ces EST dans les modèles expérimentaux ont relancé le débat sur l'origine bovine de l'ESB quant à la possibilité du recyclage et de l'amplification d'une maladie bovine sporadique préexistante à l'épizootie d'ESB [Baron and Biacabe 2006].

1.2.2. Modalités de transmission de l'ESB en situation naturelle

1.2.2.1. Contamination orale

Les études épidémiologiques ont rapidement incriminé les FVO, utilisées en tant que compléments protéiques dans l'alimentation des animaux de rente, comme principal vecteur de diffusion de la maladie chez les bovins [Wilesmith *et al.* 1988; Wilesmith *et al.* 1991; Wilesmith *et al.* 1992]. A l'époque, les FVO étaient composées de sous-produits de l'abattoir, de l'industrie des viandes et de l'équarrissage (déchets d'abattoir, os, plumes, saisies³ et cadavres) qui subissaient un ensemble de traitements thermiques et chimiques permettant la déshydratation, l'extraction des graisses et la stérilisation des matières premières [Enjalbert 1996]. Au moment où l'ESB prit une forme épizootique en GB, l'utilisation des FVO n'était cependant pas nouvelle. Il a alors été suggéré que la modification du processus d'extraction des graisses et l'abaissement des températures de chauffage, mis en place pour des raisons économiques à la fin des années 80, pouvaient être à l'origine de la moindre inactivation du prion permettant son recyclage [Wilesmith *et al.* 1991]. On pourrait également imaginer que l'accroissement de l'utilisation des FVO au moment de l'industrialisation des productions

³ Carcasses, morceaux de carcasses ou organes jugés impropres à la consommation humaine.

animales ait été un facteur suffisant pour permettre l'amplification d'une maladie à faible prévalence présente depuis longtemps. Quoiqu'il en soit, les FVO ont été interdites dans l'alimentation de tous les ruminants dès 1988 au Royaume-Uni.

1.2.2.2. Transmission maternelle et susceptibilité génétique

La transmission verticale mère-veau a été évaluée à partir d'une étude cas-témoin mise en place en 1989 mais dont les résultats ont été difficiles à analyser en raison d'un facteur de confusion non contrôlé lors de la mise en place de l'étude [Wilesmith *et al.* 1997]. En effet, cette étude consistait à comparer la prévalence de l'ESB entre des veaux issus de mères atteintes d'ESB et des veaux issus de mères saines, ces animaux ayant été élevés avec la même ration alimentaire comportant, entre autre, des aliments industriels. A l'époque, les contaminations croisées entre aliments industriels bovins et aliments destinées aux monogastriques dans lesquels les FVO étaient encore autorisées, n'était pas connues, faute de recul [Hoinville *et al.* 1995]. Un certain nombre de veaux témoins ayant développé la maladie, il est fort probable que tous les animaux de cette étude aient été exposés au risque alimentaire, conduisant à une estimation biaisée du niveau de transmission verticale. Les données de cette étude furent ré-analysées par trois épidémiologistes. Leurs rapports confirmèrent la possibilité d'une transmission maternelle cependant faible (de 1 à 10 % des cas ESB), ayant essentiellement lieu dans les derniers mois précédant l'apparition des signes clinique chez la mère et insuffisante au maintien de l'épizootie [Curnow *et al.* 1997; Donnelly *et al.* 1997; Gore *et al.* 1997; Wilesmith *et al.* 1997].

Cependant, lors de la quantification de la transmission mère-veau, la part de la prédisposition génétique dans cette transmission n'a pas pu être évaluée et jusqu'à présent, aucun facteur génétique n'a été mis en évidence pour l'ESB [Goldmann 2008].

La contamination des bovins par l'ESB est ainsi essentiellement, sinon exclusivement, alimentaire via la consommation de FVO contaminées, la transmission horizontale de l'ESB n'ayant jamais été mise en évidence. La diminution spectaculaire du nombre de cas ESB au Royaume-Uni suite à l'interdiction de l'utilisation des FVO dans l'alimentation des ruminants corrobore l'implication de ces compléments alimentaires dans le processus épizootique [Hoinville 1994](figure 1.4).

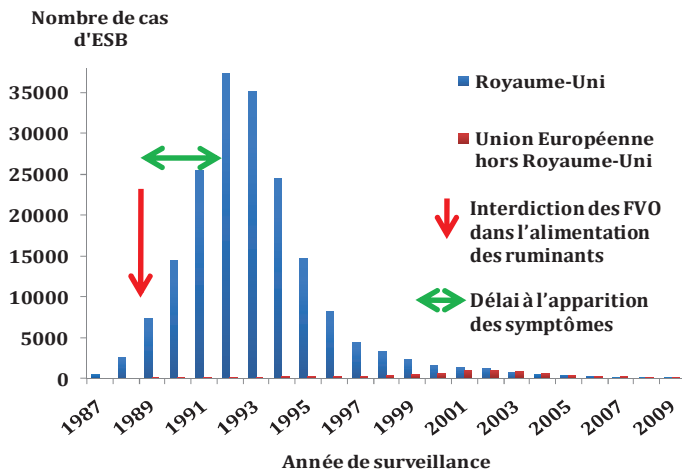


Figure 1.4 - Nombre de cas ESB détectés au Royaume-Uni et en Europe entre 1987 et 2009.

(source OIE

http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm

consulté le 24 septembre 2009)

1.2.3. Période d'incubation et âge des animaux à l'infection

Les premières études épidémiologiques menées au Royaume-Uni ont montré une distribution particulière de l'âge des animaux à l'apparition des signes cliniques [Wilesmith *et al.* 1988], distribution dans laquelle il n'est pas possible de différencier la part de l'âge à l'infection et celle de la période d'incubation. En effet, un âge précoce à la contamination, associé à une longue période d'incubation, donne un âge d'apparition des symptômes similaire à celui d'une contamination plus tardive associée à une période d'incubation plus courte. Les distributions de l'âge à l'infection et de la durée de la période d'incubation de l'ESB ont ainsi été déterminées via l'utilisation de modèles mathématiques s'appuyant sur les données observées et les résultats des transmissions expérimentales.

1.2.3.1. Période d'incubation

La durée moyenne d'incubation de l'ESB a été estimée entre 4 et 6 ans, selon les données et des fonctions de distributions utilisées [Anderson *et al.* 1996; Ferguson *et al.* 1997; Supervie and Costagliola 2004; Supervie and Costagliola 2007]. Les variations dans l'estimation de la durée d'incubation en fonction des données utilisées peuvent être en partie expliquées par une exposition plus importante des animaux au début de l'épizootie, exposition progressivement réduite au cours du temps du fait de l'application de mesures de contrôle (cf. partie 1.3.2.). Les études expérimentales ont montré une relation dose-effet avec une période d'incubation inversement proportionnelle au niveau de la dose infectante [Grassi *et al.* 2001; Wells *et al.* 2007]. Cependant, les doses infectantes intervenant en situation naturelle ne sont pas connues et celles utilisées en infection expérimentale leur sont probablement très supérieures. De plus, au cours de ces expériences, les animaux étaient infectés oralement

directement à partir de tissus infectés et l'infection orale à partir de FVO n'a jamais été réalisée.

Quoi qu'il en soit il est possible que la période d'incubation de l'ESB ait varié au cours du temps en fonction du niveau d'exposition des animaux à l'agent infectieux. Au cours de leur travaux sur l'épizootie française, Supervie *et al* ont ainsi estimé une augmentation probable de la moyenne d'incubation de 5 à 6,3 ans entre 1990 et 2004 en France [Supervie and Costagliola 2007].

1.2.3.2. Age des animaux à l'infection

Lors des premières études épidémiologiques, la distribution de l'âge aux symptômes et l'homogénéité du régime alimentaire des animaux au delà de 2 ans laissaient supposer que les animaux se contaminaient essentiellement avant deux ans [Wilesmith *et al.* 1988; Anderson *et al.* 1996]. Une contamination à l'âge adulte n'avait, cependant, pas été exclue mais estimée comme peu fréquente. Les modélisations des données d'observation et de surveillance ont permis d'évaluer plus précisément la distribution de l'âge à l'infection. Il a ainsi été estimé que les animaux se contamineraient très majoritairement au cours de leur première année de vie, les résultats des modèles différant, là encore, en fonction des pays, des données et des méthodes utilisées [Ferguson *et al.* 1997; Arnold and Wilesmith 2004; Supervie and Costagliola 2004] et du fait qu'il n'est pas possible de distinguer la part de l'âge à l'infection de celle de la période d'incubation (cf. supra). La plus grande susceptibilité des jeunes animaux à l'infection est mal comprise, mais pourrait être expliquée par des modifications du système immunitaire et de la physiologie de l'intestin chez les bovins (diminution progressive du GALT), rendant progressivement moins efficace l'infection orale [St Rose *et al.* 2006].

1.2.4. Facteurs de risque de l'ESB/facteurs influençant la prévalence apparente

Nous distinguons les facteurs de risque de la maladie, c'est à dire les facteurs influençant la probabilité pour un animal d'être infecté par l'ESB, et les facteurs influençant la prévalence apparente de l'ESB, c'est à dire les facteurs influençant la probabilité pour un animal infecté d'être détecté comme un cas ESB.

1.2.4.1. Facteurs de risque de l'ESB

Le risque d'infection par l'ESB est lié au principal, sinon unique, mode de contamination identifié. Les différents facteurs de risque de la maladie reflètent ainsi l'exposition aux FVO des animaux dans leur jeune âge (cf. supra).

Type de production des animaux

Le type de production des animaux, laitier ou allaitant (vache à viande) a été identifié comme facteur de risque dans de nombreux pays [Wilesmith *et al.* 1988; Griffin *et al.* 1997; Ducrot *et al.* 2003; Ru *et al.* 2007]. Plus de 80% des cas ESB détectés en France sont des animaux de type laitiers. Ceci s'explique par des pratiques alimentaires différentes entre élevages laitiers et allaitants. En élevage laitier, les veaux sont rapidement sevrés et alimentés au moyen d'aliments concentrés du commerce (concentrés) tandis qu'en élevage allaitant les veaux sont élevés « sous la mère », nourris essentiellement du lait de celle-ci pendant leurs 6 premiers mois de vie. L'exposition des veaux laitiers aux FVO incorporées de manière légale ou accidentelle dans les concentrés était ainsi plus forte que celle des veaux allaitants à l'époque où les FVO étaient encore autorisées dans l'alimentation des animaux de rente. Dans une moindre mesure, la forte productivité des troupeaux laitiers a été identifiée comme à risque pour l'ESB, la grande taille du troupeau et l'âge au premier vêlage (mise bas à 2 ans en production intensive contre 3 ans en élevage traditionnel) ressortant comme facteurs de risque dans les analyses statistiques [Ducrot *et al.* 2006; La Bonnardière *et al.* 2007].

Saisonnalité de l'exposition des animaux

La saison de naissance de l'animal a également été identifiée comme facteur de risque au Royaume-Uni [Wilesmith 1991; Hoinville 1994; Donnelly *et al.* 1997] et en France [Sala *et al.* 2006], certains mois ou saisons de naissance ressortant comme plus à risque, après ajustement sur les autres facteurs connus, et ce, quel que soit le type de production. Cette saisonnalité de l'exposition des animaux à l'ESB pourrait être expliquée par la différence de consommation des concentrés. Les animaux nés en automne, passant la majorité de leur première année en bâtiment, consommeraient ainsi plus de concentrés, tandis que ces concentrés seraient moins présents dans l'alimentation des animaux nés au printemps. Cependant, une étude menée en France sur les différences d'alimentation des génisses de renouvellement (femelles destinées à la reproduction) au cours de leur première année de vie

n'a pas permis de mettre en évidence des différences de consommation des concentrés en fonction de la saison de naissance des animaux [Belluau and Mathevon 2008].

Cohorte de naissance des animaux

La mise en place progressive des différentes mesures de contrôle de l'ESB, notamment des mesures d'interdiction de l'utilisation des FVO dans l'alimentation des animaux de rente (cf. partie 1.3.2.), a fait varier l'exposition des bovins à l'agent infectieux au cours du temps. La cohorte de naissance, composée d'animaux nés au cours de la même année, apparaît ainsi comme un facteur modulant de manière importante le risque ESB dans la majorité des pays européens (cf. partie 3.4). L'harmonisation tardive de la législation européenne en matière d'interdiction des FVO dans l'alimentation des ruminants, et la mise en place plus ou moins précoce de mesures de contrôle nationales dans certains pays, expliquent les différences observées dans l'évolution temporelle de l'exposition des cohortes entre les pays. En France, les modélisations des données ont permis de mettre en évidence deux pics d'exposition des bovins, suivis d'une diminution constante de l'exposition à partir des cohortes de naissance 1995-1996 (figure 1.5) [La Bonnardière *et al.* 2004; Morignat *et al.* 2004; Supervie and Costagliola 2004; Supervie and Costagliola 2007].

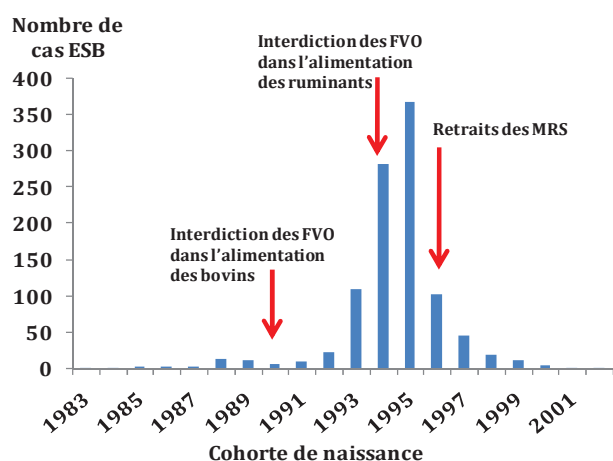


Figure 1.5 - Nombre de cas ESB détectés dans chaque cohorte de naissance, en France, entre janvier 1991 et septembre 2009.

Pas d'effet du sexe et prédisposition génétique non déterminée

Malgré le peu de cas d'ESB diagnostiqués chez les bovins mâles (1,3% des cas ESB en France) le sexe n'a pas été identifié comme un facteur de risque. Cette faible proportion est expliquée par le fait que les animaux mâles sont le plus souvent abattus très jeunes (avant 18 mois) pour la production de viande et que très peu de mâles reproducteurs sont conservés à un âge suffisamment avancé pour permettre la détection de la maladie.

De même aucune prédisposition génétique n'a été mise en évidence de manière certaine chez les bovins [Goldmann 2008], même si l'on ne peut exclure une sensibilité génétique à la maladie [Juling *et al.* 2006; Haase *et al.* 2007]. Les études généalogiques n'ont pas non plus permis de mettre en évidence des lignées plus à risque que d'autre [Wijeratne and Curnow 1990].

1.2.4.2. Facteurs influençant la prévalence apparente de l'ESB

Dans le cas de l'ESB, la prévalence réelle de la maladie dans la population bovine n'est pas directement accessible, du fait d'un diagnostic post-mortem et d'une durée moyenne d'incubation de la maladie supérieure à la durée de vie moyenne des bovins en France. En France, environ 80% des animaux décèdent avant d'avoir atteint l'âge moyen d'apparition des symptômes. De plus, les tests de diagnostic ne permettent de détecter la PrP^{sc} qu'en fin de période d'incubation, au mieux, dans les trois mois précédant l'apparition des signes cliniques [Grassi *et al.* 2001; Arnold *et al.* 2007]. De ce fait, la plupart des animaux infectés ne sont pas détectés et les systèmes de surveillance ne permettent d'accéder qu'à la prévalence de l'ESB dans la population testée, c'est à dire à une prévalence à la mort. Cette prévalence apparente (ou observée) est susceptible d'être influencée par de nombreux facteurs dépendant d'une part, de la population testée et d'autre part, des modalités de surveillance et de diagnostic de l'ESB.

L'âge des animaux au moment de la réalisation du test de dépistage

Parmi les facteurs relatifs à la population bovine testée, le type de production et la cohorte de naissance des animaux, comme évoqué précédemment, ainsi que l'âge des animaux au moment du dépistage sont les facteurs les plus influents. L'âge des animaux à la contamination et la période d'incubation de l'ESB étant relativement stables, l'âge des animaux au moment de l'apparition des signes cliniques de la maladie suit une distribution particulière autour d'une moyenne de 6-7 ans (figure 1.6). Le diagnostic n'étant possible que quelques mois avant l'apparition des symptômes, la probabilité de diagnostiquer un animal infecté est fortement dépendante de l'âge de cet animal au moment de la réalisation du test diagnostic et donc de son âge à la mort.

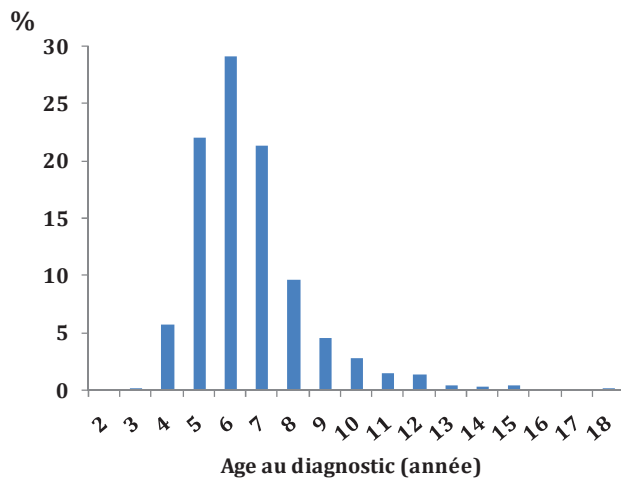


Figure 1.6 - Distribution de l'âge des animaux au diagnostic en France entre janvier 1991 et septembre 2009.

Distribution établie à partir de 1017 cas.

Facteur géographique

Une hétérogénéité géographique de la prévalence de l'ESB a été mise en évidence dans la plupart des pays européens [Anderson *et al.* 1996; Abrial *et al.* 2003 ; Schwermer *et al.* 2003; Sheridan *et al.* 2005 ; Allepuz *et al.* 2007 ; Paul *et al.* 2007 ; Ru *et al.* 2007 ; Schwermer *et al.* 2007 ; Heres *et al.* 2008]. Cette hétérogénéité est liée à l'existence de zones concentrant les activités d'élevage mais également à une régionalisation des types de production, laitier ou allaitant. De plus, la mise en évidence de clusters géographiques serait à mettre en relation avec la localisation et l'étendue des zones commerciales des usines fabricant des aliments pour animaux, les usines intégrant des FVO dans leur compositions étant susceptibles de contaminer leurs élevages clients.

En France, l'hétérogénéité spatiale de l'ESB est liée d'une part, à l'existence de bassins de production concentrant les élevages laitiers et d'autre part, à la coexistence géographique des élevages d'espèces monogastriques (porcs et volailles) et des ruminants. Cette coexistence a probablement favorisé les contaminations croisées entre aliments destinés aux monogastriques, contenant des FVO, et ceux destinés aux ruminants [Abrial *et al.* 2005; Abrial *et al.* 2005; Jarrige *et al.* 2007]. Une évolution temporelle de cette hétérogénéité spatiale a également été mise en évidence, probablement en lien avec une application rigoureuse plus précoce de la réglementation dans les premières régions touchées par l'épizootie (figure 1.7).

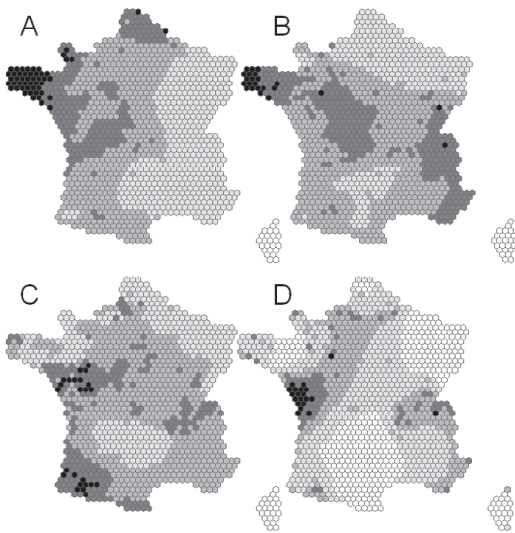


Figure 1.7 - Evolution du ratio d'incidence standardisé du risque ESB sur quatre périodes de naissance.

(A) janvier 1991 à juin 1994 ; (B) juillet 1994 à juin 1995 ; (C) juillet 1995 à juin 1996 ; (D) juillet 1996 à novembre 1998. Augmentation croissante du risque avec l'intensité du gris, le gris moyen représentant un risque relatif de 1. D'après Ducrot, 2005 [Ducrot *et al.* 2005].

Evolution des systèmes de surveillance de l'ESB

Les modalités de surveillance de l'ESB ont beaucoup évolué en Europe, depuis la simple obligation de déclaration de la maladie en 1990, à la mise en place d'un dépistage systématique de tous les bovins de plus de 24 ou 30 mois morts ou abattus (cf. partie 1.3.1.). Avant la mise en place de ce dépistage, la surveillance de l'ESB était peu efficace voir inefficace dans de nombreux pays, très peu d'animaux malades étant détectés par la surveillance clinique des animaux [Supervie and Costagliola 2006].

A la mise en place du dépistage systématique de l'ESB en 2001, du fait de l'amélioration du diagnostic, la prévalence de l'ESB a considérablement augmenté dans la plupart des pays européens (figure 1.8). La prévalence apparente de l'ESB pour une année donnée est ainsi fortement influencée par la qualité et l'efficacité des systèmes de surveillance en place cette même année.

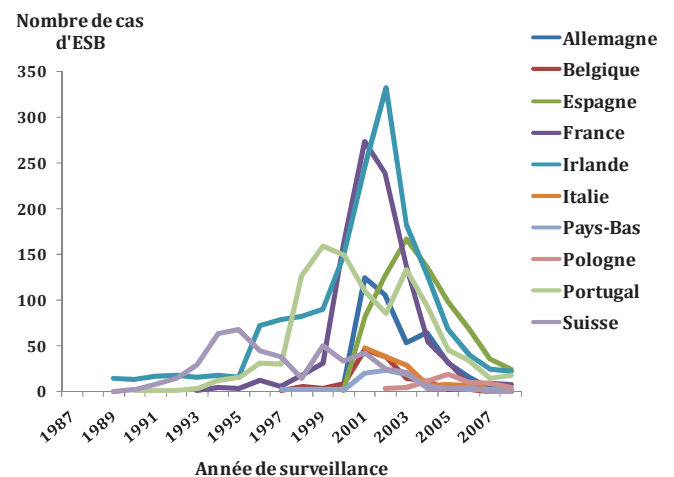


Figure 1.8 - Evolution du nombre de cas d'ESB détectés entre 1987 et 2008 en Europe géographique, hors Royaume-Uni.

Source OIE, site consulté le 14 septembre 2009

http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm

Influence du test de dépistage

Des études plaident en faveur d'une meilleure sensibilité de certains tests de diagnostic rapides et d'une évolution au cours du temps de la sensibilité de l'ensemble des tests [Grassi *et al.* 2001; Arzac *et al.* 2007; Grassi *et al.* 2008]. Se pose alors la question de l'influence, sur la prévalence apparente de l'ESB, des tests utilisés en France dans le cadre de la surveillance exhaustive. En effet, les six tests rapides utilisés en France⁴ l'ont été avec une intensité variable en fonction de l'année de surveillance, de la région, du type de production et du programme de surveillance (surveillance à l'abattoir ou à l'équarrissage). Une étude menée sur les données françaises de la période juillet 2001-décembre 2007 n'a pas permis de mettre en évidence un effet du test de dépistage sur la prévalence apparente de l'ESB [Maltaverne 2009]. Ces résultats étaient concordants avec ceux d'une précédente étude menée sur un jeu de données restreint et qui n'avait pas, non plus, conclu à un effet du test de dépistage [La Bonnardière *et al.* 2004].

Qualité du prélèvement

Évaluée à deux reprises [Morignat and Calavas 2007; Maltaverne 2009], l'état et la qualité du prélèvement, notamment l'absence de l'obex dans le prélèvement, ne semblent pas influencer la probabilité de détection de l'ESB. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que, contrairement à ce qui est observé en situation expérimentale (forte dose infectante), la PrP^{sc} serait répartie de manière plus diffuse dans le SNC en condition d'infection naturelle (très faible dose infectante) [Arnold *et al.* 2007]. Or le site de prélèvement pour l'application des tests rapides (obex) avait été déterminé à partir de ces situations expérimentales. De même, la lyse du tissu prélevé ne semble pas affecter la détection de la PrP^{sc} dans le prélèvement [Chaplin *et al.* 2002].

De multiples facteurs influencent ainsi la probabilité d'infection d'un animal, sa probabilité de détection et la prévalence apparente de l'ESB. Ces facteurs de variabilité ont été identifiés à partir des données d'observation de l'ESB dite classique et ne sont probablement pas extrapolables aux formes atypiques d'ESB identifiées récemment et pour lesquelles peu de données sont disponibles.

⁴ Tests utilisés en France entre juillet 2001 et décembre 2007 :WB Prionics, Prionica LIA, Priostrip, Thesee Biorad, Idexx (Herd-Chek) et Enfer (version 2.0)

1.2.5. Les ESB atypiques : vers une origine bovine de l'ESB ?

Jusque récemment, on pensait que l'ESB était due à une souche unique de prion, les nombreuses transmissions expérimentales ayant montré la remarquable stabilité et l'uniformité de cette souche par passages en série chez la souris, mais également par transmission à différents hôtes [Baron and Calavas 2005]. En 2003, deux nouvelles souches d'ESB dites atypiques, ESB de type L et ESB de type H ou BASE (pour Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy) ont été mises en évidence de manière concomitante en France [Biacabe *et al.* 2004] et en Italie [Casalone *et al.* 2004]. Ces types d'ESB se caractérisent par un profil électrophorétique différent de celui de l'ESB classique (figure 1.9). Le type H présente ainsi des fragments de PrP^{sc} de taille légèrement supérieure tandis que le type L est caractérisé par des fragments de taille légèrement inférieure, une fraction biglycosylée moins abondante et d'un point de vue lésionnel, par l'abondance de plaques amyloïdes. Les transmissions expérimentales sur modèle murin ont permis de caractériser ces souches d'ESB atypiques [Béringue *et al.* 2006; Buschmann *et al.* 2006].

Les ESB de types L et H ne se distinguent pas seulement par leurs profils biochimiques et lésionnels, mais également par des caractéristiques épidémiologiques différentes de celle de l'ESB classique. D'un point de vue prévalence, les deux types d'ESB atypiques sont détectés avec une fréquence similaire (moins de 1 cas par million) et relativement homogène dans le temps et dans l'espace [Biacabe *et al.* 2008], y compris dans les pays apparemment indemnes d'ESB classique. Alors que la prévalence de l'ESB classique a fortement évolué au cours du temps, celle des ESB-L et H est restée constante [Biacabe *et al.* 2008]. En France, à ce jour, 10 cas d'ESB-L et 10 d'ESB-H ont été identifiés. D'autre part, l'âge moyen au diagnostic des animaux atteints d'ESB atypique est plus élevé que celui des animaux atteints d'ESB classique : 12,3 [8-16]ans vs 6,9 [2,5-15,5]ans respectivement. Enfin, les transmissions expérimentales menées sur bovins en Italie avec la souche ESB-L ont montré une symptomatologie différente de celle observée avec l'ESB classique avec notamment le développement d'une amyotrophie [Lombardi *et al.* 2008].

L'ensemble de ces caractéristiques épidémiologiques plaident en faveur de formes sporadiques pour les deux ESB atypiques, aucune mutation spécifique du gène PRNP n'ayant été mise en évidence dans ces maladies, sans qu'il soit possible, toutefois, d'exclure une susceptibilité génétique [Clawson *et al.* 2008].

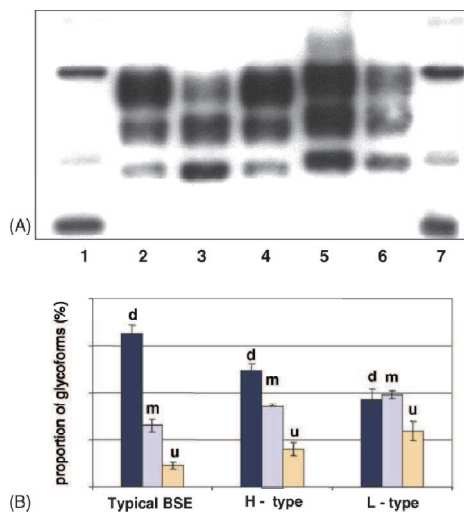


Figure 1.9 - Profils électrophorétiques (A) et ratios de glycoformes (B) des différentes formes d'ESB.

(A) ESB classique (couloirs 2 et 4), ESB atypique de type H (couloirs 5 et 6) et ESB de atypique de type L (couloir 3).

(B) proportion des formes diglycosilée (d), monoglycosylée (m) et non glycosylée (u) en fonction du type d'ESB.

[Baron *et al.* 2007]

La mise en évidence des formes atypiques d'ESB a relancé le débat sur l'origine ovine controversée de l'ESB classique [Capobianco *et al.* 2007] et soulevé de nombreuses questions quant à la signification de telles souches et à leur dangerosité vis-à-vis de l'homme [Brown *et al.* 2006; EFSA 2008]. La transmission des ESB-L et H sur différents modèles de souris sauvages ou exprimant les prions bovin, ovin ou humain a montré des résultats différant selon la souche. En premier passage, l'ESB-H a conservé ses caractéristiques lésionnelles et physicochimiques avec une nette augmentation de la période d'incubation de la maladie et la transmission à la souris ovinisée exprimant la mutation génétique ARQ a été impossible. La transmission de l'ESB-L a donné des résultats plus troublants. Cette transmission a semblé plus efficace en premier passage, avec un raccourcissement de la période d'incubation et a révélé des similarités avec l'agent infectieux de l'encéphalopathie du vison [Baron *et al.* 2007]. Mais surtout, on a observé en second passage sur souris ovinisée exprimant le gène de sensibilité à la tremblante classique, un glissement phénotypique avec acquisition des caractéristiques de souches de l'ESB classique, cette souche étant alors impossible à distinguer de l'ESB classique [Béringue *et al.* 2007]. D'autre part, la transmissibilité de l'ESB-L au macaque et à des souris humanisées, exprimant l'allèle méthionine (allèle de susceptibilité aux EST chez l'homme), a été établie [Comoy *et al.* 2008].

La découverte de formes d'ESB dites atypiques et des capacités de glissement phénotypique de certaines souches soulève de nombreuses questions quant au lien entre ces souches et les autres formes : ESB classique et formes sporadiques des EST humaines. En l'absence de recul et de connaissances suffisantes sur ces ESB atypiques, se pose la question de l'adéquation des mesures de surveillance, de lutte et de police sanitaire à la gestion du risque sanitaire de telles EST.

1.3. Réglementation de l'ESB : contexte, évolution et état des lieux

Signalée officiellement pour la première fois au niveau international en mai 1988, l'ESB n'a fait l'objet de mesures législatives en dehors du territoire britannique qu'à partir de mi-1989. Ces premières mesures étaient des mesures de sauvegarde visant à protéger le cheptel bovin et les consommateurs, dans l'éventualité d'un risque pour l'homme. L'Union Européenne n'institua la déclaration obligatoire de la maladie que l'année suivante, en avril 1990.

La crise sanitaire de 1996, faisant suite à l'annonce de la transmissibilité de l'ESB à l'homme, a entraîné une réévaluation fondamentale de l'approche de l'Union Européenne sur les questions de sécurité sanitaire, aboutissant à une harmonisation de la législation, tant sur le plan de la surveillance que du contrôle des EST. Au fur et à mesure de l'extension de l'épizootie d'ESB en Europe et de l'augmentation des connaissances sur les EST, une réglementation complexe a été mise en place, réévaluée périodiquement en fonction des avancées scientifiques et de l'évaluation du risque. A cette réglementation européenne⁵ à plusieurs niveaux -surveillance, contrôle et éradication des EST- se sont souvent ajoutées des législations nationales nécessairement plus restrictives.

1.3.1. Mesures de surveillance de l'ESB : mise en place et évolution au niveau européen et adaptation au niveau français

Le Royaume-Uni, premier pays touché par l'ESB, fut également le premier à mettre en place des mesures de surveillance avec une déclaration obligatoire de tous les cas suspects dès juin 1988. Jusqu'en 1999, la surveillance de l'ESB au niveau européen a été relativement peu efficace, limitée par les faibles moyens diagnostiques et largement dépendante du volontariat des pays à mettre en place leur propre système de surveillance. La prise de conscience collective, suite à la crise de 1996 et à la mise au point des tests de dépistage rapides, permit d'accroître considérablement l'effort de surveillance sur la base d'une réglementation communautaire solide.

1.3.1.1. Cadre réglementaire européen de la surveillance de l'ESB

La déclaration obligatoire de tous les cas d'ESB diagnostiqués dans les Etats Membres fut instaurée au niveau communautaire le 1^{er} avril 1990. Cette obligation prévue pour une

⁵ Chronologie disponible sur http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/chronology_en.htm, consultée le 14 septembre 2009

période initiale de 12 mois fut reconduite en juillet 1992 puis en décembre 1997 avant d'être abrogée par le règlement de mai 2001. Ces décisions ne définissaient cependant pas de cadre particulier à la surveillance de l'ESB et les modalités de cette surveillance ont donc été laissées à l'appréciation des Etats Membres. L'hétérogénéité de la pression de surveillance entre les Etats Membres fut relativement importante, à l'image du nombre de cas rapportés dans les différents pays (tableau 1.1 page 22). La surveillance clinique de l'ESB semble ainsi avoir été relativement efficace en Suisse et au Royaume-Uni mais pratiquement inexistante en Allemagne, Italie et Espagne où la forte augmentation des cas, voire l'apparition de cas autochtones fit suite à la mise en place du dépistage exhaustif imposé par décision communautaire, révélant le niveau d'atteinte de ces pays.

A partir de 1998, la communauté européenne se dota d'un cadre d'action en matière de surveillance des EST, reprenant les recommandations de l'Office International des Epizooties (OIE). Cette décision communautaire fit suite à l'établissement du caractère zoonotique de l'ESB et des nombreuses déficiences constatées en matière de surveillance et de prévention des EST, soulignant la nécessité d'une harmonisation. La décision d'avril 1998 établit ainsi : une obligation de formation des personnels et professions en matière d'ESB, l'obligation de porter une suspicion sur tout animal de plus de 20 mois présentant des signes neurologiques, l'obligation de restriction des mouvements d'animaux et troupeaux suspects ainsi que la consignation des carcasses suspectes jusqu'à libération ou destruction. Cette décision définissait également un programme de surveillance minimum pour les EST. Applicable au 1^{er} mai 1998, cette décision ne permit cependant pas d'améliorer significativement la surveillance de l'ESB et la déclaration des cas.

En 1999, suite à la validation de trois tests rapides pour le dépistage de l'ESB, la législation européenne put enfin se doter d'une réglementation puissante en matière de surveillance. La décision de juin 2000, applicable au 1^{er} janvier 2001, instaura la surveillance active de l'ESB pour les animaux identifiés comme à risque et définit le cadre dans lequel cette surveillance devait être effectuée : nombre minimal de tests à effectuer sur les animaux de plus de 30 mois morts en ferme ou euthanasiés pour accident ou maladie, i.e., tous les animaux non destinés à la consommation humaine, modalités d'analyse des tissus prélevés, liste des tests validés et informations devant être transmises à la Commission Européenne. Suite à la seconde crise de la vache folle, crise de confiance du consommateur à son apogée en novembre 2000, cette décision, amendée par la décision du 29 novembre 2000, étendit la surveillance active de l'ESB à la totalité des animaux de plus de 30 mois abattus pour la consommation humaine.

Enfin, en mai 2001 la réglementation communautaire fut harmonisée via l'adoption du règlement n° 999/2001 fixant les règles de prévention, de contrôle et d'éradication des EST animales. L'article 6 et l'annexe III A de ce règlement confirment et étendent la liste des bovins soumis au dépistage obligatoire de l'ESB :

- tous les bovins de plus de 30 mois abattus pour la consommation humaine,
- tous les bovins de plus de 30 mois (âge abaissé à 24 mois en août 2002) abattus en urgence et destinés à la consommation humaine,
- un échantillon minimum de bovins de plus de 30 mois (âge abaissé à 24 mois en août 2002) non destinés à la consommation humaine (animaux morts en ferme ou euthanasiés). A partir d'octobre 2003, le dépistage fut étendu à la totalité des animaux de plus de 24 mois de cette catégorie,
- tous les animaux présentant des symptômes nerveux sans limite d'âge.

L'évolution de la réglementation en matière de surveillance de l'ESB et des EST de manière générale, se fit par amendements du règlement 999/2001.

Suite à l'amélioration de la situation de l'Europe vis à vis de l'ESB, démontrant le contrôle de l'épizootie et à la vue des résultats des évaluations de risque, la Commission Européenne autorisa en 2008 certains Etats Membres à réviser leur programme annuel de surveillance. L'âge des animaux au dépistage fut alors relevé à 48 mois quelle que soit leur catégorie, animaux à risque ou abattus pour la consommation humaine.

La réglementation européenne définit les conditions minimales de surveillance des EST mais chaque état membre reste libre d'aller au delà de ce cadre minimum, dès lors que la législation nationale n'entrave pas les échanges communautaires et n'introduit pas de distorsion de concurrence entre les Etats Membres.

1.3.1.2. Les mesures de surveillance en France

Dès juin 1990, l'ESB fut inscrite à la nomenclature des maladies réputées contagieuses. Elle devint, de ce fait, une maladie à déclaration obligatoire soumise à l'application de mesures de police sanitaire (article L223 du Code Rural). Dans la foulée, le réseau national d'épidémiosurveillance de l'ESB (réseau ESB) fut mis en place. Opérationnel dès la fin de l'année 1990, ce réseau de type passif, toujours d'actualité, est basé sur la surveillance clinique des animaux en ferme et à l'abattoir lors de l'inspection ante-mortem. Le réseau ESB s'appuie sur un ensemble de vétérinaires coordinateurs départementaux particulièrement sensibilisés à l'ESB, en charge de relayer et récolter l'information et de confirmer ou infirmer

1.3. Réglementation de l'ESB

les suspicions cliniques portées par les vétérinaires praticiens sur la base de symptômes évocateurs de l'ESB [Savey *et al.* 1991]. Relativement sensible au contexte socio-économique et limité par les possibilités diagnostiques de la maladie, ce système de surveillance s'est révélé peu efficace, avec peu de suspicions d'ESB émises et peu de cas détectés entre sa mise en place et 1999, année faisant suite à une certaine prise de conscience et accompagnée d'une nette augmentation des suspicions (figure 1.10).

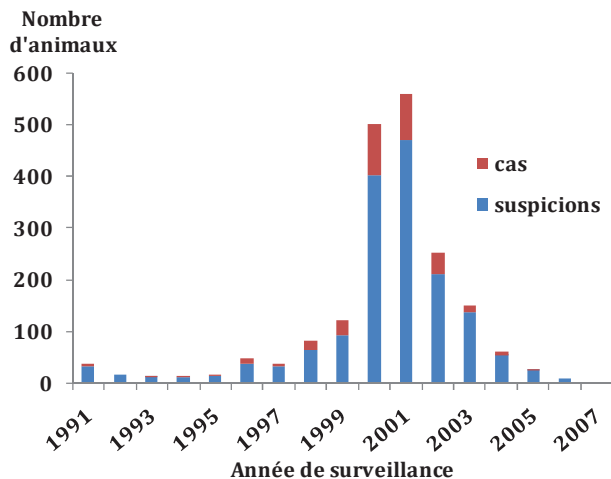


Figure 1.10 - Nombre de suspicions portées et de cas d'ESB détectés annuellement entre 1991 et 2007 dans le cadre du réseau de surveillance clinique de l'ESB.

Le réseau ESB fut complété entre 1998 et 2000 par des mesures de surveillance ciblant certaines populations bovines jugées à risque : bovins sur lesquels une suspicion de rage avait été portée, bovins abattus d'urgence, bovins importés du Portugal et de Suisse et bovins présentant un syndrome de pathologie progressive ou d'amaigrissement [Calavas *et al.* 2004]. En complément, un réseau visant à évaluer l'incidence des maladies à expression neurologique chez les bovins adultes (réseau NBA) fut mis en place en 2000, puis reconduit l'année suivante [Calavas *et al.* 2001]. L'ensemble de ces programmes complémentaires permit de détecter 6 cas d'ESB.

La surveillance de l'ESB ne put réellement être améliorée qu'à partir de 1999, grâce au développement des tests de dépistage rapides utilisables à grande échelle. Après une phase de rodage, un premier « programme pilote Grand Ouest » (PPS ESB) fut mis en place entre juin 2000 et mars 2001. Ce programme permit de détecter 70 cas d'ESB suite au dépistage de quelques 50 000 bovins de plus de 2 ans, considérés comme à risque (animaux morts en ferme, euthanasiés ou abattus d'urgence pour accident) [Calavas *et al.* 2001; Morignat *et al.* 2004]. En complément à ce programme et par décision communautaire, 8 800 bovins à risque échantillonnés dans le reste de la France furent testés dans le cadre du programme national de surveillance de l'ESB (PNS ESB), aboutissant à la détection de 6 cas.

En janvier 2001, en application de la décision communautaire de novembre 2000 (CE 2000/764), un dépistage systématique de tous les bovins de plus de 30 mois abattus pour la consommation humaine fut mis en place. Cependant, l'exhaustivité de ce programme abattoir ne fut assurée qu'à partir de juillet 2001, après que près de 180 000 bovins ont été retirés de la consommation entre janvier et juillet 2001 et détruits sans être testés, et ce, dans le but de soutenir le marché dans un contexte d'effondrement de la consommation de viande bovine. En juillet 2001, l'âge minimum des animaux testés dans le cadre du programme abattoir fut abaissé à 24 mois à titre de précaution, en accord avec la législation européenne (Arrêté du 24 juillet 2001). Suite à une évaluation de risque et à la détection d'un unique cas âgé de moins de 42 mois, l'âge minimal de dépistage des bovins à l'abattoir fut relevé de 24 à 30 mois en juillet 2004, sur avis favorable de l'AFSSA [AFSSA 2003]. A partir de juin 2001, le programme abattoir fut complété par le programme équarrissage institué par décision communautaire pour une durée initiale de un an mais perdurant encore actuellement. Ce programme consiste en un dépistage exhaustif de tous les bovins de plus de 24 mois, morts en ferme ou euthanasiés pour des raisons de maladie ou d'accident [Calavas *et al.* 2002].

L'exhaustivité de la surveillance de l'ESB en France est ainsi assurée depuis le 1^{er} juillet 2001 pour les bovins de plus de 30 mois grâce à la combinaison du réseau ESB et des programmes abattoir et équarrissage. L'ensemble de ces programmes de surveillance a permis la détection de 1017 cas d'ESB dont 20 cas d'ESB atypiques, entre janvier 1990 et septembre 2009 (figure 1.11).

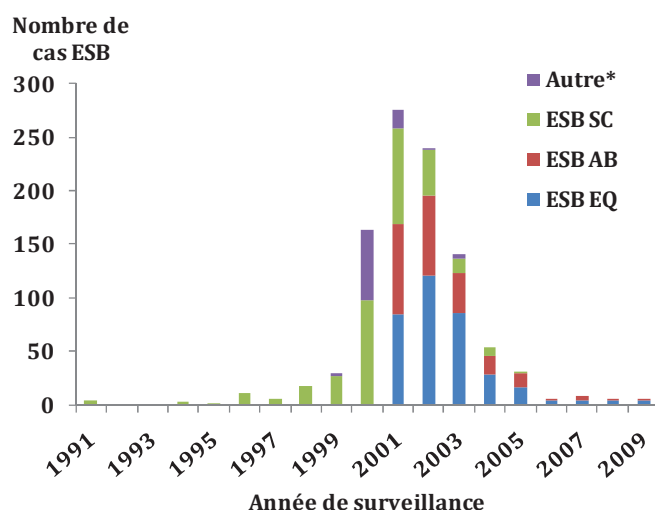


Figure 1.11 - Répartition en fonction du programme de surveillance, du nombre de cas ESB détectés en France entre janvier 1991 et septembre 2009.

*regroupe les programmes PPS ESB, PNS ESB et les programmes complémentaires.
 ESB SC : réseau ESB
 ESB AB : programme abattoir
 ESB EQ : programme équarrissage

Depuis le 1^{er} janvier 2009, sur autorisation communautaire, l'âge minimal des animaux au dépistage a été relevé à 48 mois pour les animaux abattus à des fins de consommation

humaine⁶. Par mesure de précaution, la France a choisi de maintenir à 24 mois l'âge minimal de dépistage des animaux dans le cadre du programme équarrissage.

1.3.2. Mesures de contrôle de l'ESB : réglementation européenne et adaptation au niveau français

Depuis 1989, de nombreuses mesures de précaution et de protection ont été adoptées, modifiées ou abrogées par la Commission Européenne avant que le règlement 999/2001 ne serve de base à l'ensemble de la réglementation. Ce règlement distingue parmi les mesures préventives : les programmes d'éducation, la surveillance de la maladie, les interdictions mises en place au niveau de l'alimentation animale et la gestion des produits dérivés de bovins ou contenant du matériel bovin, en distinguant les matériaux à risque spécifié (MRS). Les mesures de contrôle définissent les déclarations obligatoires et les mesures de police sanitaire à mettre en place suite à l'établissement d'une suspicion ou à la confirmation d'un cas d'ESB. Un chapitre est consacré aux mesures commerciales et distingue le commerce de bovins vivants de celui des produits issus de bovins. Nous revenons ici sur les mesures de contrôle et de police sanitaire ayant eu un impact majeur dans le contrôle de l'épizootie d'ESB.

1.3.2.1. Législation européenne

Restrictions commerciales et embargo

Les mesures commerciales, restriction et embargo, ont été les premières mesures de sauvegarde adoptées par la Commission Européenne et représentaient la moitié des décisions prises par celle-ci entre 1989 et l'adoption du règlement 999/2001. Les restrictions commerciales, interdiction d'exportation de bovins vivants ou produits dérivés, ont essentiellement concerné le Royaume-Uni, le Portugal et l'Irlande, les deux premiers ayant également fait l'objet d'un embargo sur décision européenne. Cependant les FVO, identifiées précocement comme la source de contamination des bovins, ne furent pas l'objet de restrictions commerciales spécifiques au niveau européen. Avec l'harmonisation de la législation européenne, l'amélioration de la surveillance et du diagnostic de l'ESB et l'établissement de règles strictes concernant l'alimentation des animaux de rente et la gestion des produits issus de bovins, les restrictions commerciales ont été progressivement allégées.

⁶ Note de service DGAL/SDSPA/SDAAS/N2008-8321 du 17 décembre 2008

Modification de la fabrication des FVO et interdiction progressive des protéines d'origine animale en alimentation animale

Dès 1988, les FVO furent identifiées comme la source de contamination des bovins et interdites cette même année dans l'alimentation des ruminants au Royaume-Uni. Cependant, la Commission Européenne ne prit une décision à leur encontre qu'en 1994, en interdisant l'utilisation des protéines de mammifères dans l'alimentation des ruminants. Dans le même temps, les normes de fabrication des FVO, encore autorisées dans l'alimentation des animaux monogastriques, furent modifiées en vue d'améliorer l'inactivation du prion.

Suite à la mise en évidence de contaminations croisées entre aliments destinés aux ruminants et aliments destinés aux monogastriques, sous la pression des Etats Membres et dans un contexte de crise sanitaire, la Commission Européenne suspendit l'autorisation de l'utilisation des FVO et des protéines animales dans l'alimentation de tous les animaux destinés à la consommation humaine. Adoptée à titre provisoire en décembre 2000, cette mesure est toujours d'actualité. En effet, des études épidémiologiques menées dans différents pays ont démontré le rôle des contaminations croisées dans l'infection des bovins nés après l'interdiction de l'utilisation des FVO dans l'alimentation des ruminants [Hoinville 1994; Hoinville *et al.* 1995; Denny and Hueston 1997; Wilesmith *et al.* 2000; Heres *et al.* 2007; Jarrige *et al.* 2007; Schwermer and Heim 2007].

Définition et gestion des matériaux à risque spécifiés

Au Royaume-Uni, dès 1989, certaines parties du système nerveux (cerveau, moelle épinière) et un certain nombre d'organes lymphoïdes (rate, thymus, amygdales et intestin) furent identifiés comme hautement infectieux et interdits à la consommation humaine. L'année suivante la Commission Européenne interdit l'exportation de ces matériaux à risque spécifié (MRS) en étendant la liste des organes concernés (tableau 1.1). En juillet 1997, les modalités de traitement ne pouvant garantir la totale inactivation du prion, les MRS, alors réduits au crâne des animaux de plus de 12 mois furent interdits, pour quelque usage que ce soit avec obligation de destruction. L'application de cette mesure fut cependant repoussée par trois fois avant que le texte ne soit abrogé par la décision communautaire de juin 2000, relative à une gestion plus générale des MRS. A partir d'octobre 2000 la destruction des MRS définis en annexe de la décision devint obligatoire. La liste des MRS fut alors régulièrement mise à jour en fonction de l'évolution des connaissances scientifiques (tableau1.2).

Tableau 1.2 - Evolution de la liste des matériaux à risque spécifié dans l'Union Européenne

Décision	Date d'application	Liste des matériaux à risque spécifié
97/534/EC	jamais appliquée	UE* : crâne incluant les yeux et le cerveau, amygdales, moelle épinière des bovins de plus de 12 mois
2000/418/EC	juin 2000	crâne incluant les yeux et le cerveau, amygdales, moelle épinière des bovins de plus de 12 mois RU**, Irlande et Portugal : <u>en plus</u> la tête entière (langue, cerveau, yeux, ganglions trijumeaux, amygdales), thymus, rate, intestin du duodénum au rectum, moelle épinière des animaux de plus de 6 mois et colonne vertébrale entière pour les animaux de plus de 30 mois
2001/02EC	janvier 2001	UE : <u>ajout</u> intestin du duodénum au rectum de tous les bovins RU, Irlande et Portugal : <u>retrait</u> colonne vertébrale pour les animaux de plus de 30 mois
2001/233EC	mars 2001	UE : la colonne vertébrale à l'exclusion de la queue <u>remplace</u> la moelle épinière des animaux de plus de 12 mois
R 999/2001	juillet 2001	UE : crâne incluant les yeux et le cerveau, amygdales, moelle épinière des bovins de plus de 12 mois, intestins du duodénum au rectum de tous les bovins RU, Irlande et Portugal : <u>retour au texte de juin 2000</u>
270/2002	avril 2002	UE : moelle épinière <u>remplacée par</u> colonne vertébrale à l'exclusion de la queue et des processus transverses des vertèbres lombaires des animaux de plus de 12 mois <u>ajout</u> : mésentère de tous les bovins
1139/2003	octobre 2003	UE : <u>exclusion</u> de la mandibule; <u>exclusion</u> des processus transverses thoraciques et des ailes du bassin;
1492/2004	août 2004	UE : <u>exclusion</u> des processus spinaux et transverses cervicaux, thoraciques et lombaires et de la crête sacrale médiale; <u>ajout</u> amygdales pour tous les bovins
1975/2005	janvier 2006	UE : <u>relèvement de l'âge pour la colonne vertébrale</u> : animaux de plus de 24 mois
au 1^{er} mars 2009		UE : crâne à l'exclusion de la mandibule et incluant les yeux et le cerveau, moelle épinière des animaux de plus de 12 mois, colonne vertébrale à l'exclusion des vertèbres caudales, des processus spinaux et transverses cervicaux, lombaires et thoraciques, de la crête sacrale médiale et des ailes du bassin pour les animaux de plus de 24 mois, les amygdales et les intestins du duodénum au rectum et le mésentère de tous les bovins RU, Irlande et Portugal : <u>en plus</u> la tête entière sans la langue (cerveau, yeux, ganglion trijumeaux, amygdales), thymus, rate et moelle épinière des animaux de plus de 6 mois

*UE, Union Européenne ; **RU, Royaume-Uni

Les mesures de police sanitaire

L'harmonisation des mesures de police sanitaire au niveau européen ne débuta qu'à partir de juin 2001. Avant cette date, seuls le Royaume-Uni, le Portugal, l'Irlande et la France avaient soumis leur plan d'éradication de l'ESB à l'approbation de la Commission Européenne. En juin 2001, le règlement 999/2001 instaura des mesures de police sanitaire suite à la confirmation d'un cas dans un troupeau. Outre le confinement du ou des troupeaux identifiés à risque et la

destruction de la carcasse du cas, le règlement imposait l'identification suivit de la destruction :

- de tous les embryons, ovules et descendance collectés ou nés dans les 2 ans précédant les symptômes ou au cours de la période clinique si le cas était une femelle,
- de tous les ruminants du troupeau dans lequel le cas était détenu,
- de tous les animaux appartenant à la même cohorte que les cas (bovins nés dans les 12 mois précédant ou suivant la naissance du cas) dans les troupeaux à risque.

De plus, il était demandé d'identifier la source possible de la maladie ainsi que le(s) troupeau(x) dans le(s)quel(s) l'animal, l'embryon ou l'ovule aurait pu être infecté ou exposé, ainsi que de retracer tous les mouvements de l'aliment possiblement contaminé.

L'innocuité des embryons et ovules ayant été prouvée, ces matériaux furent retirés de la liste des destructions obligatoires en octobre 2003. Cette décision prévoyait également la possibilité de différer la mort de certains animaux (taureaux) et de ne pas pratiquer d'abattage total du troupeau, selon la situation épidémiologique de l'Etat Membre vis à vis de l'ESB et sous condition que la traçabilité des animaux soit établie.

Suite à l'opinion émise par le Scientific Steering Committee⁷ stipulant que l'abattage réduit à la seule cohorte du cas aurait le même effet que l'abattage total du troupeau, la Commission Européenne instaura l'abattage partiel des troupeaux en août 2004. Depuis, seuls les bovins appartenant à la cohorte du cas sont détruits, avec dérogation possible à l'abattage, si preuve est faite que ces animaux n'ont pas eu accès au même aliment que celui du cas. La police sanitaire reste maintenue vis-à-vis de la descendance des cas ESB femelles avec destruction des animaux nés au cours de deux ans précédant le diagnostic ou nés au cours de la phase clinique de la maladie.

1.3.2.2. Les mesures de contrôle mises en place en France

Les mesures de contrôle prises par la France furent dans la lignée de celles mises en place par la Commission Européenne, tout en étant parfois, plus restrictives.

Restriction à l'importation et embargos

Les restrictions commerciales adoptées par la France, essentiellement vis-à-vis du Royaume-Uni, de l'Irlande, du Portugal et de la Suisse, furent souvent plus strictes que celles imposées

⁷ Le Scientific Steering Committee, composé d'experts scientifiques et venant en appui scientifique et technique à la Commission Européenne a été créé en juin 1997 par la Commission elle même http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ojl169_en.html consulté le 23 septembre 2009

par la Commission Européenne. Les restrictions vis-à-vis du Royaume-Uni commencèrent dès 1989, suite à la décision européenne, et ne furent allégées que très récemment avec la levée, en 2006, de l'embargo mis en place sur les bovins vivants et les produits issus de bovins en 1996. Les restrictions commerciales s'étendaient aux bovins vivants, aux produits contenant des tissus de bovins, ainsi qu'à la semence et aux embryons. Un embargo similaire fut décrété en 1998 vis à vis du Portugal, suite à la mise en évidence de manquements à l'application de la législation communautaire.

Mesures concernant l'alimentation animale

Dès 1989, la France interdit l'importation des FVO en provenance du Royaume-Uni en vue de leur usage dans l'alimentation des ruminants, mais l'importation des FVO à destination des espèces monogastriques resta autorisée. Suite à la mise en évidence du rôle des FVO dans la contamination des bovins par l'ESB, les FVO et protéines animales furent interdites dans la fabrication des aliments destinés aux bovins en juillet 1990, à l'exception des protéines de non mammifères (volailles, poissons et animaux marins) et de certaines graisses (octobre 1990). En décembre 1994, l'interdiction fut étendue à tous les ruminants suite à la décision communautaire d'août 1994.

La détection de cas ESB nés après les mesures de 1990 et 1994 (cas NAIFs, nés après l'interdiction des farines) mit en évidence une maîtrise incomplète de la contamination des bovins. En 1996, des mesures de renforcement furent mises en place avec l'exclusion de toute protéine animale de l'alimentation des ruminants sauvages et domestiques, à l'exclusion du lait et des produits laitiers. Parallèlement, en août de la même année, les MRS et les cadavres furent retirés de la fabrication des aliments destinés aux espèces monogastriques.

Enfin, en décembre 2000, sur décision communautaire, l'interdiction de l'incorporation des protéines animales dans l'aliment fut étendue à toutes les espèces animales destinées à la consommation humaine. Décalés de la durée moyenne de la période d'incubation de la maladie, les premiers cas d'ESB super NAIFs, nés après la mesure d'août 1996, ne commencèrent à être détectés qu'à partir d'octobre 2001. Les enquêtes épidémiologiques menées sur ces cas confirmèrent l'existence des contaminations croisées entre aliments destinés aux ruminants et aliments pour monogastriques [Jarrige *et al.* 2007]. L'arrêté de juillet 2006 abrogeant celui de juillet 1990, prévoit ainsi les mesures de prévention des contaminations croisées entre aliments destinés aux animaux d'élevage et aliments des espèces non destinées à l'alimentation humaine.

Gestion des MRS et autres matériaux à risque

Dès février 1990, la France interdit à la consommation humaine les abats identifiés à risque au Royaume-Uni, puis en interdit l'importation elle-même. A partir de l'année suivante, les modalités de transformation des matériaux à risque (FVO et MRS) furent spécifiées. Dès 1994, les FVO et autres matériaux à risque ne satisfaisant pas aux normes françaises furent interdits à l'importation. En 1996, avec de l'avance sur la décision communautaire, la France imposa le retrait et la destruction des MRS, des carcasses et des saisies d'abattoir. Depuis, la liste des MRS ainsi que les procédures utilisables pour la fabrication des FVO sont mises à jour régulièrement en adéquation avec la législation européenne.

Police sanitaire

La police sanitaire française a évolué en fonction des connaissances épidémiologiques et du contexte socio-économique. Relativement peu contraignante à ses débuts, elle s'est durcie au cours du temps avant d'être allégée, passant de l'abattage total des troupeaux à l'abattage partiel, réduit à certaines catégories d'animaux.

L'arrêté ministériel du 3/12/1990 fixait les mesures de police sanitaire relatives à l'ESB. Les mesures prévues distinguaient les suspicions des confirmations d'ESB. En cas de suspicion d'ESB, l'exploitation du bovin suspect était mise sous arrêté portant mise sous surveillance (APMS). Le bovin suspect était alors abattu et prélevé en vue du diagnostic. Si la suspicion était infirmée, l'APMS était levé sinon l'exploitation était mise sous arrêté portant déclaration d'infection (APDI). La carcasse du cas était alors détruite et la totalité des bovins du troupeau marquée. Deux issues étaient prévues pour les animaux :

- conservation des bovins jusqu'à la fin de leur carrière, puis élimination sous couvert d'un laisser passer vers l'abattoir en vue de la commercialisation des carcasses après retrait des MRS ou vente du troupeau au CNEVA (centre national d'études vétérinaires et alimentaires) pour des besoins de recherche. Tout nouveau bovin introduit dans le cheptel devait alors être strictement séparé des bovins marqués au risque d'être marqué à son tour,
- élimination totale subventionnée du cheptel dans un délai de un an avec interdiction d'introduire de nouveaux animaux dans le cheptel tant que l'élimination complète de tous les animaux marqués n'était pas réalisée.

Dans les deux cas, l'APDI n'était levé qu'après l'élimination du dernier bovin marqué. Du fait des contraintes associées à l'APDI, la plupart des cheptels à risque subit un abattage total ou fut vendue au CNEVA.

Suite à l'annonce de la transmissibilité de l'ESB à l'homme, la police sanitaire fut durcie. Le programme d'éradication de l'ESB proposé par la France fut validé par la Commission Européenne en décembre 1996 et l'arrêté correspondant, publié en septembre 1997, imposa :

- la mise sous APMS du cheptel dans lequel la suspicion d'ESB était portée mais également des cheptels auxquels le bovin suspect avait pu appartenir,
- la réalisation d'une enquête épidémiologique afin établir les facteurs possibles de contamination du bovin suspect et de localiser sa descendance,
- la mise sous APDI de l'exploitation du cas lors de la confirmation d'ESB, suivie du marquage des animaux et de l'euthanasie, dans un délai d'un mois, de la totalité du cheptel dans lequel le cas avait été diagnostiqué,
- le maintien sous APMS des exploitations identifiées à risque d'ESB suite aux enquêtes épidémiologiques, avec marquage et destruction du ou des bovins originaires de l'exploitation où le cas avait été détecté.

En 2002, suite à un avis favorable de l'AFSSA, les mesures sanitaires furent allégées. Un abattage sélectif épargnant les bovins nés après le 1^{er} janvier 2002 fut alors mis en place. Quelques mois plus tard, au regard des résultats de surveillance montrant que, lorsque plusieurs cas d'ESB étaient détectés dans un troupeau, ces animaux appartenaient souvent à la même cohorte de naissance que le cas, l'AFSSA émit un avis favorable à l'abattage partiel des troupeaux [AFSSA 2002]. Ainsi, depuis novembre 2002, seuls sont euthanasiés et détruits les bovins appartenant à la même cohorte de naissance que le cas (animaux nés dans les 12 mois suivant ou précédant la naissance du cas), ainsi que les bovins élevés avec le cas au cours de leur première année de vie alors que le cas avait moins de 12 ou 24 mois respectivement dans les exploitations de naissance et d'élevage du cas. Dans ces mêmes exploitations, si le cas ESB est une femelle, les bovins nés de cette femelle dans les 2 ans précédant sa mort ou l'apparition des signes cliniques, ou nés pendant la phase clinique, sont également euthanasiés et les carcasses détruites.

En marge des mesures de protection et de surveillance, la France mit en place une gestion particulière des abattages d'urgence. Les résultats des programmes pilotes de surveillance ayant montré une prévalence plus importante de l'ESB parmi les animaux accidentés, l'abattage d'urgence fut tout d'abord interdit. Les animaux accidentés en ferme ou au cours de leur transport vers l'abattoir devaient alors être euthanasiés et dirigés vers l'équarrissage. Cette mesure a été progressivement assouplie avec autorisation d'abattage des animaux de moins de 24 mois (février 2002), puis de tous les bovins, accidentés depuis moins de 24 heures, sous condition que ces animaux soient dirigés vers un abattoir agréé et accompagné

d'un certificat vétérinaire d'information assurant que l'animal ne présente pas de signes cliniques potentiellement imputables à l'ESB.

1.4. L'épizootie d'ESB en Europe : évolution et état des lieux en forme de conclusion

L'amélioration, au cours du temps, de la surveillance de l'ESB et de la maîtrise des modalités de contamination des bovins ont modelé la courbe épizootique de l'ESB en Europe et au sein de chaque Etat Membre. Les premières mesures de surveillance peu encadrées, pas toujours appliquées et basées uniquement sur la surveillance clinique des animaux, furent relativement inefficaces dans l'évaluation de la progression de l'épizootie en Europe (figure 1.12 et tableau 1.1 page 20).

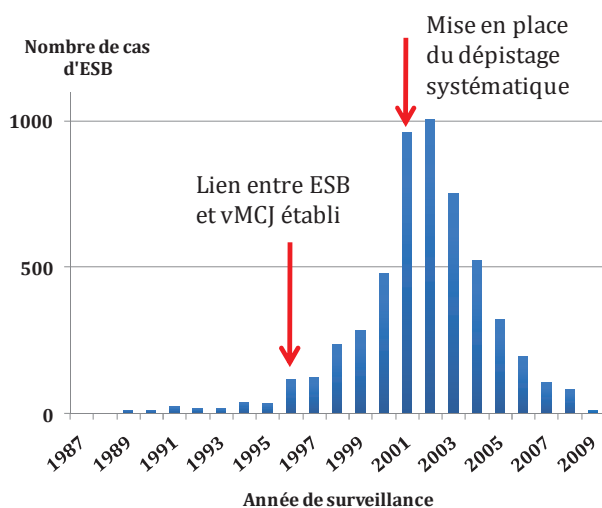


Figure 1.12 - Nombre cas d'ESB détectés en Europe (18 pays) hors Royaume-Uni entre 1987 et septembre 2009.

(Source OIE, consulté le 14 septembre 2009, http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm)

En 2001, la mise en place du dépistage obligatoire des bovins à l'abattoir et à l'équarrissage permet d'avoir une meilleure idée de la taille de l'épizootie dans les pays où la sous-notification des cas cliniques était très importante. Cependant, cette surveillance exhaustive intervint à un moment où, du fait des mesures de contrôle adoptées vis-à-vis de l'alimentation animale et de la gestion du risque ESB, l'épizootie était déjà en déclin dans un certain nombre de pays ayant appliqué précocement ces mesures de contrôle. Ainsi, le Royaume-Uni, premier pays à légiférer pour maîtriser l'ESB, fut également le premier à voir décroître la prévalence de la maladie sur son territoire. Malgré un pic épizootique très élevé (37 280 cas déclarés en 1992), le Royaume-Uni est actuellement au même niveau que la plupart des autres Etats

Membres ayant pourtant été moins touchés par la maladie (tableau 1.1 page 20 et figure 1.13).

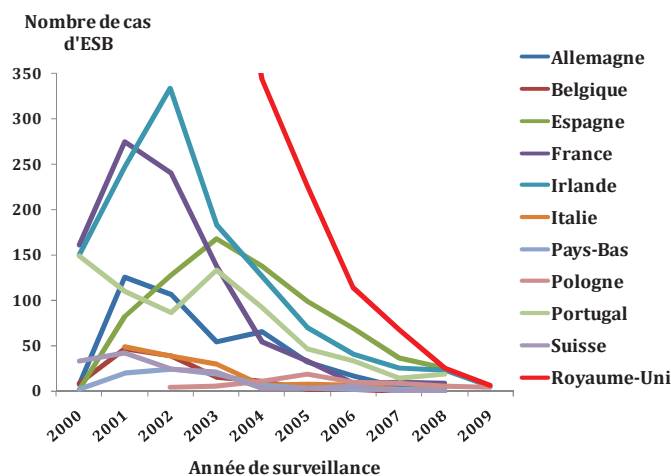


Figure 1.13 - Evolution du nombre de cas d'ESB détectés dans les pays ayant déclaré plus de 50 cas d'ESB depuis 1989.

Pour le Royaume-Uni, seules les années avec moins de 350 sont représentées.

(Source OIE consultée le 14 septembre 2009 http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm).

Avec la décroissance de l'épizootie démontrant la maîtrise du risque ESB dans la plupart des états de l'Union Européenne, face au coût de l'élimination des FVO et au manque à gagner en terme de valorisation des déchets de l'industrie de la viande dans une industrie alimentaire tournant à flux tendu, les parties prenantes font actuellement pression pour un allègement partiel des mesures de contrôle. Cependant, au vu des conséquences d'une perte de la maîtrise de l'exposition des bovins à l'agent de l'ESB, notamment avec la mise en évidence des formes atypiques de la maladie, l'allègement de certaines mesures, notamment de celle de novembre 2000, ne peut être envisagée que sous certaines conditions⁸ :

- la mise au point d'une technique permettant de différencier les protéines animales suite à leur traitement à 133°C/3bars/20min
- une évaluation du risque menée par l'European Food Safety Agency (EFSA) sur la maîtrise de la contamination des bovins par l'ESB afin d'évaluer les conséquences actuelles d'une présence en faible quantité de FVO dans l'alimentation des animaux non-ruminants.

A partir de 2007, les données issues de la surveillance exhaustive de l'ESB et le recul de sept ans dont on disposait depuis la généralisation de l'interdiction des protéines en alimentation animale, ont permis d'envisager une (ré)évaluation de l'évolution de l'épizootie en France et dans certains pays européens, ainsi qu'une (ré)évaluation de l'impact des mesures de contrôle sur l'évolution de l'exposition des bovins à l'ESB.

⁸ TSE road map 2005, http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/roadmap_en.pdf, consulté le 23 septembre 2009

Chapitre 2 – Le modèle Age-Période-Cohorte

Le modèle Age-Période-Cohorte (APC) a été développé comme outil d'interprétation du diagramme de Lexis, initialement créé pour un usage démographique (représentation synthétique des données de mortalité), mais rapidement adapté à l'épidémiologie pour pallier les limites des méthodes de standardisation [Frost 1939]. Le modèle APC permet ainsi d'étudier l'évolution au cours du temps (tendance) d'un phénomène ou d'une mesure, à travers les effets temporels de la cohorte (effet de génération) et de la période d'observation (temps calendaire), ajustés sur l'âge des individus au moment de l'évènement d'intérêt [Yang 2006]. L'objectif de l'analyse APC est de déterminer les contributions respectives des effets de l'âge, de la période et de la cohorte à l'évolution du phénomène étudié [Holford 1983; Kupper *et al.* 1985]. Pour comprendre l'intérêt d'un tel modèle, il est nécessaire d'appréhender des phénomènes sous-jacents aux variables d'ajustement du modèle.

La variable âge représente généralement le temps écoulé entre la naissance de l'individu et l'apparition de l'évènement, et correspond alors à l'âge des individus au moment de l'observation de l'évènement. L'âge peut cependant être généralisé au temps écoulé depuis l'entrée de l'individu dans l'étude. Les phénomènes sous-jacents à l'âge représentent un ensemble de facteurs biologiques, physiologiques (...) qui s'appliquent de la même manière à tous les individus d'un même âge, quelle que soit leur cohorte et la période d'observation. Il est admis que l'âge joue un rôle majeur dans le risque de survenue et l'évolution des maladies, ainsi que dans l'évolution de la plupart des phénomènes socio-économiques. L'âge est ainsi généralement considéré comme une variable incontournable du modèle APC où il est habituellement mesuré en années révolues.

La période d'observation traduit tous les évènements qui sont susceptibles d'affecter simultanément et de la même manière, toutes les cohortes quel que soit l'âge des individus de ces cohortes. Les changements survenant dans les méthodes de diagnostic (variation de la spécificité, de la sensibilité, nouvelle méthode diagnostique..), la mise en place ou l'évolution des plans de dépistage, de même que l'évolution de phénomènes naturels affectant simultanément tous les individus des cohortes quel que soit leur âge, peuvent avoir un impact sur la mesure de l'évènement, dès lors qu'ils en modifient le niveau. Cet impact se traduit alors par un effet période dans le modèle APC.

Enfin, la variable cohorte représente généralement la cohorte de naissance. Elle regroupe alors tous les individus nés dans le même intervalle de temps, dans l'idée que tous les individus d'une même cohorte sont exposés de la même manière au cours du temps, mais que

2.1. Le diagramme de Lexis

toutes les cohortes ne sont pas exposées à un même niveau de risque. La cohorte de naissance regroupe ainsi les effets « date de naissance » et les effets générationnels. La définition de la cohorte peut également être généralisée à tous les individus entrés dans l'étude au même moment. La cohorte traduit ainsi tous les événements qui affectent de la même manière tous les individus d'une même cohorte, indépendamment de l'âge des individus et de la période d'observation.

La particularité des variables âge, période et cohorte est que ces variables sont strictement colinéaires, liées par la relation : $\text{période} = \text{âge} + \text{cohorte}$. Une des variables du modèle est ainsi systématiquement définie à partir des deux autres. Aussi, une étape préliminaire d'organisation des données dans un diagramme de Lexis est nécessaire à la modélisation APC [Carstensen and Keiding 2005]. Une bonne compréhension du diagramme de Lexis et de la catégorisation des données qu'il implique permet d'appréhender les difficultés rencontrées lors de la modélisation APC.

2.1. Le diagramme de Lexis

A la fin du 19^{ème} siècle, des démographes allemands se sont attelés à la conception d'un outil qui leur permettrait de représenter la dynamique de la population et d'établir des tables de mortalité. Cet outil devait permettre de préciser comment les mesures du temps se combinent selon l'âge, la cohorte et la période d'observation. Depuis longtemps, la nécessité d'inclure le moment de l'observation, l'âge des individus et leur date de naissance dans la description des phénomènes démographiques, s'était imposée comme une étape préalable à une exploration plus poussée de la compréhension de ces phénomènes. Le diagramme dit de « Lexis » -du nom de l'un de ses nombreux contributeurs-, initialement créé pour un usage démographique, est devenu, dès le début du 20^{ème} siècle, un outil courant de présentation des données épidémiologiques [Vandeschrick 2001; Carstensen and Keiding 2005].

2.1.1. Construction du diagramme de Lexis

Le diagramme de Lexis se présente sous la forme d'un système d'axes précisant comment se combinent les mesures de l'âge, de la cohorte -généralement cohorte de naissance- et de la période d'observation. L'une des spécificités du diagramme de Lexis est qu'il permet de représenter ces trois dimensions au moyen de deux axes seulement. Ceci est rendu possible par la relation linéaire qui lie les variables du diagramme : $\text{période} = \text{âge} + \text{cohorte}$. Cette relation linéaire est l'une des deux conditions à la réalisation du diagramme. La seconde

condition est que l'une des variables doit être immuable, c'est à dire fixée définitivement, dès l'origine, pour chaque individu [Vandeschrick 2003]. C'est le cas de la date de naissance qui est une valeur fixe et unique pour chaque individu.

Dans la représentation la plus classique du diagramme de Lexis, l'âge est porté en ordonnées et la période d'observation en abscisses. Généralement, la même échelle de mesure du temps est utilisée pour les deux axes. Le diagramme est ainsi composé d'un quadrillage de lignes verticales et horizontales représentant respectivement les coordonnées de la période et de l'âge, auquel se surajoute la cohorte sous forme de diagonales (figure 2.14).

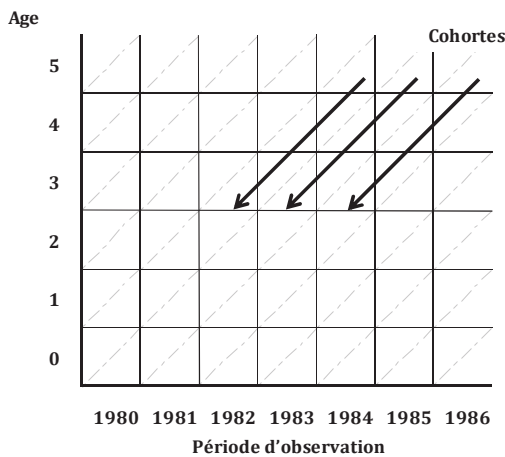


Figure 2.14 - Diagramme de Lexis âge-période.

Dans cette représentation chaque individu se voit attribuer « une ligne de vie » représentant l'évolution de son âge au cours du temps et qui s'interrompt lors de son décès (figure 2.15). L'âge peut être une mesure exacte mais l'âge en années révolues est le plus couramment utilisé.

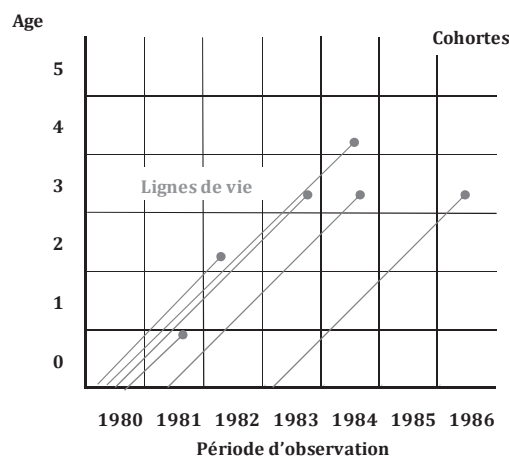
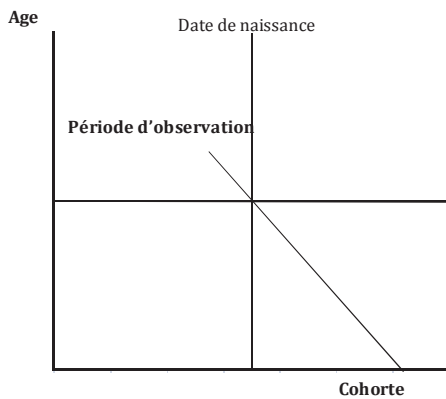


Figure 2.15 - Représentation des individus dans le diagramme de Lexis.

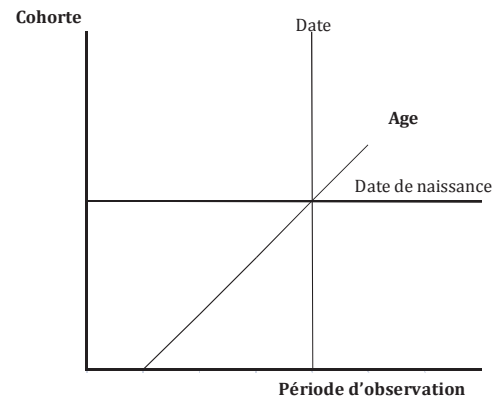
Il existe deux autres versions du diagramme de Lexis selon l'attribution des axes aux variables, les trois versions étant équivalentes :

2.1. Le diagramme de Lexis

- le diagramme avec l'âge en ordonnées et la cohorte en abscisses ; la période se trouve alors sur une diagonale descendante. (figure 2.16a)
- le diagramme avec la cohorte en ordonnées et la période en abscisses ; l'âge est alors sur la diagonale ascendante. (figure 2.16b)



2.16a - Diagramme âge-cohorte



2.16b - Diagramme cohorte-période

Figure 2.16 - Représentations âge-cohorte et cohorte-période du diagramme de Lexis.

L'utilisation du diagramme de Lexis peut être étendue à d'autres variables que l'âge, la cohorte et la période, à partir du moment où une combinaison linéaire de type $Z = aX + bY$ lie ces variables et qu'une des variables est une valeur fixée définitivement pour un individu [Vandeschrick 2003].

2.1.2. Exploitation du diagramme de Lexis : présentation des données, calcul des taux et modélisation

Le diagramme de Lexis a été construit à l'origine pour représenter les taux de mortalité par âge [Carstensen and Keiding 2005]. Il est actuellement très utilisé, notamment en cancérologie, pour déterminer les taux d'incidence par âge et cohorte, ou âge et période, et étudier leur évolution [Drieskens *et al.* 1997; Holford *et al.* 2006; Perez-Farinos *et al.* 2006; Belot *et al.* 2008]. Les calculs préalables et nécessaires à l'obtention de ces taux permettent également de préparer les données en vue d'une exploration plus poussée via la modélisation. L'exploitation du diagramme passe par une organisation des données et le calcul des différents effectifs associés au regroupement des données.

2.1.2.1. Organisation des données

Lors du traitement d'effectifs importants, il est impossible de représenter une ligne de vie par individu, la figure devenant illisible (figure 2.15). Les données doivent alors être réorganisées à l'intérieur d'un diagramme « simplifié » pour être exploitables. Les données sont généralement groupées par âge -en années révolues-, année de naissance et année d'observation. Les intervalles classiquement utilisés pour regrouper les individus sont de 1, 5 et 10 ans. Le regroupement en classes de 5 ans, bon compromis entre précision et concision, est le plus répandu [Carstensen 2007]. On reporte dans le diagramme le nombre d'évènements et l'effectif de population auquel ce nombre d'évènements se rapporte et ce, pour chaque niveau de couple âge-période, âge-cohorte ou cohorte-période.

Lors de ce regroupement, il se produit un phénomène de chevauchement pour la variable déduite des deux autres. Par exemple, lors d'un classement par âge et période d'observation, les individus âgés de quatre ans révolus, -dont l'âge réel est donc compris entre quatre et cinq ans-, et observés au cours de l'année 1980, sont nés en 1975 et 1976. Ce phénomène se comprend bien lorsque l'on considère les différentes combinaisons qu'offre le diagramme de Lexis (figure 2.17).

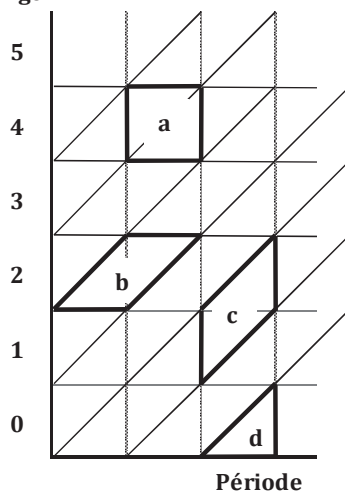
(a) Classement par âge et période. La cellule **a** correspond à

- un groupe d'âge
- une période
- deux cohortes

(b) Classement par âge et cohorte. La cellule **b** correspond à

- une cohorte
- un groupe d'âge
- deux périodes

Age



(c) Classement par période et cohorte. La cellule **c** correspond à

- deux groupes d'âge
- une cohorte
- une période

(d) Diagramme de Lexis en triangles

Certains auteurs ont proposé de pallier le chevauchement des cohortes en séparant en triangles les carrés précédemment obtenus. Ainsi la cellule **d** correspond à

- une seule cohorte
- une demi-année
- un demi-groupe d'âge

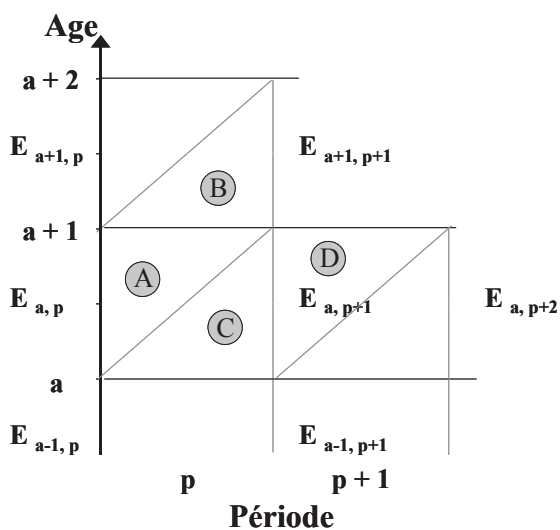
Figure 2.17 - Les différentes combinaisons des variables dans le diagramme de Lexis.

2.1.2.2. Calcul des taux à partir du diagramme

Avec différentes possibilités de combinaison des données, différents taux d'une même mesure (taux de mortalité, taux d'incidence...) peuvent être calculés à partir du diagramme de Lexis. Le choix de la combinaison des variables pour ce calcul dépend de l'objectif de l'étude et éventuellement de la nature des données disponibles, aucune combinaison n'étant dans l'absolu préférable à une autre.

Le taux d'incidence est obtenu à partir du calcul du nombre de personnes présentant l'événement dans la cellule divisé par le nombre de personnes-années à risque de présenter l'événement dans la même cellule (double référence au nombre de personnes et à une unité de temps). Le calcul classique du nombre de personnes-années à risque dans chaque cellule, établi sur la moyenne des personnes présentes au début et à la fin de l'intervalle de temps considéré, a été revu par Carstensen [Carstensen 2007] qui jugeait ce calcul inexact. En se basant sur le diagramme en triangles, Carstensen a apporté une correction à la formule pour le calcul du nombre des personnes-année à risque dans les triangles A et B (figure 2.18) en posant les hypothèses suivantes :

- la variation du nombre de personnes à risque entre deux périodes est uniquement due aux décès,
- le nombre de décès entre le début de la période p à l'âge a et le début de la période $p+1$ à l'âge $a+1$ est égal à $(E_{a,p} - E_{a+1,p+1})$ et est réparti équitablement entre les triangles A et B,
- la mortalité est uniformément répartie à l'intérieur des triangles A et B,
- les individus décédés en A ne contribuent plus en B.



$E_{a-1,p}$ effectif d'âge **a-1** au début de la période **p**
 $E_{a,p}$ effectif d'âge **a** au début de la période **p**
 $E_{a+1,p}$ effectif d'âge **a+1** au début de la période **p**
 $E_{a-1,p+1}$ effectif d'âge **a-1** au début de la période **p+1**
 $E_{a,p+1}$ effectif d'âge **a** au début de la période **p+1**
 $E_{a+1,p+1}$ effectif d'âge **a+1** au début de la période **p+1**
 $E_{a,p+2}$ effectif d'âge **a** au début de la période **p+2**

Figure 2.18 - Effectifs dans les différentes cellules du diagramme de Lexis.

Carstensen a ainsi déterminé le nombre de personnes-années à prendre en compte pour le calcul des taux dans les triangles A et B :

- personnes-années contribuant au risque dans le triangle A = $\frac{1}{3}E_{a,p} + \frac{1}{6}E_{a+1,p+1}$
- personnes-années contribuant au risque dans le triangle B = $\frac{1}{6}E_{a,p} + \frac{1}{3}E_{a+1,p+1}$

Par extrapolation et combinaison des triangles, on obtient le nombre de personnes-années à risque pour tous les cas de figure (tableau 2.3).

Tableau 2.3 - Calcul du nombre de personnes-années à risque dans les cellules du diagramme de Lexis.

D'après Carstensen [Carstensen 2007]

Cellule concernée	Formule classique	Formule proposée par Carstensen
A+C	$\frac{1}{2}(E_{a,p} + E_{a,p+1})$	$\frac{1}{3}E_{a,p} + \frac{1}{6}E_{a+1,p+1} + \frac{1}{6}E_{a-1,p} + \frac{1}{3}E_{a,p+1}$
A+B	$\frac{1}{2}(E_{a,p} + E_{a+1,p+1})$	$\frac{1}{2}(E_{a,p} + E_{a+1,p+1})$
C+D	$(E_{a,p+1})$	$\frac{1}{6}E_{a-1,p} + \frac{2}{3}E_{a,p+1} + \frac{1}{3}E_{a,p+1} + \frac{1}{6}E_{a+1,p+2}$
Triangle A		$\frac{1}{3}E_{a,p} + \frac{1}{6}E_{a+1,p+1}$
Triangle B		$\frac{1}{6}E_{a,p} + \frac{1}{3}E_{a+1,p+1}$

2.1.2.3. Calcul de la moyenne dans les cellules

Lors d'une répartition par âge-cohorte, âge-période ou période-cohorte, la moyenne de l'âge, de la période et de la cohorte dans chaque cellule correspond à la moyenne mathématique, la moyenne de la troisième variable étant déduite de la relation : période = âge + cohorte.

Ce calcul des moyennes est modifié lors d'une répartition en triangles. Carstensen [Carstensen and Keiding 2005] démontre que cette moyenne est décentrée de $\frac{1}{3}$ par rapport aux intervalles de tabulation (figure 2.19).

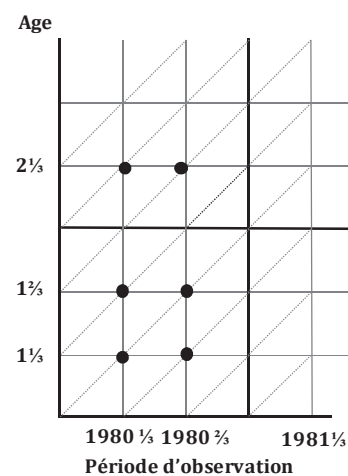


Figure 2.19 - Moyenne lors d'une répartition des données en triangles.

[Carstensen and Keiding 2005]

2.2. Le modèle âge-période-cohorte

Le modèle APC a été développé pour l'analyse du diagramme de Lexis synthétique (données regroupées)[Carstensen and Keiding 2005; Carstensen 2007]. En épidémiologie, l'objectif de la modélisation APC est d'estimer les effets respectifs de l'âge, la cohorte et la période sur l'évolution de la variable d'intérêt, généralement l'incidence ou la prévalence d'une maladie.

2.2.1. Les graphiques préalables à l'analyse

Le modèle APC est devenu d'utilisation courante en épidémiologie suite aux travaux de Frost sur la tuberculose [Frost 1939]. Une approche graphique était utilisée pour la description des taux en fonction des variables et l'effet des variables âge, cohorte et période était estimé visuellement. Malgré le développement d'outils performants pour l'analyse, il est toujours conseillé, préalablement à l'analyse, de passer par une phase graphique descriptive [Robertson and Boyle 1998; Carstensen 2007]. L'exploration des graphiques permet de s'assurer de la pertinence de l'hypothèse d'additivité des effets des variables après changement d'échelle, et d'évaluer la présence d'interactions entre les variables du modèle (cf. partie 2.2.4)[Kupper *et al.* 1985]. De nombreux graphiques peuvent être utilisés [Robertson and Boyle 1998]. Parmi les graphiques simples à mettre en œuvre, les graphiques à deux dimensions, en lignes, décrivant l'évolution des différents taux bruts sont les plus courants (figure 2.20).

Dans ce genre de représentation, le parallélisme des courbes indique que l'hypothèse d'additivité des effets des variables, après transformation de la variable réponse, est correcte. Dans le cas de la figure 2.20, la transformation logarithmique semble adaptée, les irrégularités des courbes étant dues à la faible prévalence observée dans certains groupes d'âge et certaines cohortes. A contrario, une perte de parallélisme aurait indiqué l'existence d'interaction entre les variables représentées sur le graphique.

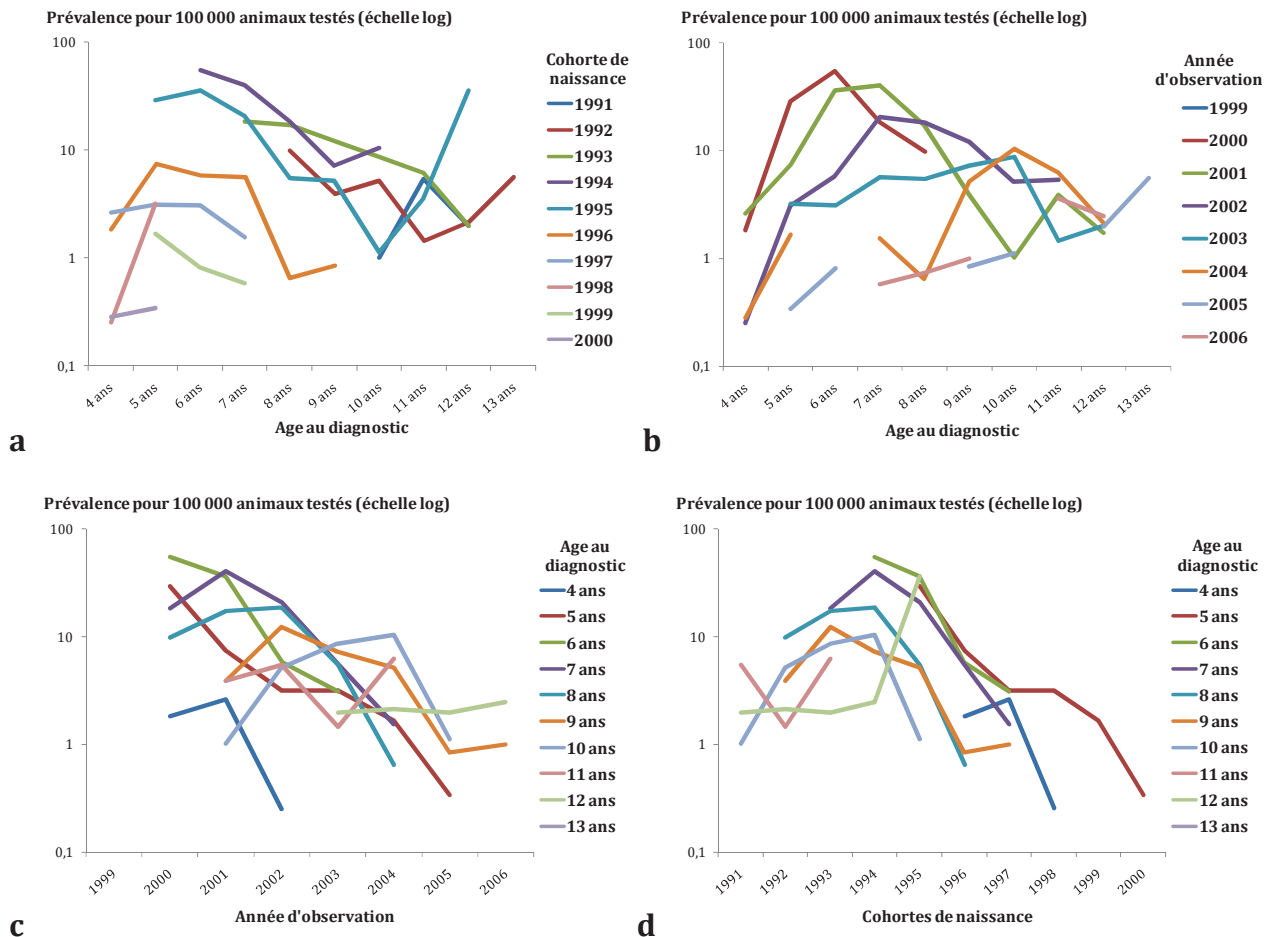


Figure 2.20 - Taux spécifiques bruts d’ESB par âge, cohorte et période observés en France pour la période d’observation 2001-2006.

a - Taux spécifique par âge et cohorte ; **b** - Taux spécifique par âge et période
c - Taux spécifique par période et par âge ; **d** - Taux spécifique par cohorte et par âge

2.2.2. Formulations du modèle âge-période-cohorte

La régression linéaire :

$$\Lambda = X\beta + E \tag{2.1}$$

avec Λ le vecteur de la variable réponse de dimension n , X la matrice de dimension $k \times n$ représentant les k covariables, β le vecteur de paramètres de dimension k et E le vecteur des résidus d’espérance nulle, si elle est appropriée aux variables continues, ne permet pas de prendre en compte les effets non linéaires de ces dernières. De plus, elle se révèle inadaptée aux nombreux cas où la relation entre la réponse et les variables ne peut se résumer à une droite [McCullagh and Nelder 1999].

Les transformations de variables des modèles linéaires généralisés (GLM), notamment les transformations logarithmique et logistique, habituellement utilisées en épidémiologie, améliorent généralement la qualité de l’ajustement des données en autorisant une certaine

flexibilité des effets, mais demeurent très insuffisantes dans de nombreuses situations. L'utilisation de l'analyse catégorielle ou de fonctions continues pour modéliser la forme des effets des covariables permet de pallier le manque de souplesse des GLM [Heuer 1997; Carstensen 2007].

2.2.2.1. Formulation classique du modèle APC

Le modèle APC dit « classique » est formulé pour des variables catégorielles et des données tabulées en rectangles dans le diagramme de Lexis âge-période. Les effets de l'âge, la période et la cohorte (cohorte = période - âge) sont estimés grâce au GLM :

$$l(\lambda_{ijk}) = \mu + \sum_i^I \alpha_i a_i + \sum_j^J \beta_j p_j + \sum_k^K \gamma_k c_k + \varepsilon_{ijk} \quad (2.2)$$

où l une fonction de la réponse λ , a_i ($i=1\dots I$), p_j ($j = 1\dots J$) et c_k ($k= I-i+j$) les variables muettes respectivement pour l'âge, la période et la cohorte, α_i , β_j et γ_k les effets pour le groupe d'âge i , de période j et de cohorte k , μ la moyenne de λ et ε_{ijk} l'erreur aléatoire (résidus) d'espérance nulle.

En ajustant un paramètre par niveau de covariable, ce modèle permet de prendre en compte les effets non linéaires des covariables et ne requiert pas *d'a priori* sur la forme de ces effets.

L'emploi de variables catégorielles dans le modèle APC classique était imposé, lors des premières utilisations, par la limite de la méthodologie statistique de l'époque et par la nécessité de prendre en compte les effets non linéaires des variables âge, période et cohorte. A l'instar d'une fonction en escalier, la catégorisation des variables permet d'ajuster les effets par palier, l'effet de chaque variable étant constant au sein d'un même niveau.

Cependant, de nombreuses critiques ont été formulées à propos du modèle catégoriel, celui-ci n'étant pas considéré comme le plus approprié pour prendre en compte les variables continues que sont l'âge, la période et la cohorte. D'une part, le regroupement des données continues en catégories entraîne une perte d'information [Greenland 1995; Greenland 1995; Boucher *et al.* 1998; Royston *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Harrel 2008]. D'autre part, le modèle catégoriel est basé sur l'hypothèse d'un effet des variables constant et homogène au sein de chaque catégorie et ignore ainsi l'information contenue au sein des intervalles de regroupement [Greenland 1995; Carstensen and Keiding 2005]. Enfin, le modèle catégoriel, en utilisant un paramètre par niveau de variable, est sensible à la catégorisation des données, souvent arbitraire, et qui, à l'extrême, guide les résultats du modèle [Greenland 1995; Carstensen 2007].

Le problème réside alors dans le choix adéquat de la largeur et du nombre de catégories à utiliser pour regrouper les données. Parmi les nombreuses méthodes proposées, aucune n'est optimale, que ce soit la méthode des percentiles ou la recherche de points optimaux (« optimal cut point ») à partir de la structure des données [Altman 1994; Greenland 1995]. Ces méthodes conduisent soit à des biais, soit ne sont pas adaptées dès lors que la répartition de l'événement d'intérêt n'est pas homogène au sein du jeu de données [Altman 1994; Greenland 1995; Royston *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Harrel 2008].

Idéalement, la catégorisation des données devrait être suffisamment fine pour limiter son influence sur le modèle et ainsi limiter la subjectivité de l'analyse. Cependant l'augmentation du nombre de catégories conduit à une augmentation du nombre de paramètres à estimer de sorte que, rapidement, le modèle ne peut plus être ajusté correctement [Carstensen 2007].

Ce problème a conduit à se tourner vers des fonctions continues flexibles pour modéliser les effets non linéaires des variables continues.

2.2.2.2. Formulation générale

La formulation générale du modèle APC :

$$l(\lambda(a, p, c)) = f(a) + g(p) + h(c) \quad (2.3)$$

avec l une fonction de la réponse λ , f , g et h des fonctions non déterminées de l'âge, de la période et de la cohorte où a , c et p sont les moyennes de l'âge, de la période et de la cohorte dans chaque unité d'observation, permet d'utiliser des fonctions pour la forme des effets des variables âge (A), période (P) et cohorte ($C = P - A$) et autorise un effet non linéaire des variables. Elle permet de formuler les variables en continu et de prédire le taux en chaque point du diagramme, le taux étant alors présumé constant dans chaque sous partie du diagramme.

2.2.2.3. Les fonctions f , g et h

La prise en compte des variables continues est un problème ancien en modélisation qui a fait, et fait toujours, l'objet de nombreuses publications et développements méthodologiques [Durrleman and Simon 1989; Greenland 1995; Royston 2000]. Les solutions proposées à la modélisation des effets non linéaires des variables continues se répartissent en méthodes paramétriques et non paramétriques selon que leurs solutions sont accessibles, ou non, au calcul analytique.

Elles sont plus ou moins complexes en fonction du problème posé, mais visent toutes à déterminer une forme pour la fonction $F(x)$ du GLM :

$$l(\lambda) = F(x) + E \quad (2.4)$$

Nous détaillons ci après les fonctions paramétriques et non paramétriques applicables à la description des effets de l'âge, de la période et de la cohorte dans le cadre de l'étude de l'ESB.

Les polynômes et la régression polynomiale

Les polynômes et les combinaisons simples de polynômes ont été précocement utilisés dans les modèles linéaires, du fait de leur facilité d'emploi (paramètres du modèle aisément accessibles au calcul) et de leur flexibilité autorisant des effets non linéaires des variables [Armitage and Berry 1987; Green and Silverman 2000].

La fonction $F(x)$ de l'équation (2.4) est alors est un polynôme de degré m :

$$F(x) = \beta_1 x^1 + \beta_2 x^2 + \dots + \beta_m x^m \quad (2.5)$$

En régression linéaire, l'emploi des polynômes reste cependant limité du fait de leur instabilité à des degrés élevés (supérieur à cinq) et de leur très grande sensibilité aux données, quelques données suffisant à faire basculer la courbe. En pratique il est ainsi recommandé de n'utiliser, au maximum, que des polynômes de degré trois, voire quatre, ce qui réduit considérablement la flexibilité de la courbe polynomiale et son ajustement aux données.

Les polynômes fractionnels

Les polynômes fractionnels (PF) ont été proposés par Royston et Altman [Royston and Altman 1994] lorsqu'un effet non linéaire des variables est soupçonné et comme une alternative à la catégorisation des données continues, à l'utilisation des polynômes ou à l'utilisation de méthodes plus complexes. Royston et Altman proposent d'examiner l'addition de puissances fractionnelles et réciproques x^{-2} , x^{-1} , $x^{-1/2}$ et $x^{1/2}$ aux termes polynomiaux x et x^2 habituellement ajoutés en régression linéaire polynomiale.

En régression univariée, ils définissent, pour toute variable positive x , la fonction polynôme fractionnel de degré $m > 0$, à m termes :

$$F(x) = PF(p_1, \dots, p_m) = \beta_1 x^{p_1} + \beta_2 x^{p_2} + \dots + \beta_m x^{p_m} \quad (2.6)$$

la constante étant exclue et avec par convention :

$$\left\{ \begin{array}{l} x^0 = \log(x) \\ p_1, \dots, p_m, (p_1 \leq \dots \leq p_m) \in S = \{-2; -1; -0,5; 0; 0,5; 1; 2; 3\} \end{array} \right.$$

Ils proposent de réduire l'ensemble des fonctions à considérer aux fonctions polynôme fractionnel de degré $m=1$ (PF1) et $m=2$ (PF2) :

$$PF1 = \beta_1 x^{p_1} \quad (2.7)$$

$$PF2(x) = \begin{cases} \beta_1 x^{p_1} + \beta_2 x^{p_2}, & p_1 \neq p_2 \\ \beta_1 x^{p_1} + \beta_2 x^{p_2} \ln(x), & p_1 = p_2 \end{cases} \quad (2.8)$$

Royston et Altman estiment que, malgré la restriction de l'ensemble S , les fonctions PF offrent une grande flexibilité pour l'ajustement des données, et que les fonctions PF1 et PF2 sont généralement suffisantes pour modéliser la plupart des courbes en épidémiologie. L'ajustement du modèle se fait par la méthode du maximum de vraisemblance. En modèle univarié, la procédure de sélection du meilleur modèle consiste à ajuster tous les modèles correspondant aux différentes combinaisons de p_m (8 modèles pour une fonction PF1 et 36 pour une fonction PF2) et de les comparer au modèle linéaire ($p=1$). Le modèle considéré comme le meilleur est celui qui a la plus grande différence de déviance avec le modèle linéaire. La non-linéarité de l'effet de la variable est alors testée en comparant la différence de déviance entre le meilleur modèle avec la fonction PF($p \neq 1$) et la régression linéaire ($p=1$) au moyen d'un test du chi-deux à un degré de liberté (ddl). La p-value est calculée au risque $\alpha=5\%$. Si le test n'est pas significatif, le modèle linéaire est accepté, sinon le modèle avec la fonction PF est considéré comme meilleur et l'effet de la variable comme non-linéaire [Royston *et al.* 1999]. Dans ce procédé, si aucune fonction PF1 n'ajuste correctement les données, on passe à une régression avec une fonction PF2, la sélection du meilleur modèle se faisant de la même manière que précédemment [Royston *et al.* 1999]. Lors de la comparaison de modèles intégrant des fonctions polynômes fractionnel de degré différent (FP1 et FP2) le critère d'Akaiké (AIC) est utilisé pour la sélection du meilleur modèle [Royston *et al.* 1999]. En régression multivariée, la sélection des modèles est différente. Une procédure de sélection descendante des variables à inclure dans le modèle final est combinée à un algorithme

adaptatif qui sélectionne la meilleure transformation PF pour chaque variable incluse [Sauerbrei *et al.* 2006].

Cependant, si l'utilisation des fonctions PF est simple et permet la détection et la prise en compte des effets non linéaires des variables continues en régression, ce type de modèle présente quelques inconvénients. D'une part, la variable x n'est pas autorisée à être négative ou égale à 0, si des puissances fractionnelles ou une transformation logarithmique sont utilisées. Une transformation préalable par ajout d'une valeur positive a été proposée comme alternative à ce problème [Royston and Sauerbrei 2007]. Enfin, comme toutes les régressions de type polynomial, le modèle est susceptible de mal ajuster les données par manque de flexibilité et l'estimation aux extrémités de la distribution peut être mauvaise ou inappropriée [Royston *et al.* 1999].

Il faut alors se tourner vers les splines de régression polynomiaux ou les modèles de régressions non-paramétriques.

Les splines de régression

Les splines de régression sont des fonctions paramétriques dont l'ajustement est basé sur la maximisation de la vraisemblance ou de la quasi vraisemblance et qui correspondent à des fonctions constituées de morceaux de polynômes se raccordant au niveau de points appelés nœuds. Le nombre de nœuds permet ainsi de contrôler la flexibilité des fonctions [Green and Silverman 2000].

Soit un intervalle $[t_0; t_{k+1}]$, $k+1$ subdivisions de $[t_0; t_{k+1}]$ définies par k points t_1, \dots, t_k , appelés nœuds avec $t_0 < t_1 < \dots < t_{k+1}$. On appelle spline polynomiale d'ordre m (ou de degré $m-1$) ayant pour nœuds les points t_1, \dots, t_k toute fonction F de $[t_0; t_{k+1}]$ dans \mathbb{R} telle que :

- F est un polynôme de degré inférieur ou égal à $m-1$ dans chaque sous intervalle $[t_0; t_1], \dots, [t_k; t_{k+1}]$,
- F est dérivable jusqu'à l'ordre $m-2$ (si $m \geq 2$), cette condition de dérivabilité assurant une continuité de la fonction au niveau des nœuds.

Cet ensemble de fonctions, noté $S_m(t_1, \dots, t_k)$ et contenant l'ensemble des polynômes de degré inférieur ou égal à $m-1$, est un sous espace vectoriel de dimension $m+k$ des fonctions dérivables jusqu'à l'ordre $m-2$.

Une base intéressante de cet espace est la base de fonctions de puissance tronquée (TP) qui permet d'écrire, en utilisant $(u)_+^m = \begin{cases} u^m, & \text{si } u > 0 \\ 0, & \text{sinon} \end{cases}$, la fonction TP-spline F d'une variable x de la manière suivante [Durrleman and Simon 1989] :

$$F(x) = \sum_{j=0}^{m-1} \beta_{0j} x^{j-1} + \sum_{i=1}^k \beta_i (x - z_i)_+^{m-1} \quad (2.9)$$

L'inconvénient des TP-splines est que les fonctions de base peuvent être très corrélées si le nombre de nœuds est important ou si les nœuds sont proches les uns des autres [Heuer 1997]. L'alternative est l'utilisation de fonctions B-spline d'ordre m, plus stables, comportant k nœuds et définies par :

$$F(x) = \sum_{i=-(m-1)}^k v_i \beta_{i,m}(x) \quad (2.10)$$

avec $\beta_{i,m}(x)$ le vecteur des fonctions B-spline de base et v_i le vecteur des coefficients correspondants. Les fonctions B-spline sont des combinaisons linéaires des m+k fonctions B-spline de base définies de manière récursive par [Heuer 1997] :

$$B_{i,m}(t) = \frac{t-t_i}{t_{i+m-1}-t_i} B_{i,m-1}(t) + \frac{t_{i+m}-t}{t_{i+m}-t_{i+1}} B_{i+1,m-1}(t) \quad (2.11)$$

avec $i = -(m-1), \dots, k$ et les valeurs de départ $B_{j,1}(t) = \begin{cases} 1, & t \in [t_j, t_{j+1}] \\ 0, & \text{sinon} \end{cases}$

pour $j = -(m-1), \dots, k+m-2$ et $B_{k+m-2,1}(t) = \begin{cases} 1, & t \in [t_{k+m-1}, t_{k+m}] \\ 0, & \text{sinon} \end{cases}$

On définit ainsi une spline linéaire d'ordre 2 (de degré 1) comme un ensemble de fonctions linéaires par morceaux. La courbe obtenue est continue mais présente des ruptures de pente au niveau des nœuds. Une spline plus lisse que la spline linéaire, c'est à dire sans rupture de pente, est la spline quadratique correspondant à un ensemble de polynômes de degré 2 sur chaque sous intervalle. D'une manière générale, on augmente le lissage de la courbe en augmentant l'ordre du spline. Les splines les plus utilisées sont les splines cubiques d'ordre quatre.

Cependant, de même que les polynômes d'ordre élevé, les splines de degré supérieurs à 2 peuvent être instables et très influencées par les données aux extrémités de la distribution. Une solution consiste à forcer les dérivées de la fonction à être nulles sur les intervalles extrêmes $[t_0; t_1]$ et $[t_k; t_{k+1}]$, la spline étant alors linéaire sur ces intervalles. De telles splines sont appelées splines naturelles ou encore splines restreintes. Les splines cubiques naturelles

ont une place privilégiée en régression car elles offrent une grande flexibilité pour l'ajustement des données, tout en restant parcimonieuses quant au nombre de paramètres à estimer par rapport à des splines d'ordre supérieur [Durrleman and Simon 1989; Heuer 1997; Royston 2000; Carstensen and Keiding 2005; Carstensen 2007].

L'inconvénient majeur des splines de régression est la nécessité de choisir la place et le nombre des nœuds. De nombreux auteurs ont souligné l'attention qu'il fallait porter à ce choix [Durrleman and Simon 1989; Heuer 1997]. En effet, le nombre et la place des nœuds influencent les paramètres du modèle et doivent être fixés, dans la mesure du possible, indépendamment des données. Les méthodes automatiques de placement, méthode des quartiles, placement à intervalles réguliers d'un certain nombre de nœuds sont arbitraires et peu satisfaisantes. Des méthodes d'optimisation du placement des nœuds ont été développées pour ajuster au mieux le nombre et la place des nœuds [Osborne *et al.* 1998; Molinari *et al.* 2004; Leitenstorfer and Tutz 2007]. Cependant l'idéal est de disposer d'hypothèses permettant de placer un certain nombre de nœuds à des endroits où l'on attend une inflexion de la courbe [Heuer 1997].

Pour pallier le problème du choix des nœuds, des méthodes non-paramétriques ont été développées au travers de splines de lissage.

Les splines de lissage

Soient (x_i, Y_i) , i ($i= 1, \dots, n$) observations distinctes dans un intervalle $[a ; b]$, un entier $m \leq n$ et un réel $\lambda > 0$, il existe une fonction \hat{F} estimateur de F appelée spline de lissage qui minimise la quantité suivante :

$$\sum_{i=1}^n \{Y_i - \hat{F}(t_i)\}^2 + \lambda \int_a^b \{\hat{F}^m(x)^2\} dx \quad (2.12)$$

où $\sum_{i=1}^n \{Y_i - \hat{F}(t_i)\}^2$ est la somme des carrés des résidus entre les valeurs observées et celles prédites par la fonction \hat{F} , λ le paramètre de lissage, $\hat{F}^m(x)$ la dérivée $m^{\text{ème}}$ de la fonction \hat{F} et $\int_a^b \{\hat{F}^m(x)^2\} dx$ la fonction de pénalisation qui mesure l'irrégularité de la fonction \hat{F} [Hastie and Tibshirani 1990; Green and Silverman 2000]. La fonction \hat{F} qui minimise la quantité (2.12) est une spline polynomiale naturelle d'ordre $2m$.

Lors de l'ajustement d'une spline de lissage il s'agit de trouver un compromis entre le meilleur ajustement mesuré par le terme $\sum_{i=1}^n \{Y_i - \hat{F}(t_i)\}^2$ et l'irrégularité de la fonction. Le rôle du paramètre λ est d'établir ce compromis. Les grandes valeurs λ ont pour effet de lisser la

fonction \hat{F} : quand $\lambda \rightarrow +\infty$ la courbe est une ligne droite et à l'inverse, quand $\lambda = 0$ la courbe est sur-ajustée.

Tout le problème de l'ajustement d'une spline de régression est contenu dans la détermination du paramètre de lissage λ . Le choix de ce paramètre peut se faire en explorant plusieurs valeurs ou, de manière plus commune, par une procédure « automatique » qui choisit le paramètre en fonction des données [Green and Silverman 2000]. Les procédures de sélection automatique les plus répandues sont la validation croisée et la validation croisée généralisée [Wahba 1990; Green and Silverman 2000].

2.2.2.4. Retour sur le modèle général

Lors de l'inclusion de fonctions non-linéaires dans un modèle APC généralisé (GLM), toutes les fonctions f , g et h n'ont pas obligation d'être non-linéaires et l'intégration de variables discrètes reste possible.

2.2.3. Estimation des effets d'âge, de période et de cohorte

2.2.3.1. Le problème d'identification du modèle APC

Le problème central du modèle APC vient du fait que le modèle complet incluant simultanément l'âge, la période et la cohorte n'est pas identifiable. Il n'existe pas de solution unique à l'estimation de l'ensemble des paramètres de l'équation linéaire (2.2). Il est alors impossible d'identifier les effets propres de chaque variable lors d'une régression linéaire.

Ce problème de non-identification du modèle APC est connu depuis très longtemps et provient de la colinéarité exacte des variables du modèle : période = âge + cohorte.

Les contraintes usuelles $\alpha_i = \beta_j = \gamma_k = 0$ ou $\sum_{i=1}^I \alpha_i + \sum_{j=1}^J \beta_j + \sum_k^{I-i+j} \gamma_k = 0$ que l'on impose aux paramètres de l'équation (2.2) ne sont pas suffisantes pour rendre le modèle identifiable [Kupper *et al.* 1985; Heuer 1997]. Malgré cette reparamétrisation du modèle, l'estimateur des paramètres du modèle demeure sans solution unique.

En effet, si l'on considère le modèle (2.2) reparamétré et écrit sous la forme matricielle :

$$l(\Lambda) = Xb + E \tag{2.13}$$

avec Λ le vecteur de la variable expliquée, X la matrice colonne des variables muettes de dimension $(1 + (I-1) + (J-1) + (I+J-2))$, b la transposée de la matrice des paramètres $b = (\mu, \alpha_1, \dots, \alpha_{i-1}, \beta_1, \dots, \beta_{j-1}, \gamma_1, \dots, \gamma_{i+j-2})^T$ et E le vecteur de l'erreur aléatoire. L'estimateur des moindres

carrés ordinaires de la matrice de régression (2.13) est la solution b des équations normales définies par :

$$\hat{b} = (X^T X)^{-1} X^T \Lambda \quad (2.14)$$

La matrice X étant singulière, du fait de l'exacte colinéarité des variables A, P et C, $(X^T X)^{-1}$ n'existe pas et un tel estimateur ne présente pas de solution unique [Rodgers 1982; Kupper *et al.* 1985]. Une des possibilités pour résoudre ce problème est d'ajouter au moins une contrainte supplémentaire aux paramètres du modèle. Il a été démontré que l'ajout d'une seule contrainte (contrainte minimale), telle $\alpha_i = \alpha_{i+1}$ ou $\beta_j = \beta_{j+1}$ ou $\gamma_k = \gamma_{k+1}$, était suffisante pour rendre la matrice $X^T X$ inversible et le modèle (2.2) identifiable [Barrett 1978; Kupper *et al.* 1985].

Cependant, cette « solution » à la non-identification du modèle APC est très critiquée car le choix de cette contrainte minimale influence très fortement l'estimation des paramètres. En effet, à chaque contrainte minimale différente correspond un jeu de paramètres différent. Or lorsque le modèle est juste identifié, c'est à dire qu'il y a juste assez d'information pour estimer les paramètres, chaque contrainte différente produit la même qualité d'ajustement du modèle. Il n'est alors pas possible de savoir quelle est la bonne contrainte minimale à appliquer et quels sont les paramètres qui estiment correctement les effets de l'âge de la période et de la cohorte. Le choix de cette contrainte minimale devrait donc être basée sur des hypothèses fortes ou des connaissances *a priori* quant à la forme de l'effet de telle ou telle variable, ce qui est rarement le cas [Oppenheim Mason *et al.* 1973].

A partir de ce constat, différentes approches du problème de l'identification du modèle ont été proposées. La première approche se focalise sur la partie du modèle estimable sans biais, c'est dire qui ne dépend pas de la contrainte utilisée pour identifier le modèle. La seconde approche vise à identifier les différentes contraintes possibles et leur impact sur l'estimation des effets des variables. Enfin, en considérant l'origine du problème -la dépendance linéaire des variables du modèle- des méthodes visant à s'affranchir de cette colinéarité ont été également explorées.

Nous développerons les deux premières approches et présenteront sommairement les autres solutions proposées à la colinéarité. Les « solutions » purement mathématiques ne seront pas abordées, d'une part parce qu'elles sont complexes et d'autre part, parce qu'elles n'ont pas de justification biologique, et ne sont donc pas, en quelque sorte, des solutions adaptées au problème du modèle APC dans le cadre de l'épidémiologie.

2.2.3.2. La partie du modèle estimable sans biais

Fienberg et Mason [Fienberg and Mason 1979] ayant établi que seule la composante linéaire des effets de variables n'était pas estimable dans le modèle APC, Rogder [Rodgers 1982] et Holford [Holford 1983] ont proposé de reformuler le modèle (2.2) en séparant les paramètres α_i , β_j et γ_k en composantes linéaires, mesurant la tendance, et non linéaires, correspondant à l'écart à la linéarité des effets des variables. Les effets de l'âge, de la période et de la cohorte sont alors représentés par :

$$\alpha_i = \tilde{\alpha}_i + i^* \pi_a$$

$$\beta_j = \tilde{\beta}_j + j^* \pi_p$$

$$\gamma_k = \tilde{\gamma}_k + k^* \pi_c$$

avec $\tilde{\alpha}_i$, $\tilde{\beta}_j$ et $\tilde{\gamma}_k$ les effets non linéaires (courbures), π_a , π_p et π_c les pentes globales de l'âge, de la période et de la cohorte et $i^* = i - \frac{i+1}{2}$, $j^* = j - \frac{j+1}{2}$ et $k^* = k - \frac{k+1}{2}$ les indices normalisés. Ils ont démontré que seules les courbures étaient estimables sans biais. Pour les pentes, seule la fonction linéaire, $a\pi_a + b\pi_p + (b-a)\pi_c$ pour a et b arbitraires, est estimable sans biais, de sorte que pour a=b=1, seul $(\pi_a + \pi_p)$ est estimable et pour a=0 et b=1, seul $(\pi_p + \pi_c)$ est estimable. Ceci est lié au fait que la détermination d'une seule pente entraîne la fixation des deux autres.

Holford a proposé de déterminer la pente globale de chaque variable par régression linéaire sur les paramètres (d'où l'utilisation d'indices normalisés), les paramètres du modèle ayant été estimés en utilisant une contrainte minimale. La courbure $\tilde{\alpha}_i$ est alors obtenue par soustraction de la pente globale π_a au paramètre α_i .

L'approche de Clayton et Schiffler [Clayton and Schifflers 1987; Clayton and Schifflers 1987] se rapproche de celle d'Holford en ce qu'ils ont considéré pour les variables période et cohorte un effet « drift », δ , et un effet « non-drift » se rapprochant respectivement de la partie linéaire et de la courbure de la paramétrisation d'Holford. Ils ont défini une tendance linéaire globale appelée « drift-net », dont l'origine ne peut être attribuée ni à la cohorte ni à la période.

En effet, le modèle APC ne tenant pas compte des effets non-drift, la relation :

$$l(\lambda_{ijk}) = \mu + \alpha_i + \delta_p(p_j - p_0) + \delta_c(c_k - c_0) \quad (2.15)$$

avec p_0 et c_0 les niveaux de référence pour la période et la cohorte, peut être réécrite sous la forme :

$$l(\lambda_{ijk}) = \mu + \alpha_i - \delta_c(a_i - a_0) + (\delta_p + \delta_c)(p_j - p_0) \quad (2.16)$$

ou

$$l(\lambda_{ijk}) = \mu + \alpha_i - \delta_c(a_i - a_0) + (\delta_p + \delta_c)(c_k - c_0) \quad (2.17)$$

où, $\delta_p + \delta_c$ correspondant au drift-net, l'équation (2.16) correspond au modèle âge-période-drift (APd) et l'équation (2.17) au modèle âge-cohorte-drift (ACd).

Les modèles APd, ACd et APC sont ainsi impossibles à distinguer l'un de l'autre. Clayton et Schiffler ont conclu que seul le drift-net $\delta = \delta_p + \delta_c$ était estimable à partir de données regroupées par catégories d'âge et de période.

Concernant les effets non-drift, $\tilde{\alpha}_i$, $\tilde{\beta}_j$ et $\tilde{\gamma}_k$ ils sont obtenus en ôtant l'effet drift aux paramètres :

$$\tilde{\alpha}_i = \alpha_i - \delta_c(a_i - a_0)$$

$$\tilde{\beta}_j = \beta_j - \delta_p(p_j - p_0)$$

$$\tilde{\gamma}_k = \gamma_k - \delta_c(c_k - c_0)$$

Clayton et Schiffler ont précisé que ces effets non drift étaient estimables sans biais et ont proposé de les interpréter comme des courbures locales, permettant au rapport entre les paramètres de deux niveaux adjacents d'une variable de ne pas être identiques.

Ces effets non-drift peuvent ainsi être exprimés comme le contraste entre les paramètres de niveaux adjacents d'une variable. Ce contraste correspond aux différences secondes :

$$(\alpha_{i+1} - \alpha_i) - (\alpha_i - \alpha_{i-1})$$

$$(\beta_{j+1} - \beta_j) - (\beta_j - \beta_{j-1})$$

$$(\gamma_{k+1} - \gamma_k) - (\gamma_k - \gamma_{k-1})$$

Une valeur nulle indique une absence de changement de tendance localement, une valeur positive ou une valeur négative correspondent respectivement à une décélération ou une accélération de la tendance localement.

Récemment Yang *et al* [Yang *et al.* 2004; Yang *et al.* 2007] ont proposé une nouvelle méthode basée sur un estimateur, dénommé estimateur intrinsèque. L'estimateur intrinsèque est la

solution de l'équation (2.14) et permet de déterminer l'unique fonction estimable incluant les composantes linéaires et non linéaires du vecteur des paramètres du modèle (2.2). La méthode repose sur l'idée que l'estimateur intrinsèque permet d'ôter l'influence de la matrice X des équations (2.13 et 2.14) sur l'estimation des paramètres du modèle. Un tel estimateur permet alors d'accéder à une estimation sans biais des paramètres. Cependant les auteurs soulignent que le concept de l'estimateur intrinsèque n'est pas aisément accessible et n'est pas universellement applicable.

2.2.3.3. Les méthodes basées sur la contrainte des paramètres

Malgré l'accès à des estimateurs non biaisés du modèle APC que sont les combinaisons d'effet linéaire/drift et les courbures/effet non-drift, différentes méthodes visant à contraindre le modèle ont été développées. En effet les combinaisons de pentes ne permettent pas de distinguer les effets propres de chaque variable et les effets non linéaires ne sont pas d'interprétation aisée en l'absence d'estimation des effets linéaires propres de chaque variable du modèle.

En fonction du type de contrainte imposé aux paramètres du modèle, l'impact sur les résultats du modèle ne sera pas le même, que l'on exclue totalement une variable en supposant qu'elle n'a aucun effet (contrainte multiple) ou que l'on suppose simplement que l'effet de cette variable est constant sur deux pas de temps successifs (contrainte minimale).

Contrainte de l'effet linéaire des variables

Une possibilité est de poser des contraintes sur l'effet linéaire d'une variable de façon à déterminer la tendance des effets propres de chaque variable du modèle. Plusieurs méthodes sont possibles [Holford 1992]:

- Restreindre les valeurs qu'une pente peut prendre

On peut ainsi envisager de contraindre les pentes globales des effets des variables à varier entre deux valeurs, en supposant, par exemple, que la tendance n'est pas décroissante avec la cohorte et la période. On décide alors que $\pi_c \geq 0$ et $\pi_p \geq 0$, d'où $\pi_c + \pi_p \geq \pi_c \geq 0$ et $\pi_c + \pi_p \geq \pi_p \geq 0$. Les pentes globales de la cohorte et de la période ne varient alors qu'entre 0 et la valeur de $\pi_c + \pi_p$ estimable sans biais. De même on réduit les valeurs que la pente globale de la variable âge peut prendre à $\pi_a + \pi_p \geq \pi_a \geq \pi_a - \pi_c$.

- Contraindre une des pentes à 0

Une autre possibilité est de fixer la pente d'une des variables à 0, soit sur un pas de temps seulement soit sur toute la période. Cependant, il faut noter que contraindre la totalité d'une pente d'une variable à 0 entraîne un biais dans l'estimation des valeurs des deux autres pentes, les pentes de l'âge, de la période et de la cohorte étant liées linéairement.

Egalisation de plus de deux paramètres au sein d'une même variable

Barett [Barrett 1978] et Oppenheim Mason *et al* [Oppenheim Mason *et al.* 1973] ont déterminé qu'une seule contrainte minimale supplémentaire, égalisant deux paramètres d'une variable, était suffisante pour rendre le modèle identifiable. Ainsi, contraindre deux niveaux successifs d'une variable ou supposer que la moyenne des différences successives (différence de premier ordre) de cette variable est nulle permettent d'identifier le modèle. Cependant, la première solution suppose un effet constant sur un pas de temps, tandis que la deuxième proposition revient à contraindre le premier et le dernier paramètre à l'égalité, soit la pente totale à 0.

Lors de l'utilisation d'une contrainte minimale, il n'est alors pas possible, sans hypothèse forte, de savoir quelle est la bonne estimation des paramètres du modèle et la bonne contrainte associée (cf. partie 2.2.3.1) [Oppenheim Mason *et al.* 1973; Rodgers 1982; Holford 1983; Kupper *et al.* 1985; Holford 1992]. Une des solutions proposée à ce problème est de contraindre à l'égalité plus de deux paramètres d'une même variable. Le nombre de degrés de liberté n'étant plus le même, l'ajustement du modèle produit par la contrainte varie d'une contrainte à l'autre. Les modèles identifiés à partir de différentes contraintes sont alors comparés en termes d'ajustement aux données par les méthodes classiques. A l'extrême, il est possible de tester l'effet d'une variable en contraignant tous ses paramètres à 0 et en comparant ce modèle à un modèle où les trois variables sont présentes. Une telle procédure revient à une sorte de sélection pas à pas du meilleur modèle. Cependant, Rodger [Rodgers 1982] relève que, tandis que l'utilisation de contraintes minimales différentes sur un même jeu de données entraîne simplement une rotation de la courbe des effets, sans modification de la forme de ces effets, la spécification de contraintes multiples entraîne une rotation et une modification de la forme des effets des variables entraînant potentiellement un biais supplémentaire.

2.2.3.4. Les méthodes visant à s'affranchir de la colinéarité des variables

Une autre approche du problème d'identification consiste, non pas à tenter de résoudre le problème d'identification du modèle, mais à tenter de s'affranchir de la relation linéaire liant l'âge, la période et la cohorte.

Le modèle à deux variables

Une première solution réside dans l'ajustement d'un modèle dans lequel seulement deux des trois variables sont prises en compte. Le modèle à deux variables est une solution attractive puisque dans un tel modèle, le problème de linéarité est levé et le modèle est identifiable sans contrainte supplémentaire. Cependant ce modèle reste une source de biais important du fait qu'il est impossible de tester l'hypothèse que l'on fait en ne considérant que deux des trois variables du modèle, à savoir :

$$H_0: \Phi_1 = \dots = \Phi_n = 0$$

avec Φ_1, \dots, Φ_n les paramètres du facteur exclu.

Du fait que les pentes des variables sont liées, en l'absence de la possibilité de tester H_0 , l'estimation des effets des deux variables présentes dans le modèle pourrait être biaisée. Cette contrainte est sévère puisque, non seulement on contraint la pente de la variable exclue à 0, mais on suppose également que les courbures sont nulles.

Introduction de relations non linéaires dans le modèle

Une autre approche considère le lien linéaire qui lie les pentes des variables. En introduisant dans le modèle un polynôme ne contenant pas de terme linéaire (termes ≥ 2) pour modéliser les effets de l'une des variables, la relation linéaire entre les variables est brisée et le modèle devient identifiable. Cependant on suppose pour cela que l'effet de cette variable a une forme spécifique. De plus, le choix du polynôme et l'interprétation des résultats peuvent poser problème. De même, l'ajustement de modèles non linéaires serait une possibilité mais ces modèles restent complexes et d'interprétation difficile [Fu 2008].

Approche mécanistique

Winship et Harding [Winship and Harding 2004] proposent une approche dite mécanistique, basée sur les mécanismes sous-jacents influençant les effets d'âge, de cohorte et de période. Ils proposent de remplacer une ou plusieurs des variables du modèle par des variables latentes intermédiaires non colinéaires. Du fait d'absence de colinéarité entre les variables

maintenues dans le modèle et les variables latentes, il est possible d'estimer les paramètres associés à ces variables puis de remonter aux effets des variables d'origine. Cependant, dans une telle approche, il faut pouvoir être à même de spécifier les mécanismes qui sont associés respectivement à l'âge, la cohorte et la période et qui affectent la variable d'intérêt.

2.2.3.5. Autres propositions

Robertson et Boyle ont proposé une méthode basée sur les données individuelles et une tabulation triangulaire des données par âge, période et cohorte permettant un non-chevauchement des cohortes de naissances [Robertson and Boyle 1986]. Cependant, leur approche ne résout pas le problème de non identification du modèle [Osmond and Gardner 1989] et nécessite de disposer des données individuelles et de prendre en compte la différence d'âge moyen entre les cellules générées par la tabulation triangulaire.

Une approche par pénalisation a été développée par Osmond et Garner [Osmond and Gardner 1982] et Decarli et La Vecchia [Decarli and La Vecchia 1987]. Ils proposent ainsi de construire un paramètre de pénalisation à partir des résultats des modèles à deux facteurs et du modèle complet. Les paramètres du modèle complet sont alors corrigés avec ce paramètre de pénalisation.

De nombreuses autres approches ont été développées : modèles autorégressifs avec autocorrélation des cohortes successives [Lee and Lin 1996], approches bayésiennes [Berzuini *et al.* 1993; Berzuini and Clayton 1994; Yang 2006; Schmid and Held 2007], méthodes non paramétrique et lissage [Ohtaki *et al.* 1990; Fu 2008].

2.2.4. Prise en compte des interactions dans le modèle APC

Une limite du modèle APC (2.2) réside dans le fait qu'un tel modèle suppose que l'effet de chaque variable ne dépend pas du niveau des deux autres. Les interactions entre les variables temporelles (âge, période et cohorte) ne sont pas prises en compte. Une partie du problème vient du fait que l'interaction dans un modèle où deux des trois facteurs sont pris en compte sature le modèle et qu'il n'existe plus d'erreur. Un tel modèle où la prédiction équivaut à l'observation est tout à fait non-informatif.

En comparant le modèle complet :

$$l(\lambda_{ijk}) = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijk} \quad (2.18)$$

au modèle âge-période avec interaction :

$$l(\lambda_{ij}) = \mu + \alpha_i + \beta_j + \zeta_{ij} \quad (2.19)$$

et au modèle âge-cohorte avec interaction :

$$l(\lambda_{ij}) = \mu + \alpha_i + \gamma_k + \zeta_{ik} \quad (2.20)$$

on peut interpréter l'effet cohorte comme l'interaction de l'âge et de la période [Holford 1991]. De même l'effet période peut être interprété comme l'interaction de l'âge et de la cohorte. Cependant, l'effet cohorte et l'effet période caractérisent en fait des formes très particulières d'interactions [Kupper *et al.* 1985; Kupper *et al.* 1985]. Fienberg et Mason [Fienberg and Mason 1979] ont déterminé les niveaux d'interaction qui pouvaient être estimés à partir de modèles polynômiaux mais les résultats sont difficiles à interpréter. L'introduction d'interactions dans le modèle doit être faite avec précaution. Cependant, lorsqu'une interaction est présente, estimer les effets propres de chaque covariable n'a alors plus beaucoup de sens, les covariables agissant conjointement sur la variable réponse. Holford propose, comme alternative à l'utilisation de polynômes, de prendre en compte l'interaction en partitionnant le temps et d'ajuster un modèle dans chaque sous-division du temps [Holford *et al.* 2006]. Les méthodes graphiques permettent également d'évaluer la présence d'interactions entre les variables du modèle APC. Certains graphiques sont particulièrement bien adaptés à l'étude de ces interactions (biplots et analyse en correspondance) [Robertson and Boyle 1998].

2.2.5. Inférence à partir du modèle APC

L'estimation de la tendance future des effets des variables dans un but prédictif n'est pas dépendante du choix de la contrainte utilisée pour identifier le modèle. Considérons la partie linéaire du modèle :

$$l(\lambda_{ijk}) = \mu + i\pi_a + j\pi_p + k\pi_c + \varepsilon_{ijk} \quad (2.21)$$

Si l'on suit la même cohorte entre t_0 et t_1 , l'équation (2.21) devient :

$$l(\lambda_{i+1j+1k}) = \mu + (i + 1)\pi_a + (j + 1)\pi_p + k\pi_c + \varepsilon_{ijk}$$

La différence des effets de la cohorte entre t_0 et t_1 est estimée par :

$$l(\lambda_{i+1j+1k}) - l(\lambda_{ijk}) = \pi_a + \pi_p$$

qui est une fonction estimable des effets linéaires des variables [Holford 1992].

Cependant, lorsque le modèle APC est utilisé dans un but prédictif, on fait alors l'hypothèse très forte que la tendance passée se poursuit dans le futur. De plus, certaines critiques relèvent que le modèle APC n'est pas approprié à l'inférence, notamment pour l'effet cohorte, du fait de la structure des données sur lesquelles le modèle s'appuie. En effet, dans le diagramme âge-cohorte, on constate que la moitié des cellules du diagramme sont vides d'information (figure 2.21). Ceci découle de la particularité de la classification âge-cohorte-période (cf. partie 2.2.6).

D'une part, on peut donc se poser la question de la pertinence d'inférer à partir d'une méthode dont les résultats sont obtenus à partir d'une moitié d'information seulement. D'autre part, l'inférence est intéressante pour les cohortes les plus récentes, qui sont précisément parmi les cohortes sous-représentées dans le diagramme de Lexis. La pondération des paramètres permettant de corriger la contribution déséquilibrée des cellules à l'estimation des paramètres n'est pas suffisante pour inférer largement. Kupper et al ont conclu qu'au mieux, l'inférence n'était permise qu'au sein d'un groupe d'âge, de cohorte et de période déterminés [Kupper *et al.* 1985].

Enfin, Carstensen relève que, tout comme les estimations des effets des variables, les résultats de l'inférence sont guidés en partie par la catégorisation des données et, lors de l'utilisation des splines, par le choix des nœuds [Carstensen and Keiding 2005].

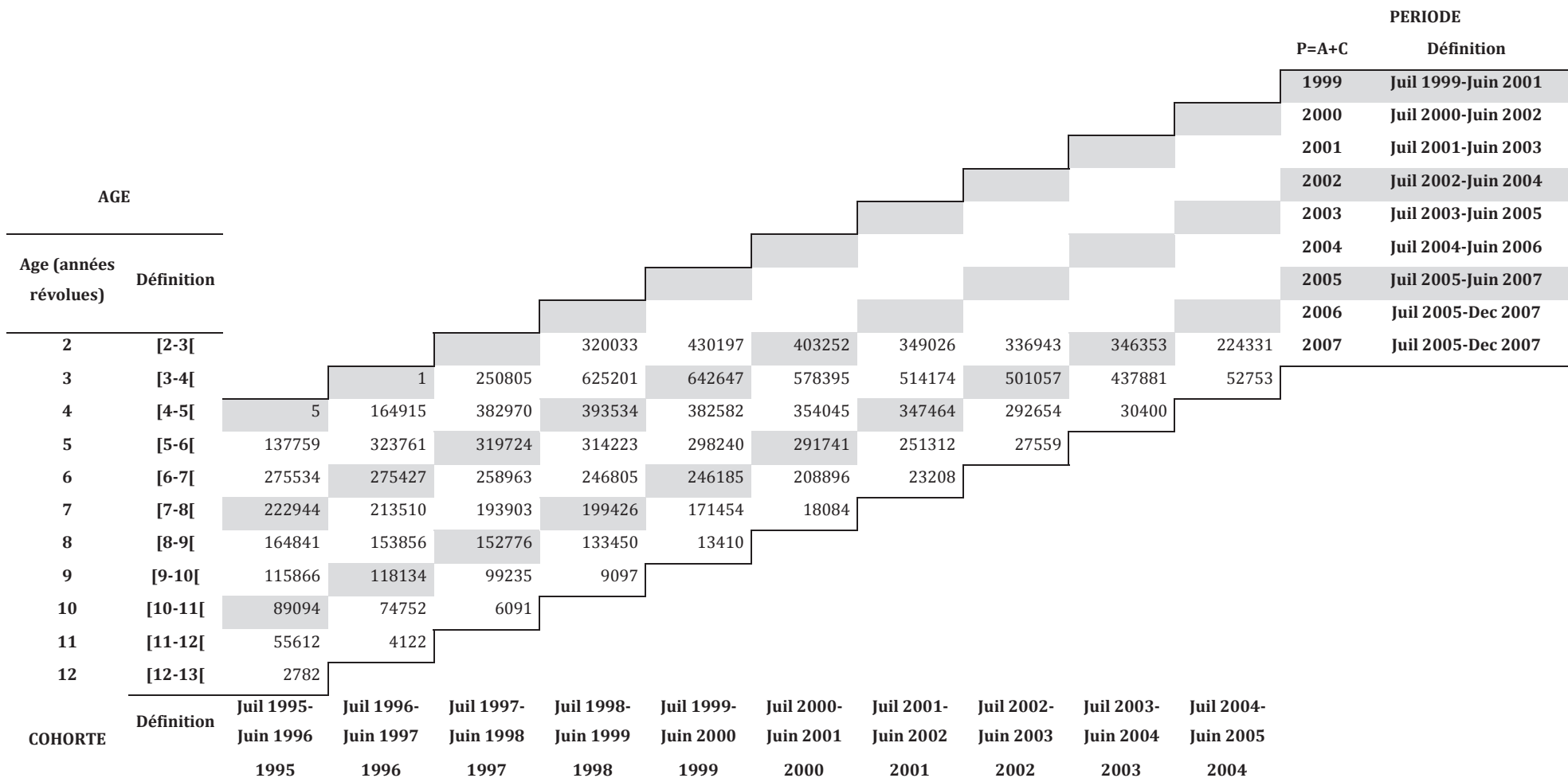


Figure 2.21 - Diagramme âge-cohorte : répartition du nombre d'animaux testés pour l'ESB en France entre juillet 2001 et décembre 2007 (représentation partielle).

2.2.6. Impact du regroupement des données sur l'estimation du modèle APC

Le regroupement des données dans le diagramme de Lexis induit nécessairement des intervalles chevauchants pour la variable calculée (figure 2.21). Ce chevauchement est en général ignoré lors de l'ajustement du modèle APC mais il est possible qu'il soit à l'origine d'un biais dans l'estimation des paramètres.

D'autre part, Rodger [Rodgers 1982] fait remarquer que l'utilisation d'intervalles étroits pour regrouper les données n'est pas forcément judicieuse. En effet, une catégorisation fine entraîne nécessairement une diminution du nombre d'évènements dans chaque cellule du diagramme. Il en résulte une augmentation de la variance et une sur-dispersion. Le biais dans l'estimation des effets de la variable x , biais lié à la contrainte imposée sur les paramètres de cette variable pour rendre le modèle identifiable, est alors multiplié par un facteur inversement proportionnel à la largeur de l'intervalle de regroupement de la variable x . Le biais est en quelque sorte lié au nombre de catégories définies pour l'âge, la période et la cohorte.

Enfin, il faut avoir à l'esprit que le modèle APC se base sur une information fortement incomplète et déséquilibrée. L'examen du diagramme de Lexis âge-cohorte construit à partir de notre jeu de données permet de mettre en évidence ce déséquilibre (figure 2.21). Ainsi, dans un modèle APC, les cohortes ne contribuent pas toutes de la même manière : c'est fonction de leur « temps de présence » dans la période d'observation. Les cohortes extrêmes sont sous représentées (problème de précision) et toutes les cohortes ne sont pas observées à tous les âges, et ce, même si la période d'observation est supérieure à la durée de vie des individus. La pondération des cellules par l'inverse de la variance est classiquement utilisée pour limiter l'influence de ce déséquilibre entre les cellules du diagramme. Il est probable que ce déséquilibre joue un rôle dans la difficulté à mettre en évidence un effet cohorte et pénalise la cohorte par rapport à la période qui elle, est représentée dans tous les groupes d'âge. Cependant, si la période a l'avantage du nombre d'évènements, la cohorte a l'avantage d'être représentée sur une longue période.

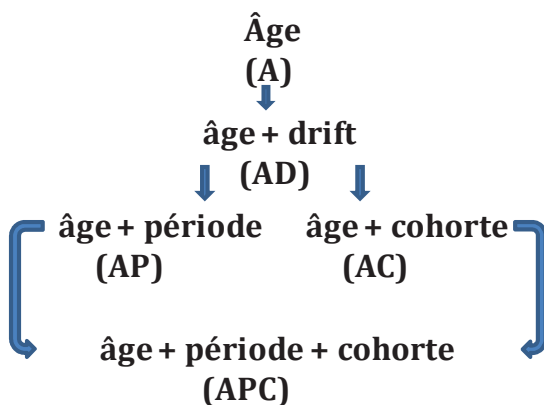
2.3. Proposition d'un procédé d'ajustement du modèle

Le modèle APC a été l'objet de nombreuses critiques liées d'une part à la catégorisation particulière que le modèle requiert et d'autre part au choix de la contrainte nécessaire à son identification, et influençant l'estimation des effets respectifs de l'âge, de la période et de la cohorte. Il en découle qu'un tel modèle ne devrait pas être abordé sans de solides

connaissances ou informations *a priori*, permettant d'ajuster le modèle à partir d'hypothèses pesant le moins possible sur l'estimation des paramètres. Les contraintes adoptées pour rendre le modèle APC identifiable doivent avoir, dans la mesure du possible, un sens biologique, une justification par rapport à ce qui est connu [Oppenheim Mason *et al.* 1973; Holford 1983; Holford 1992]. En l'absence d'hypothèses permettant de contraindre le modèle APC, des méthodes d'ajustement pas à pas ont été mises au point.

Clayton et Schiffler proposent une méthode d'ajustement pas à pas incluant les effets linéaires et non linéaires des variables [Clayton and Schifflers 1987; Clayton and Schifflers 1987]. Préalablement au modèle APC, quatre modèles « partiels » sont ajustés: un modèle avec l'âge seul (modèle A), un modèle contenant l'effet de l'âge et le drift net (modèle AD), un modèle âge-période (AP) et un modèle âge-cohorte (AC).

Figure 2.22 - Processus d'ajustement proposé par Clayton et Schiffler.



La comparaison du modèle A au modèle AD permet d'évaluer l'effet linéaire global (net-drift) qui ne peut être attribué ni à la cohorte ni à la période. La comparaison du modèle AD au modèle AP permet d'estimer l'effet non-drift (non linéaire) de la période. De même en comparant le modèle AC au modèle AD on évalue l'effet non linéaire de la cohorte. Enfin la comparaison d'un modèle APC aux

modèles AP et AC permet d'évaluer respectivement l'effet complet (effet drift et non drift) de la période et de la cohorte. Carstensen propose, en plus de ces modèles, un modèle à trois variables original ajustant, sur les résidus d'un modèle à deux facteurs (AP ou AC), la troisième variable. Il détermine ainsi l'effet résiduel de la troisième variable [Carstensen 2007].

Bien que le choix d'une contrainte supplémentaire pour rendre le modèle identifiable ait une influence majeure sur les estimations des effets des variables du modèle APC, cette méthode d'ajustement est couramment utilisée en analyse APC. Généralement l'association d'une procédure de sélection pas à pas du modèle et l'utilisation d'une contrainte minimale basée sur les connaissances *a priori* fortes permet l'analyse APC dans de bonnes conditions. Ainsi le modèle APC, largement critiqué, demeure très utilisé en épidémiologie et démographie, ainsi qu'en sciences politiques et sociales où il permet une bonne compréhension de l'évolution des phénomènes liés aux générations.

Chapitre 3- Modélisation APC des données de surveillance de l'ESB

L'objectif premier du travail de thèse était d'estimer l'évolution au cours du temps (tendance) de l'épizootie d'ESB en France au moyen d'un modèle simple, ne requérant pas d'hypothèses fortes quant aux caractéristiques épidémiologiques de l'ESB et à l'efficacité des mesures de contrôle. Un tel modèle devait permettre d'évaluer la tendance de l'exposition des bovins à l'ESB, de discuter des effets des mesures de contrôle sur l'évolution de la maladie et d'évaluer la possibilité de faire évoluer la législation de l'ESB. Une première partie a ainsi permis d'adapter la modélisation APC à l'étude de l'ESB (partie 3.2.). Dans un second temps, le modèle APC a été utilisé pour analyser de manière similaire la tendance de la prévalence de la maladie dans différents pays européens ayant eu différentes expériences de l'épizootie, tant par le niveau d'exposition de la population bovine à l'agent de l'ESB que par la gestion réglementaire de celle-ci. La France et l'Italie, disposant de données de qualité aisément accessibles, ont fait l'objet d'une comparaison spécifique. Pour cette comparaison, une analyse catégorielle associée au calcul des différences secondes a été mise en œuvre (partie 3.3.). Enfin, la contribution à une étude européenne (projet « BSE trend ») couplant une analyse APC catégorielle au calcul du nombre reproductif de base (R_0) a permis de comparer l'évolution de l'ESB dans sept pays (Allemagne, France, Irlande, Italie, Royaume-Uni, Pays-Bas et Pologne) (partie 3.4.).

Nous présentons dans cette première partie les définitions et représentations de l'âge, de la période et de la cohorte particulières à l'ESB, ainsi que les données et méthodes d'analyse utilisées.

3.1. Matériel et méthode

3.1.1. Définitions des variables du modèle APC dans le cas de l'ESB

3.1.1.1. Variable expliquée dans le cas de l'ESB : la prévalence à la mort

La prévalence et le taux d'incidence sont les deux mesures principalement utilisées en épidémiologie pour caractériser une maladie. La prévalence correspond à la proportion de cas dans la population à un instant donné, c'est à dire au nombre de cas rapporté au nombre d'individus présents à l'instant t . C'est une mesure de risque dont la valeur est comprise entre

0 et 1 et qui intègre la notion de durée de la maladie et de vitesse d'apparition des cas (malades); plus l'une et/ou l'autre est grande, plus la prévalence est élevée. Le taux d'incidence correspond au nombre de nouveaux cas par unité de temps. L'incidence représente ainsi la vitesse d'apparition des cas dans la population. Dans le calcul du taux d'incidence, on tient compte du temps de participation de chaque individu (temps compris entre le début de l'observation et la fin de l'observation ou l'apparition de l'événement chez cet individu). Le dénominateur est ainsi exprimé en personnes-unité de temps. Classiquement, plus un individu participe longtemps, plus son exposition au(x) facteur(s) de risque de la maladie est longue et plus la probabilité que cet individu développe la maladie est élevée. A la date de point (fin de la période d'observation), les individus que l'on a perdus de vue au cours de l'étude et dont on ne connaît pas le statut vis-à-vis de la maladie sont censurés à droite, de même que ceux qui n'ont pas présenté la maladie. On ramène ainsi le nombre de cas au temps de participation global en prenant en compte les censures.

Dans le cas de l'ESB, on se trouve dans une situation où, du fait d'un diagnostic de certitude uniquement post mortem, il y a quasi confusion entre cas incident et cas prévalent. Si l'on s'intéresse au risque d'ESB dans la population vivante il y a très peu -voire pas- de cas prévalents puisque l'évolution de la maladie est très courte (quelques semaines) et tous les cas sont décédés au moment du diagnostic de certitude. De plus, jusqu'à présent, la détermination du taux d'incidence dans la population bovine vivante posait un problème puisque le nombre d'animaux-années était difficilement accessible. Une amélioration récente de l'accès aux données détaillées de population pourrait permettre d'évaluer le taux d'incidence de l'ESB sous condition d'estimer, par modélisation, le nombre réel d'animaux infectés dans la population. Enfin, une dernière particularité de l'ESB est que, contrairement à la plupart des maladies, le temps de participation des animaux n'est pas relié par une fonction linéaire croissante à la probabilité de présenter l'événement. Du fait que l'âge à la contamination est stable et précoce, la probabilité d'être détecté comme cas ESB est reliée à la distribution de la période d'incubation, unimodale. L'âge à la détection suit alors approximativement la distribution de la période d'incubation et au-delà d'un certain âge (6-7 ans en moyenne) la probabilité d'être un cas n'augmente quasi plus.

Ainsi, dans notre étude, nous avons modélisé une mesure de risque d'ESB et non pas une mesure d'incidence : la probabilité d'être détecté comme un cas ESB à la mort, la population testée servant de population de référence. Le diagramme de Lexis a été adapté de manière à calculer la proportion de cas d'ESB dans la population testée dans chaque cellule du diagramme.

3.1.1.2. Définitions des variables âge, période et cohorte

La variable âge a été définie comme l'âge des animaux à leur mort, correspondant, à quelques jours près, à la date à laquelle le test de diagnostic de confirmation était réalisé, et ce, que l'animal ait fait l'objet ou non d'une suspicion clinique d'ESB. Nous avons estimé que la variable âge était le reflet de l'association de l'âge à la contamination et de la durée de la période d'incubation de la maladie, en considérant la phase clinique de la maladie comme négligeable et en s'appuyant sur le fait que les tests de dépistage ne permettent une détection de la maladie, au mieux, que dans les derniers mois précédant la mort de l'animal. La distribution de la période d'incubation de l'ESB étant assez stable, autour de 5 ans, et les animaux s'infectant essentiellement au cours de leur première année de vie [Ferguson *et al.* 1997; Arnold and Wilesmith 2004; Supervie and Costagliola 2004], la probabilité de dépister un animal positif est fortement liée à l'âge de cet animal au moment du test de dépistage. Nous avons ainsi considéré que l'âge était une variable majeure et l'avons systématiquement prise en compte lors de la modélisation APC.

La variable cohorte a été définie comme la cohorte de naissance des animaux. Les études épidémiologiques précédemment menées en France et en Europe ont mis en évidence une exposition différente des bovins à l'ESB en fonction de leur année de naissance [La Bonnardière *et al.* 2004; Morignat *et al.* 2004; Supervie and Costagliola 2004; Supervie and Costagliola 2007]. Cette variation de l'exposition ESB au cours du temps serait expliquée par le fait que la voie de contamination des bovins est essentiellement, si ce n'est exclusivement, alimentaire, et que la mise en place progressive des diverses mesures de contrôle depuis la fin des années 80 ont permis de diminuer ce risque alimentaire. Nous avons ainsi considéré que la variable cohorte de naissance reflétait, dans le cas de l'ESB, le niveau d'exposition des bovins à l'agent de l'ESB, niveau d'exposition modulé par l'efficacité des mesures de contrôle. Enfin, nous nous avons défini la variable période comme le moment de réalisation du test de dépistage, à savoir la période à laquelle l'animal est mort. Nous avons considéré que l'effet période traduisait essentiellement les évolutions, d'une part, des méthodes de diagnostic de l'ESB, et d'autre part, des systèmes de surveillance de la maladie depuis l'apparition de l'ESB.

3.1.2. Les données utilisées

3.1.2.1. Origine et nature des données analysées

Nous avons utilisé les données d'enregistrement des tests ESB effectués sur les bovins dans le cadre des programmes de surveillance mis en place suite à l'adoption du règlement européen

999/2001CE. La période d'inclusion des données a été déterminée en fonction du moment où l'exhaustivité du dépistage était assurée et constante pour les bovins de 24 ou 30 mois et plus, et de la disponibilité des données les plus récentes. Les dates d'inclusion des données ont ainsi légèrement varié selon le pays considéré. Pour la France nous avons inclu les données ESB enregistrées entre le 1^{er} juillet 2001 et le 31 décembre 2007. Pour l'Allemagne, l'Italie, l'Irlande et les Pays-Bas, qui avaient mis en place un dépistage exhaustif à l'équarrissage plus précocement, nous avons inclus les animaux testés entre janvier 2001 et décembre 2007. La Pologne étant entrée plus récemment dans l'Europe, seules les données de la période 2002-2007 ont été incluses dans l'analyse. Enfin, pour le Royaume-Uni ayant fait l'objet d'une réglementation spécifique, seules les données des années de surveillance 2001 à 2007 correspondant à des programmes de surveillance spécifiques ont été prises en compte.

3.1.2.2. Organisation des données et hypothèses

Préalablement au regroupement des données, un certain nombre d'exclusions ont été effectuées dans chaque jeu de données :

- les animaux de moins de deux ans (24 mois) ont été exclus de l'analyse puisque les textes réglementaires fixaient l'âge minimal au dépistage à 24 mois à l'équarrissage et 30 mois à l'abattoir. Pour les données françaises, pour lesquelles l'âge précis des animaux était accessible, nous avons exclu les animaux âgés de moins de 30 mois ;
- les animaux pour lesquels la date de naissance ou l'âge était manquant ou imprécis ont été exclus puisqu'il n'était pas possible de déterminer correctement leur catégorie d'âge et de cohorte ;
- lorsque l'information était disponible, les animaux, notamment les cas ESB, non natifs du pays considéré ont été exclus, ces animaux n'étant pas représentatifs du risque alimentaire du pays en question ;
- concernant les cas d'ESB atypique qui ne présentent pas les mêmes caractéristiques épidémiologiques que l'ESB classique (cf. partie 1.2.5.), ils ont été exclus de l'analyse spécifique des données françaises et italiennes. Pour la comparaison entre les sept pays européens, tous les pays ne réalisant pas de diagnostic discriminatoire, il a été choisi de conserver les cas atypiques dans cette étude.

L'objectif de l'étude étant de déterminer l'évolution, au cours du temps, de l'exposition des bovins à l'ESB en relation avec les mesures de contrôle, nous avons privilégié la cohorte par rapport à la période en utilisant une catégorisation âge-cohorte lorsque les données

disponibles le permettraient. Ainsi pour l'Allemagne, la France, l'Irlande, l'Italie et le Royaume-Uni, les données ont été regroupées par âge et cohorte de naissance. Seuls la date de dépistage et l'âge des animaux étant disponibles pour les données hollandaises et polonaises, une catégorisation âge-période a dû être adoptée pour ces pays là. Des intervalles de catégorisation de un an ont été utilisés. Si la précision des données le permettait, l'âge était calculé en années révolues à partir de la date de naissance et de la date de mort des animaux. Sinon l'âge renseigné était utilisé après conversion en années révolues.

La cohorte de naissance a été définie de trois manières en fonction du pays considéré. Une première définition, spécifiquement française, commençant au 1^{er} juillet et se terminant au 30 juin de l'année suivante, a permis de regrouper dans une même cohorte de naissance les animaux nés au cours d'une même saison de vêlage et élevés de la même manière d'un point de vue zootechnique. La connaissance du mois de naissance des animaux n'étant pas disponible pour tous les pays participant à l'étude au niveau européen, et la saison de vêlage n'étant pas nécessairement la même dans tous les pays, un découpage en années civiles a été utilisé dans les analyses comparatives France-Italie et dans l'étude européenne. Pour les pays ne disposant pas des données exactes sur la cohorte de naissance des animaux testés, la cohorte a été calculée à partir de l'âge des animaux et de l'année de dépistage et présentait de ce fait, des intervalles chevauchants de deux ans (Pays-Bas et Pologne).

Enfin, dans la catégorisation âge-cohorte adoptée pour la majorité des pays, la période a été calculée à partir de l'âge en années révolues et de la cohorte de naissance.

3.1.3. Méthodes d'analyse APC utilisées

Pour évaluer les effets des variables âge, période et cohorte sur la prévalence de l'ESB à la mort, en fonction du pays, nous avons utilisé des modèles de régression logistique permettant la prise en compte des effets des variables de manière discontinue (modèle catégoriel) ou continue. Seules les données françaises ont été analysées de manière continue au moyen de splines de régression naturelles cubiques permettant de modéliser la forme des effets de l'âge, de la cohorte et de la période. Le modèle catégoriel, plus facile à mettre en place car ne nécessitant pas d'*a priori* sur la forme des effets des variables, a été utilisé pour l'analyse comparative de l'évolution de l'ESB en France et en Italie et pour la comparaison générale entre les pays européens participant au projet « BSE trend ».

Pour identifier le modèle APC complet, une contrainte minimale a été systématiquement appliquée aux paramètres de la période. Dans l'analyse catégorielle, les paramètres de deux périodes successives ont ainsi été égalisés à 0. Lors de l'utilisation des fonctions splines de

régression, nous avons limité le nombre de paramètres à estimer en enlevant le dernier nœud de la période.

L'ajustement des modèles a été réalisé par la méthode du maximum de vraisemblance. Un ajustement pas à pas suivant la proposition de Clayton et Schiffler a été utilisé dans toutes les analyses [Clayton and Schifflers 1987; Clayton and Schifflers 1987]. Lors d'ajustement de modèles catégoriels, la significativité des variables a été estimée par un test du rapport de vraisemblance et l'ajustement du modèle par l'examen de la déviance résiduelle [McCullagh and Nelder 1999]. La comparaison des modèles utilisant les splines de régression a été faite en utilisant le critère d'Akaike (AIC) [Burnham and Anderson 1998].

3.2. Modélisation de l'épizootie française

“Modelling the trend of bovine spongiform encephalopathy prevalence in France: use of restricted cubic spline regression in age-period-cohort models to estimate the efficiency of control measures”

Carole Sala*^a, Eric Morignat^a, Christian Ducrot^b, Didier Calavas^a

^a AFSSA-Lyon, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon cedex 7, France

^b INRA, UR 346, F-63122 Saint Genès en Champanelle, France

* Tel.: +33 (0)4 78 72 65 43 ; fax: +33 (0)4 78 61 91 45

E-mail address corresponding author: c.sala@lyon.afssa.fr

Abstract

An age-period-cohort (APC) analysis was used to assess the trend in prevalence of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in France over time in relation to the control measures adopted since onset of the epidemic. Restricted cubic regression splines were used to model the functional forms of the non-linear effects of age at screening, birth cohort and date of diagnosis of the tested animals. The data of the 2001-2007 period of surveillance was analysed using 1-year categorization. A categorical analysis was performed as control to check the accuracy of the sets of knots in the spline models, which were selected according to the Akaike Information Criterion (AIC). Knot selection was based on *a priori* knowledge of the disease and the dates of implementation of the five main BSE control measures. It was assumed that disease prevalence was a function of exposure to BSE and that changes in the exposure of cattle to BSE were mainly due to the control measures. The effects of the five main control measures were discussed in relation to the trend in BSE risk for the successive birth cohorts. The six selected models confirmed that all measures participated in disease control. However, characterization of the respective effect of individual measures was not straightforward due to the very low disease prevalence, incompletely tested cohorts and probably cumulative and overlapping effects of successive measures. The ban of importation of meat and bone meal (MBM) from the UK and the ban of use of MBM in bovines were insufficient to control the epidemic. The decline in the BSE epidemic more likely originated from implementation of the ban of MBM use in all ruminants in 1994, whose effect was probably reinforced by the evolution in perception of the BSE risk following evidence of BSE

transmission to humans. Finally, the respective effects of the last two measures (prohibition of the use of specific risk material in 1996 and total MBM ban in 2000) could not be characterized as they were implemented when the disease trend was already in strong decline.

Keywords: age-period-cohort analysis, BSE, France, restricted cubic spline regression, logistic regression, categorical analysis

3.2.1. Introduction

Bovine spongiform encephalopathy (BSE) was first identified in Great Britain in April 1985 before spreading to most European countries. Primary risk factor studies demonstrated the role of meat and bone meal (MBM) in disease transmission (Wilesmith et al., 1988; Wilesmith et al., 1991; Wilesmith et al., 1992). National and European measures⁹ were therefore adopted to reduce the exposure of cattle to MBM and a complementary passive surveillance of BSE was implemented in some countries. Clinical surveillance of BSE in France began in 1990 and the first French case of BSE was detected in March 1991 (Savey et al., 1991; Calavas et al., 2004). In 1996, the need to reinforce BSE surveillance was emphasized by evidence of a link between BSE and a variant of Creutzfeldt-Jakob disease (Collinge et al., 1996; Will et al., 1996). Plans for large-scale screening surveillance were made possible by the development and successful evaluation of the first rapid tests in 1999 (Moynagh and Schimmel, 1999). Analysis of data from pilot programs revealed that clinical surveillance alone had largely underestimated the level of the epidemic in France (Donnelly, 2000; Calavas et al., 2001a; Calavas et al., 2001b; Calavas et al., 2004; Supervie and Costagliola, 2004), as well as in other European countries (Donnelly et al., 2002). In 2001 a European regulation¹⁰ for exhaustive surveillance was implemented whereby all cattle more than 24 months old were tested, whether slaughtered for human consumption or dead on farm. This considerably improved the quality and quantity of available data and updated knowledge of the epidemic. The most recent epidemiological models have then focused on (re-)evaluation of the size of the epidemic, (re-)estimation of its past, present and future trends and estimation of the efficiency of the control measures (de Koeijer et al., 2004; Calavas et al., 2007; Ru et al., 2007; Schwermer et al., 2007a; Schwermer et al., 2007b; Supervie and Costagliola, 2007). Due to uncertainty about the disease (dose effect, age at infection, incubation period...), and changes in surveillance and the

⁹ http://ec.europa.eu/food/fs/bse/bse15_en.pdf

¹⁰ http://ec.europa.eu/food/fs/bse/bse15_en.pdf

implementation of control measures, different methods were used to estimate the pattern and probable future of the epidemic. Simple statistical methods (La Bonnardière et al., 2004; Morignat et al., 2004; Saegerman et al., 2006) together with more complex modelling which required robust hypotheses regarding disease characteristics and the efficiency of control measures (de Koeijer, 2007; Sugiura and Murray, 2007; Supervie and Costagliola, 2007) were developed. Categorical age-period-cohort (APC) analysis, of intermediate complexity and based on more moderate hypotheses, has also been used successfully in BSE trend analysis (Cohen-Sabas et al., 2004; Sala et al., 2008).

The aim of APC analysis is to estimate the respective effects of age, observation period (calendar time) and cohort (birth time) on the variable of interest, which may be the mortality rate, or the incidence or prevalence of a disease (Holford, 1983; Kupper et al., 1985). Age plays a major role in the occurrence of most diseases and is considered the most important factor in APC models. While age is associated with inherent biological processes, the observation period is associated with external factors that equally and simultaneously affect all cohorts and ages at a specific period of time. The third variable, the cohort, is traditionally constituted in these models by a set of individuals sharing a common experience. Thus the cohort effect is presumed to reflect all events that equally affect all individuals in a cohort, independently of their age and the observation period (Holford, 1992; Yang, 2007).

The most common approach in APC analysis – the one that has been used in previous BSE trend analyses (Cohen-Sabas et al., 2004; Sala et al., 2008) – is to fit categorical regression models on grouped data, using one parameter per level of age, cohort and period (Heuer, 1997; Carstensen, 2007). However, although such models do not require any assumption about the functional form of the effect of the variables, it has been suggested that categorical analysis is not the best way of considering continuous variables (Greenland, 1995b; Boucher et al., 1998; Royston et al., 2006; Carstensen, 2007; Chen et al., 2007). Preferential use of continuous functions such as polynomials, fractional polynomials or splines, has been recommended to describe the effect of age, period and cohort especially when non-linear effects are expected (Durrleman and Simon, 1989; Heuer, 1997; Boucher et al., 1998; Royston et al., 1999; Royston, 2000).

In our study, we used APC analysis with cubic restricted regression splines to estimate the trend of BSE in France over time and evaluate the effect of the control measures. As spline regression requires the definition of knots, and because this definition is questionable, a parallel categorical analysis on the same dataset was included to confirm the accuracy of parameterisation of the spline models. We then estimated the continuous fixed effects of age

at screening, birth cohort and observation period on BSE prevalence. Finally we examined the evolution in relative risk of BSE in successive birth cohorts and discussed the trend in BSE risk in relation to these control measures. For this it was assumed that the BSE prevalence for a given cohort was proportional to its exposure to the BSE agent, and that this exposure would be affected by the successive control measures adopted against the disease.

3.2.2. Material and method

3.2.2.1. The French BSE surveillance system

Compulsory passive surveillance, based on the reporting of clinically suspect animals in farms and during ante-mortem inspection at the abattoir, was implemented in France in December 1990 (Savey et al., 1991). BSE clinically suspected animals were killed and a brain sample sent to the National Reference Laboratory (NRL) in Lyon for confirmation by histological analysis until 2002 and western blot after. In 1999, rapid tests based on the particular properties of the pathological prion protein (PrPres) were developed (Moynagh et al., 1999). Their automation allowed the extension of BSE surveillance, and only those samples that were positive or ambiguous in rapid tests needed to be confirmed by the NRL. Since January 2001, following pilot studies and in addition to clinical surveillance, every bovine over 30 months old entering the food chain has been tested. This active surveillance was reinforced in July 2001 with the implementation of an active surveillance programme on fallen stock for cattle over 24 months old. The minimum age for detection at the abattoir was then reduced to 24 months in July 2001 before being increased again to 30 months in July 2004.

Until December 2007, no change in BSE surveillance for cattle over 30 months occurred, except for a change in the diagnostic tests (rapid tests and test used to confirm the positive status of animals) (Madec et al., 2000; Bencsik et al., 2005; Arzac et al., 2007; Grassi et al., 2008). This may have led to increased sensitivity of the tests but is difficult to measure.

However, it is likely that no tests have been able, up to the present time, to detect the disease more than 6 months before its onset (Grassi et al., 2001; Grassi et al., 2008). Due to the particularity of the survival curve of the French cattle population (80% of cattle die before they are 6 years old) and the length of the incubation period of the disease (mean around 5 years), most infected animals die before being detectable. Therefore, it is likely that fewer than 20% of BSE-infected animals are detected in France despite the exhaustive surveillance.

3.2.2.2. Data and assumptions

We used the 20 million individual data obtained from clinical surveillance, as well as fallen stock and abattoir screening programmes since 2001 and organized them into three data bases maintained by the NRL (AFSSA-Lyon, France) and the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA Theix, France). Whatever the surveillance stream, a negative animal was defined as a bovine for which the rapid test was negative or the positive or ambiguous status was invalidated by the NRL. In contrast, a BSE case was a bovine for which the positive status was confirmed by the NRL.

The data were first merged into a single database using MySQL5.0.15-nt and analysed independently of the surveillance stream, assuming that the age-specific prevalence of BSE did not vary with the surveillance stream (Supervie and Costagliola, 2007). In fact, most of the BSE cases detected at the fallen stock plant were probably showing clinical signs (Cazeau et al., 2004). Moreover, the cases detected at the abattoir should not have been far from the clinical stage of the disease, because the rapid tests do not allow detection of the pathological prion protein (PrP^{Sc}) more than a few months before clinical onset (Grassi et al., 2001; Grassi et al., 2008). No statistically significant difference was found between the distributions of age and year of birth of the tested animals in the different surveillance streams (data not shown).

The data were also selected to limit the bias. Considering that i) BSE surveillance in France was exhaustive since July 1st 2001, ii) the age at testing was changed in July 2001 (from 30 to 24 months) and in July 2004 (from 24 to 30 months), and iii) no BSE case younger than 30 months has been detected in France so far, only those animals more than 30 months old and tested between July 1st 2001 and December 31st 2007 were included in the analysis. All animals born or bred out of France (0.75%) were excluded from the database as their feeding history differed from that of French cattle, due to different farming patterns and discrepancies in BSE regulations between countries. 58,002 (0.3%) animals for which the date of birth and/or date of detection were not available were removed from the analysis. Only the index cases (first BSE case detected in a herd and confirmed by the NRL) were considered. Moreover, atypical BSE cases (positive animals for which unusual features in the electrophoretic profiles of PrPres were observed in western blot analysis) were excluded from the analysis. Indeed recent knowledge and assumptions about atypical BSE suggest that this is a spontaneous disease and that its epidemiological characteristics differ from those of classical BSE (Biacabe et al., 2004; Beringue et al., 2006; Capobianco et al., 2007; Biacabe et al., 2008). Thus 17,247,651 negative animals and 633 classical BSE cases were included in the analysis.

The data were formatted for APC analysis. As the number of animal-years from the total cattle population was not available, we used the tested population as the denominator. We then estimated the BSE prevalence at death. The data were arranged in a two-way table, known as a Lexis diagram (Vandeschrick, 2001), using 1-year intervals with one dimension for the age and the other for the cohort, the period being defined in the diagonal of the diagram by the linear relationship: $\text{period} = \text{age} + \text{cohort}$ (table 3.4). The age included in the model was the age at detection for BSE cases, which corresponded to the age at screening for negative animals. This was computed in complete years, from 2 to 33 years, as the difference between the date of diagnosis (BSE cases) or date of screening (negative animals), and the date of birth. In the case of BSE, the age at detection corresponds to the sum of age at infection and the incubation time, both of which are relatively stable (Anderson et al., 1996; Ferguson et al., 1997; Arnold and Wilesmith, 2004; Supervie and Costagliola, 2004). The probability of detecting a BSE case is closely related to the age at which the animals are tested. Therefore age was entered as the first variable in all models.

We also assumed that, as feeding was the only route of BSE infection for cattle, the successive control measures adopted against BSE infection would be expected to have reduced the infectivity of feedstuffs over time. We therefore supposed that the exposure of successive birth cohorts to BSE, as well as their BSE risk, would have changed over the last twenty years in relation to these measures. The birth cohorts in our study were defined using 1-year time spans, in accordance with farming practices in France, where a birth cohort includes animals born from July 1st of the year under consideration to June 30th of the next year. Thus 35 birth cohorts, from 1970 to 2004, were included in the model.

As we did not expect any period effect in our study, the period was entered as the last variable in the model. Indeed, in the case of BSE, the period effect would mainly be due to variations in the efficiency of the surveillance system and/or changes in the diagnostic tests. Between July 2001 and December 2007, there was no change in the surveillance of BSE in France, either in the efficiency of surveillance, or in the definition of animals tested in each surveillance stream (data controlled). Moreover, we assumed that all diagnostic tests used in that period were equally sensitive and showed little variation in sensitivity over time (La Bonnardière et al., 2004; Grassi et al., 2008).

Finally, we assumed that the variation in exposure of cattle to BSE over time only resulted in a variation in the number of BSE cases in different birth cohorts, so that the BSE prevalence of a given cohort was a function of the exposure of this cohort to BSE. Thus we estimated the evolution of BSE exposure by comparing the BSE risk of successive birth cohorts.

3.2.2.3. Analysis

Data were analysed using R software (R Development Core Team, 2008). The general form of the linear regression models used to determine BSE prevalence was:

$$\log\left(\frac{P_{acp}}{1-P_{acp}}\right) = f(a) + g(c) + h(p) \quad (1)$$

where P_{acp} was the expected prevalence of BSE in the group of age a , cohort c and period p and $f(a)$, $g(c)$ and $h(p)$ were the functions of age, cohort and period.

We used parameterized step functions with dummy variables for f , g and h , to carry out the categorical analysis (Kupper et al., 1985; Agresti, 2002) and restricted cubic regression splines to model the smoothed effects of the continuous variables (Durrleman and Simon, 1989; Heuer, 1997).

A stepwise procedure was used to compute five models (age, age-drift, age-cohort, age-period and age-cohort-period models) for each functional form, according to our hypotheses (main effect of the cohort) and following the recommendations of Clayton and Schifflers (Clayton and Schifflers, 1987a, b).

For all models, parameters were estimated using the maximum likelihood method. Selection of the best models was based on the Akaike Information Criterion (AIC) following the proposal of Burnham and Anderson (Burnham and Anderson, 1998) to retain the model i if $\Delta_i = (\text{AIC}(\text{model}_i) - \text{minAIC}) \leq 2$, where minAIC is the minimum AIC i.e., that of the best model. The goodness of fit was evaluated by examining the residual deviance of the models, which approximately followed a Chi-square distribution (McCullagh and Nelder, 1999).

Restricted cubic regression spline analysis

The non-linear effect of continuous variables was taken into account by considering, for each covariate, the following restricted cubic regression spline written in general B-spline basis function (Heuer, 1997; Green and Silverman, 2000):

$$l(x) = \sum_{i=0}^{m-n-1} v_i B_{i,q}(x) \quad (2)$$

where $l(x)$ was a restricted cubic regression spline for the functional form of f , g and h , $B_{i,q}(x)$ was the B-spline basis vector, v_i the corresponding coefficients, m the number of joint points (knots) and q indicated the order of the B-spline ($q = 4$ for cubic spline). As restricted cubic spline defined on the interval $[a, b]$, the function had continuous first and second derivatives and was forced to be linear on the two extreme intervals $[a \dots x_1]$ and $[x_m \dots b]$. Thus the function

was a combination of cubic polynomials fitting together at joint points or knots so that the function was continuous on the interval [a, b].

The number and location of the knots were selected for the three variables of the model from a set of knots chosen *a priori*. Two knots were estimated sufficient to capture the effect of age, and were selected within the 95% confidence interval of the incubation period (4 to 11 years) estimated by Supervie (Supervie and Costagliola, 2007). The knots of the cohort were chosen in relation to the control measures. Indeed, the effect of the control measures was expected to be detected as a change in the curve of the cohort effect. The knots were therefore located in relation to the five main control measures adopted in France against BSE: i) the ban of the importation of MBM from the United Kingdom (enforcement in 1989, implementation in 1990 if one-year delay), ii) the ban of the use of MBM for bovines in France (enforcement in 1990, implementation in 1991 if one-year delay), iii) the ban of the use of MBM for all ruminants (enforcement in 1994, implementation in 1995 if one-year delay), iv) the prohibition of the use of specified risk material (SRM) (enforcement in 1996, implementation in 1997 if one-year delay) and v) the total ban of the use of MBM for farmed animals (enforcement in 2000, implementation in 2001 if one-year delay). Sets of a maximum of five knots were then explored using nine different locations (1989, 1990, 1991, 1994, 1995, 1996, 1997, 2000 and 2001) to take into account a possible delay in the enforcement of these measures. For period, two knots were placed in 2001 and 2006, dates at which curvatures were expected due to categorisation of the data (figure 3.23). To identify the full age-cohort-period (ACP) model, restrictions were made by removing the last coefficient of the B-spline for the period from the analysis.

According to the AIC criterion, many good models were available. We therefore used the

Akaike weight $w_i = \frac{\exp(-0.5\Delta_i)}{\sum_{r=1}^R \exp(-0.5\Delta_r)}$, where R is the number of selected models, to order these

models and the evidence ratios w_i/w_j of the best model i, which indicated the superiority of this model over the others (Burnham and Anderson, 1998).

Categorical analysis

The data were analysed using the following model with dummy variables:

$$\log\left(\frac{P_{ijk}}{1 - P_{ijk}}\right) = P_0 + \sum_i^I \alpha_i a_i + \sum_j^J \beta_j c_j + \sum_k^K \gamma_k p_k + \varepsilon_{ijk} \quad (3)$$

where a_i , c_j and p_k , ($k=i+j-I$) were the dummy variables for age, cohort and period, α_i , β_j and γ_k the fixed effects for i^{th} age group, j^{th} cohort and k^{th} period respectively, P_{ijk} the expected prevalence of BSE in the group of age i , cohort j and period k , ε_{ijk} the stochastic error and P_0 the log of the odds of the reference group.

As is usual for such a design, reference groups were defined as the categories with the highest non-adjusted prevalence so that $\alpha_6 = \beta_{1994} = \gamma_{2001} = 0$. However, the over parametrization of the full *ACP* model could not be solved by equalizing three parameters of the model at zero. We therefore applied the method of minimal additional constraint (Oppenheim Mason et al., 1973; Barrett, 1978; Kupper et al., 1985) by equalizing the effect of two successive periods so that, $\gamma_{2001} = \gamma_{2001} = 0$ in the full *ACP* model.

3.2.3. Results

The results of the analyses were expressed as the Odds Ratio (OR) with 95% confidence interval (CI). In the case of BSE, which is a low prevalence disease, the OR could be considered as an approximation of the relative risk (RR) ('BSE risk' later in the text), i.e. the risk for an animal of age a , cohort c tested at period p to be detected as a BSE case compared to the same risk for an animal in the reference group (age 6 years, cohort 1994, period 2001).

Whatever the analysis (spline or categorical) and according to the AIC criterion, the best models were the full *ACP* models which gave a highly satisfactory goodness of fit ($p=1$) (tables 3.5 and 3.6). The results of the regression spline models were in accordance with those of the categorical analysis, indicating adequate parametrization of the selected spline models and accurate hypotheses for the position of the knots. The only discrepancies in the results of both models concerned the widths of the 95% CI which were smaller for the spline models and the absence of an estimated OR for extreme categories in the categorical model. This was due to the capacity of the regression spline to use between-categorical information to better estimate the ORs (Greenland, 1995b; Heuer, 1997; Boucher et al., 1998), whereas the categorical model was unable to give an exact estimation, due to few or missing data for these specific time periods.

3.2.3.1. Spline regression

104 models were fitted, of which six full *ACP* models with $\Delta_i \leq 2$ were retained (table 3.5). These showed two knots at 4 and 7 years for age, five knots for cohort (1989 or not, 1990 or not, 1991 or not, 1995, 1996, 2000 or 2001), and two knots in 2001 and 2006 for period. The

different arrangements of the knots for cohort are presented in table 3.2. Consideration of the AIC weights and the evidence ratio of the best model (model 1) did not indicate a superiority of this model over the others. Moreover, all six selected models gave the same results for age and period effects but differed slightly concerning the cohort effect. We present the results of model 1 for age and period effects and the results of models 1, 4 and 5 for cohort effect, where different knot locations were used.

BSE risk increased with age up to 5 years-old and then decreased (figure 3.24a). Five and 6 year-old animals had the same higher BSE risk while animals under 5 years were less at risk as were animals over 6 and under 17 years. No conclusion could be drawn about animals more than 17 years old because of the large CI. For the period effect the period from 1999 through 2001 was apparently less at risk but no significant trend was observed for the following years (figure 3.24c). Concerning the cohort effect, the results of models 1, 4 and 5 were the same for animals born after July 1993 while some discrepancies were noted for older cohorts, related to the set of knots used in the regression (figure 3.24b). Animals born from July 1993 through June 1995 therefore exhibited the same higher BSE risk, and a steady decrease in the risk was observed for animals born after July 1995. Animals born from July 1990 through June 1993 (model 1) or from July 1988 through June 1993 (models 4 and 5) had a significant lower BSE risk. No conclusion could be drawn for animals born before this.

3.2.3.2. Categorical analysis

The results of the categorical analysis showed a similar pattern to that of the spline analysis but the CIs, especially for the extreme categories, were less precise (figure 3.25).

No conclusions could therefore be drawn about animals less than 4 years old or more than 14 years old either because the CI were too wide or no estimate was available (figure 3.25a). Similarly, it was not possible to estimate the BSE risk for animals born before June 1990 (CI included 1) or after June 2001 (no estimate available) (figure 3.25b). Finally, the period effect showed a similar pattern in both spline and categorical regressions, with no significant trend observed in the evolution of BSE risk with the year of detection, although the risk in year 2000 appeared to be lower (figure 3.25c).

3.2.4. Discussion

The aim of the study was to estimate the trend in BSE prevalence in France over time in relation to control measures adopted since the onset of the epidemic.

3.2.4.1. Method

In classical APC analysis, data are arranged in a two-way contingency table with one dimension for age and period, the cohort being defined in the diagonal of the diagram. The data are grouped using same width intervals for age and period, whereas the cohort, calculated from the linear relationship “period = age + cohort” has double overlapping intervals (Vandeschrick, 2001; Carstensen, 2007). In order to get precise estimates for the cohort effect, we chose in our study to calculate the period instead of the cohort. In fact, we expected no or little period effect and a predominant cohort effect on the evolution of BSE prevalence. Moreover, to limit the loss of information due to grouping the data (Greenland, 1995b, a), we used 1-year intervals. This time span was adequate to estimate the smoothed effects of the variables. It also avoided the irregularity resulting from the seasonal nature of cattle exposure to BSE in France (Sala et al., 2006) which is observed when 6-month intervals are used (results not shown).

To identify the full *ACP* model, we used the method of minimal additional constraint by equalizing two parameters of only one of the covariates (the period) (Oppenheim Mason et al., 1973). In fact, over-parametrization occurs in APC analysis when age, period and cohort are entered in the model simultaneously. This is due to the exact linear dependency of the three variables, so that the model is not identifiable (Holford, 1983). The non-identifiability of APC models is a well known problem that remains unsolved. The usual constraint, which consists of taking one level of age, period and cohort as reference groups, is not sufficient to identify the full APC model. In the absence of any additional constraint, the model is unable to differentiate the respective effects of cohort and period. However, for any different additional constraint applied to one parameter of the model, the estimated effects for the same dataset can be completely different, despite the same goodness of fit (Oppenheim Mason et al., 1973; Rodgers, 1982; Holford, 1985; Kupper et al., 1985; Heuer, 1997). Different approaches were explored to solve this problem but no ideal solution was found. Thus, despite the fact that choice of the minimal additional constraint has a major impact on the pattern observed for the estimated age, period and cohort parameters, we chose to use this method, which is a very common and relevant way to identify APC models, because we had *a priori* knowledge of the specific effect of one of the three variables. In our study, the constraints applied to the “period” parameters were the lowest constraints we could apply to the model (Holford, 1992). We adjusted the models using logistic regression, which is an unusual method in APC analyses, where Poisson regression is used almost exclusively. However, in contrast to most studies addressing the question of disease incidence and using the number of person-years at

risk as the denominator, we focused our analysis on the prevalence of BSE at death, using the tested population as the denominator.

The choice of continuous function to model the effect of the variables was guided by the need to simultaneously take into account the non-linearity of the effect of the covariates and their continuous character. Categorical models are commonly used in epidemiological studies when non-linear effects of variables are expected because they do not require any hypothesis on the functional form of the effect of the variables (Heuer, 1997; Carstensen, 2007). However it has been emphasized that such a model is not the most appropriate one for continuous variables (Greenland, 1995b, a; Boucher et al., 1998; Royston et al., 2006; Carstensen, 2007; Chen et al., 2007; Harrel, 2008). As the categorical model is sensitive to data categorization, an initial problem arises when the boundaries and number of categories for the continuous variables are defined. The use of the response variable to define an “optimal” cut point leads to a bias in the estimated effect of the variables (Altman, 1994; Royston et al., 2006; Chen et al., 2007). When automatic procedures, such as percentile methods, are used, a problem occurs if the risk is not uniformly distributed through the data (Greenland, 1995b; Boucher et al., 1998). The categories need to be very narrow to limit the influence of data stratification and subjectivity of the analysis. However, the number of categories and associated parameters increase dramatically and the categorical model rapidly becomes unfeasible (Greenland, 1995b; Carstensen, 2007). Another limitation of categorical analysis is that data grouping leads to a loss of information. In addition, the model does not use all the information available, especially within-category information, which results in a loss of power and lack of precision or bias when estimating the effects of the variables (Greenland, 1995b, a; Boucher et al., 1998; Royston et al., 2006; Chen et al., 2007; Harrel, 2008). This was confirmed in our study where the CIs in the spline analysis were thinner than in the categorical model and the categorical model was unable to estimate OR for extreme categories. Finally, the categorical model assumes a discontinuity in the response variable and piecewise constant rates in each category for continuous response and continuous variables, respectively, which is unrealistic. To model the continuous effects of age, period and cohort we therefore preferred the spline approach to the other available methods, such as fractional polynomials (Royston et al., 1999), because of its great flexibility and easy implementation. Indeed, splines have already been successfully used in similar studies (Heuer, 1997; Carstensen and Keiding, 2005; Holford et al., 2006; Remontet et al., 2007; Belot et al., 2008). They are not overly sensitive to data categorisation and allow risk variations between categories to be taken into account. We used specifically restricted cubic splines, which are combinations of cubic polynomials fitting

together at joint points called knots so that different cubic polynomials are used to adjust the data on either side of each knot. Restricted cubic splines were smooth and flexible enough to describe the effect of age, period and cohort, and more stable than unrestricted splines at the boundaries, where very few cases and incomplete cohorts were observed (Durrleman and Simon, 1989; Heuer, 1997). Finally we chose to use regression splines. Although such splines require the determination of an adequate location and number of knots, they are linear in the parameters, so that the results of the models are easier to interpret than with smooth splines. As the knots we placed in our models were very close to each other, we used B-spline basis functions, instead of the more intuitive truncated power basis spline (TP-spline) function. The properties of the former are in fact better when the knot positions are extremely close to each other (Heuer, 1997). In fact, the knots we placed were very close together due to i) the short observation period (July 2001- December 2007), ii) the width of the incubation period (95% of cases are detected between 4 and 11 years of age) and iii) the width of the time span for which inflexions in the curve were expected for the cohort effect in relation to the control measures.

In the absence of *a priori* assumptions concerning knot location, different methods can be used to locate an appropriate number of knots (Durrleman and Simon, 1989; Heuer, 1997; Marsh and Cormier, 2002). In our study *a priori* knowledge of the epidemiological characteristics of BSE was used to select the knots independently of the response, as is recommended. The two knots for the observation period were fixed in 2001 and 2006, dates at which fictitious curvatures were expected due to the applied method of data categorisation (figure 3.23). We determined the knots location for age in the 95% CI of the BSE incubation period estimated previously (Supervie and Costagliola, 2007). As the knots were not directly derived from the curve of the incubation period calculated by these authors, the choice of knots was independent of the response variable. Finally, the number and location of knots for the cohort were defined to determine the efficiency of the control measures. We made use of the properties of spline knots, which are points where inflexions occur in the curve and placed the knots in relation to the dates of enforcement of the five main BSE control measures which had a potential effect on the level of BSE risk. We took into account a possible one-year delay needed to implement each measure in the field by testing different combinations of dates. We presumed that the best model would have the best location and number of knots. Such a model would therefore provide an indication of the dates of the effective implementation of these measures, while the shape of the curve following a knot would be directly related to the previous control measure. By considering both the location of the knots and the trend of BSE

risk, we should then be able to estimate the dates of implementation and effects of the selected control measures.

Finally a categorical analysis was performed in parallel. This enabled us to check the accuracy of knot selection and the absence of over-estimation of the effect of the variable which can be associated with spline modelling. We were also able to assess the improvement in the analysis resulting from the use of splines to estimate the BSE trend.

Both the method and the hypotheses seemed appropriate as our results were in accordance with those of previous studies. The use of splines also improved the estimation of BSE risk especially in the more recent birth cohorts.

3.2.4.2. Age, period and cohort effects

As our study addressed a specific period of time when no change occurred in the BSE surveillance system we expected no or little period effect. However, the best models were full *ACP* models in which, the period effect was significant even though any linear trend was evidenced throughout the observation period. This significance was probably due to a non-linear effect such as an artefact resulting from the structure of the dataset in relation to the design of the calculated period. When we compared the crude BSE prevalence from 2001 to 2007 with the prevalence of the calculated period used in the analysis (1999 to 2007 with a 2-year overlap (figure 3.23)), we detected a discrepancy due to a change in the distribution of BSE cases and animals tested per year. The evolution in prevalence for the real and calculated periods was not the same and the fitted models might have detected a non-linear effect for the period. Another possible explanation was that the type of rapid tests used for the post-mortem diagnosis of BSE varied during the period of interest (Arsac et al., 2007; Grassi et al., 2008). In the absence of comparative studies of the sensitivity of rapid tests in the field, we could not exclude the possibility that a variation in test characteristics and uses might be responsible for the period effect observed in our study.

Concerning the age effect, the results of the models, with the highest risk for animals 4 to 6 years old, were in accordance with previous studies, in which the estimated mean incubation period was between 4.5 and 6.5 years, with infection occurring before 12 months of age (Arnold and Wilesmith, 2004; Supervie and Costagliola, 2004, 2007).

As expected, a strong cohort effect was detected. Although some discrepancies were noted in the results for the oldest cohorts with models 1, 4 and 5, all three models indicated the same overall evolution of BSE risk along the successive birth cohorts. All models showed a dramatic decrease in BSE risk for animals born after July 1995, probably due to the efficiency of the

control measures. The results were in accordance with previous studies, based on more restricted datasets, which revealed a peak in BSE risk for animals born from July 1993 through June 1995 (La Bonnardière et al., 2004; Morignat et al., 2004; Supervie and Costagliola, 2004). This peak followed an increased BSE risk for animals born between July 1988 (models 4 and 5) or 1990 (model 1) and June 1993, despite the initial control measure adopted in 1990. None of our models was able to properly estimate the BSE risk for animals born before July 1988 (models 4 and 5) or 1990 (model 1). Thus the analysis could not explain the increase in the risk for animals born between July 1990 and June 1993. This was probably due to the characteristics of the dataset. Indeed, only data from the exhaustive surveillance set up since July 1st 2001 were used so few animals were tested and a very small number of BSE cases were detected in the oldest cohorts. The conclusion in previous studies, using data available before June 2000 and based on back-calculation, was that the number of BSE infections had increased in animals born between July 1991 and June 1995. We assumed that this second peak of infection was due to the recycling of infectious material, as a consequence of a first peak of infections that occurred in the late 80's, despite the implementation of control measures (Supervie and Costagliola, 2004, 2007).

In summary, although the use of recent data prevented us from exploring the risk of BSE in the oldest cohorts, the models did provide an insight into the evolution of this risk in recent years, which had not been possible with previous models applied to less recent data.

3.2.4.3. Assessment of the efficiency of the control measures

The spline analysis resulted in the selection of six models which adjusted the data equally (table 3.5). It was apparent from each model that the five measures needed to be considered together to better adjust the data. This suggested that each of the five control measures had a significant effect on the evolution of BSE prevalence.

The portion of the curve of the cohort effect on both sides of each knot was examined to characterize the impact of each control measure on the trend of the disease. We assumed that the shape of this part of the curve would be related to the control measure for which the date of implementation corresponded to the knot. Thus a change in the trend around the knot would indicate an effect of the corresponding control measure.

It was apparent that six different sets of knots for the birth cohort gave almost the same results (figure 3.24b). This corresponded to two possibilities for the location of knots for the first two measures and the last one. We then estimated that the measure adopted in August 1989 was implemented between July 1989 and June 1991, those of July 1990 between July

1989 and June 1992 and the measure of December 2000 between July 2000 and June 2002. As all models fitted the data equally, the date of the effective implementation of these measures could not be defined more precisely. This could be due to the fact that the birth cohorts concerned by these measures were incompletely tested, especially at the age at which the risk of detection was maximal (around 6 years) (figure 3.24a). For the 1994 and 1996 measures, all the models gave single dates for their effective implementation in 1995 and 1996 respectively (i.e., between July 1995 and June 1996, and between July 1996 and June 1997, respectively).

Thus the shape of the curve around the knots and the global trend of the BSE risk indicated that each of the five measures seemed to participate in controlling the risk of BSE but differently affected the evolution of BSE prevalence (figure 3.24b). The ban on import of British MBM (August 1989) seemed to initially contribute in reducing the number of BSE infections in France. However, neither this nor the ban of MBM in cattle feed adopted in July 1990 were sufficient to control the BSE epidemic, since the BSE risk increased for animals born between the late 80's and June 1995. As discussed previously, this increase in BSE risk was probably due to the recycling of contaminated material through cross-contaminations (Supervie and Costagliola, 2004). Concerning the measure of December 1994 (ban of the use of MBM for all ruminants), the change in the curve around the 1994 birth cohort did not indicate that the measure was linked to decline of the epidemic. Indeed, the models estimated that the measure occurred when the trend was already decreasing, with the corresponding knot located in 1995, 1 year after the inflexion in the curve. However, if a 6-month delay was needed to implement the 1994 measure in the field (which is a realistic assumption) and the use of concentrate feedstuffs is higher in Autumn (Hoinville et al., 1995; Donnelly et al., 1997; Arnold and Wilesmith, 2004; Sala et al., 2006), then the 1994 measure would only have had a relevant effect on the 1995 birth cohort (animals born from 1st July 1995), despite its effective implementation in 1994. Thus the 1994 control measure was probably responsible for the change in the trend of BSE risk observed around the 1994 birth cohort. Finally, the effect of the 1996 and 2000 measures on the trend of BSE risk - prohibition of the use of SRM and total MBM ban respectively- was difficult to estimate, since each was implemented when the risk of BSE was already decreasing steadily (figure 3.2b). Although our dataset largely covered the lifespan of cohorts preceding and following the final measure (seven and a half years after enforcement of the total ban in December 2000) and was thus perfectly designed to estimate its efficiency (Calavas et al., 2007), we were unable to characterize the effect of the total ban of MBM. This was probably linked to the fact that there were already very few BSE cases in the

cohorts preceding this ban and that the cohorts potentially affected by this measure were incompletely tested.

In summary, although the models indicated that each of the five measures studied could have participated in controlling the risk of BSE, the characterization of their respective effects was not straightforward. This was probably due to a combination of different factors. Firstly, our study was limited in time and incomplete information for the oldest and youngest birth cohorts may have led to a lack of power. Secondly the BSE was always of very low prevalence, especially in more recent years. Finally, the control measures were implemented over a short period of time, each measure complementing the previous ones. We were better able to estimate the cumulative effect of the measures than the respective effect of each one. In addition, during the same period of time an evolution occurred in the perception of BSE risk. Thus although the 1994 measure initiated a decrease in the epidemic, the evidence of BSE transmission to humans in 1996 probably had an additional effect on decline of the epidemic, impact on the collective consciousness that such a disease should be taken seriously and that the regulations in force had to be strictly observed.

The use of regression spline in APC analysis to model the effects of covariates is a novel and complementary approach in BSE trend analysis. By making better use of the available information, restricted cubic splines better adjusted the APC models to the data than categorical models and allowed estimation of the smoothed effects of the three main factors influencing BSE prevalence, i.e., age, cohort and period. The effect of the control measures in relation to the trend in BSE prevalence over time could then be discussed through the yearly change in the birth cohort effect. However, as in previous studies, accurate evaluation of the efficiency of the control measures was limited by the few data available for the most ancient and recent cohorts and the low disease prevalence. Moreover, probable overlapping of the control measure effects, combined with growing collective awareness, and the fact that our analysis was carried out during a period when the epidemic was already declining, contributed to the difficulty of evidencing the respective effects of individual control measures. The limits of this APC analysis, which was solely based on the information available, could reside in the fact that the model is sensitive to missing data and especially to the number of incomplete cohorts. A more complete dataset, implying a longer observation period, would probably extend the information that could be derived from such a model.

Acknowledgments

The authors thank Dr Dominique Costagliola INSERM for her helpful comments on method and discussion. We thank Jean-Luc Vinard AFSSA-Lyon for his help in management of datasets. We also thank Diana Warwick for English editing of the manuscript.

References

- Agresti, A., 2002. *Categorical Data Analysis*. Wiley-Interscience.
- Altman, D.G., 1994. Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *J Nat Cancer Inst* 86, 829-835.
- Anderson, R.M., Donnelly, C.A., Ferguson, N.M., Woolhouse, M.E., Watt, C.J., Udy, H.J., MaWhinney, S., Dunstan, S.P., Southwood, T.R., Wilesmith, J.W., Ryan, J.B., Hoinville, L.J., Hillerton, J.E., Austin, A.R., Wells, G.A., 1996. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 382, 779-788.
- Arnold, M.E., Wilesmith, J.W., 2004. Estimation of the age-dependent risk of infection to BSE of dairy cattle in Great Britain. *Prev Vet Med* 66, 35-47.
- Arsac, J.N., Biacabe, A.G., Nicollo, J., Bencsik, A., Baron, T., 2007. Biochemical identification of bovine spongiform encephalopathies in cattle. *Acta Neuropathol* 114, 509-516.
- Barrett, J.C., 1978. The redundant factor method and bladder cancer mortality. *J Epidemiol Community Health* 32, 314-316.
- Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.V., Molinie, F., Danzon, A., Bara, S., Bouvier, A.M., Tretarre, B., Binder-Foucard, F., Colonna, M., Daubisse, L., Hedelin, G., Launoy, G., Le Stang, N., Maynadie, M., Monnereau, A., Troussard, X., Faivre, J., Collignon, A., Janoray, I., Arveux, P., Buemi, A., Raverdy, N., Schwartz, C., Bovet, M., Cherie-Challine, L., Esteve, J., Remontet, L., Velten, M., 2008. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 56, 159-175.
- Bencsik, A., Debeer, S., Baron, T., 2005. An Alternative Pretreatment Procedure in Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies Diagnosis Using PrPsc Immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 53, 1199-1202.
- Beringue, V., Bencsik, A., Le Dur, A., Reine, F., Lai, T.L., Chenais, N., Tilly, G., Biacabe, A.G., Baron, T., Vilotte, J.L., Laude, H., 2006. Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy. *PLoS Path* 2, e112.
- Biacabe, A.G., Laplanche, J.L., Ryder, S., Baron, T., 2004. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep* 5, 110-115.

- Biacabe, A.G., Morignat, E., Vulin, J., Calavas, D., Baron, T.G., 2008. Atypical bovine spongiform encephalopathies, France, 2001-2007. *Emerg Infect Dis* 14, 298-300.
- Boucher, K.M., Slattery, M.L., Berry, T.D., Quesenberry, C., Anderson, K., 1998. Statistical methods in epidemiology: a comparison of statistical methods to analyze dose-response and trend analysis in epidemiologic studies. *J Clin Epidemiol* 51, 1223-1233.
- Burnham, K.-P., Anderson, D.-R., 1998. *Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach*. Springer U.S.A.
- Calavas, D., Ducrot, C., Baron, T.G., 2004. Past, present and future of bovine spongiform encephalopathy in France. *Curr Top Microbiol Immunol* 284, 51-63.
- Calavas, D., Ducrot, C., Morignat, E., 2001a. Prévalence de l' ESB chez les bovins à risque - Résultats et enseignements de deux programmes de tests en France. *Bulletin Epidémiologique DGAl-Afssa*, 1-2.
- Calavas, D., Morignat, E., Ducrot, C., 2001b. Programmes de surveillance active de l'ESB dans trois catégories de bovins à risque - Analyse des résultats. <http://www.afssa.fr/ftp/basedoc/syntheseresultatsesb.pdf>.
- Calavas, D., Supervie, V., Morignat, E., Costagliola, D., Ducrot, C., 2007. Complementary approach of data analysis and modelling to estimate the pattern of the BSE epidemic: the example of France. *Risk Anal* 27, 1141-1150.
- Capobianco, R., Casalone, C., Suardi, S., Mangieri, M., Miccolo, C., Limido, L., Catania, M., Rossi, G., Di Fede, G., Giaccone, G., Bruzzone, M.G., Minati, L., Corona, C., Acutis, P., Gelmetti, D., Lombardi, G., Groschup, M.H., Buschmann, A., Zanusso, G., Monaco, S., Caramelli, M., Tagliavini, F., 2007. Conversion of the BASE Prion Strain into the BSE Strain: The Origin of BSE? *PLoS Path* 3, 1-31.
- Carstensen, B., 2007. Age-period-cohort models for the Lexis diagram. *Stat Med* 26, 3018-3045.
- Carstensen, B., Keiding, N., 2005. Age-Period-Cohort models: statistical inference in the Lexis diagram. p. unpublished manuscript at www.biostat.ku.dk/~bxc/APC.
- Cazeau, G., Ducrot, C., Collin, E., Desjouis, G., Calavas, D., 2004. Questionnaire analysis of BSE cases in France detected by active surveillance and the reasons for non-notification. *Vet Rec* 154, 133-136.
- Chen, H., Cohen, P., Chen, S., 2007. Biased odds ratios from dichotomization of age. *Stat Med* 26, 3487-3497.
- Clayton, D., Schifflers, E., 1987a. Models for temporal variation in cancer rates. I: Age-period and age-cohort models. *Stat Med* 6, 449-467.

- Clayton, D., Schiffers, E., 1987b. Models for temporal variation in cancer rates. II: Age-period-cohort models. *Stat Med* 6, 469-481.
- Cohen-Sabas, C.H., Heim, D., Zurbriggen, A., Stärk, K.D., 2004. Age-period-cohort analysis of the Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) epidemic in Switzerland. *Prev Vet Med* 66, 19-33.
- Collinge, J., Sidle, K.C.L., Meads, J., Ironside, J., Hill, A.F., 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383, 685-690.
- de Koeijer, A., Heesterbeek, H., Schreuder, B., Oberthur, R., Wilesmith, J., van Roermund, H., de Jong, M., 2004. Quantifying BSE control by calculating the basic reproduction ratio R_0 for the infection among cattle. *J Math Biol* 48, 1-22.
- de Koeijer, A.A., 2007. Analyzing BSE transmission to quantify regional risk. *Risk Anal* 27, 1095-1103.
- Donnelly, C.A., 2000. Likely size of the French BSE epidemic. *Nature* 408, 787-788.
- Donnelly, C.A., Ferguson, N.M., Ghani, A.C., Anderson, R.M., 2002. Implications of BSE infection screening data for the scale of the British BSE epidemic and current European infection levels. *Proc Biol Sci* 269, 2179-2190.
- Donnelly, C.A., Ferguson, N.M., Ghani, A.C., Woolhouse, M.E.J., Watt, C.J., Anderson, R.M., 1997. The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. I. Epidemiological processes, demography of cattle and approaches to control by culling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological* 352, 781-801.
- Durrleman, S., Simon, R., 1989. Flexible regression models with cubic splines. *Stat Med* 8, 551-561.
- Ferguson, N.M., Donnelly, C.A., Woolhouse, M.E.J., Anderson, R.M., 1997. The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. II. Model construction and analysis of transmission dynamics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352, 803-838.
- Grassi, J., Comoy, E., Simon, S., Créminon, C., Frobert, Y., Trapman, S., Schimmel, H., Hawkins, S.A.C., Moynagh, J., Deslys, J.P., Wells, G.A.H., 2001. Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. *Vet Rec* 149, 577-582.
- Grassi, J., Maillet, S., Simon, S., Morel, N., 2008. Progress and limits of TSE diagnostic tools. *Vet Res* 39, 33.
- Green, P.-J., Silverman, B.-W., 2000. Nonparametric regression and generalized linear models - A roughness penalty approach. Chapman and Hall/Crc.
- Greenland, S., 1995a. Avoiding power loss associated with categorization and ordinal scores in dose-response and trend analysis. *Epidemiology* 6, 450-454.

- Greenland, S., 1995b. Dose-response and trend analysis in epidemiology: alternatives to categorical analysis. *Epidemiology* 6, 356-365.
- Harrel, F., 2008. Problems caused by categorizing continuous variables. <http://biostat.mc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/Main/CatContinuous>, 2008. Accessed on 26.3. 2009.
- Heuer, C., 1997. Modeling of time trends and interactions in vital rates using restricted regression splines. *Biometrics* 53, 161-177.
- Hoinville, L.J., Wilesmith, J.W., Richards, M.S., 1995. An investigation of risk factors for cases of bovine spongiform encephalopathy born after the introduction of the feed ban. *Vet Rec* 136, 312-318.
- Holford, T.R., 1983. The Estimation of Age, Period and Cohort Effects for Vital Rates. *Biometrics* 39, 311-324.
- Holford, T.R., 1985. An alternative approach to statistical age-period-cohort analysis. *J Chronic Dis* 38, 831-840.
- Holford, T.R., 1992. Analysing the temporal effects of age, period and cohort. *Stat Methods Med Res* 1, 317-337.
- Holford, T.R., Cronin, K.A., Marietto, A.B., Feuer, E.J., 2006. Changing Patterns in Breast Cancer Incidence Trends. *J Natl Cancer Inst Monographs*, 19-25.
- Kupper, L.L., Janis, J.M., Karmous, A., Greenberg, B.G., 1985. Statistical Age-Period-Cohort Analysis: A Review and Critique. *J Chronic Dis* 38, 811-830.
- La Bonnardière, C., Calavas, D., Abrial, D., Morignat, E., Ducrot, C., 2004. Estimating the trend of the French BSE epidemic over six birth cohorts through the analysis of the abattoir screening in 2001 and 2002. *Vet Res* 35, 299-308.
- Madec, J.-Y., Belli, P., Calavas, D., Baron, T., 2000. Efficiency of Western blotting for the specific immunodetection of proteinase K-resistant prion protein in BSE diagnosis in France. *Vet Rec* 146, 74-76.
- Marsh, L.-C., Cormier, D.-R., 2002. Spline regression models. Sage Publications Iowa.
- McCullagh, P., Nelder, J.-A., 1999. Generalized linear models. Chapman and Hall/Crc.
- Morignat, E., Ducrot, C., Roy, P., Cohen, C., Calavas, D., 2004. Prevalence of BSE in cattle found dead euthanased or emergency slaughtered on farms in western France in 2000 - 2001 and 2002. *Vet Rec* 155, 481-486.
- Moynagh, J., Schimmel, H., 1999. Tests for BSE evaluated. Bovine spongiform encephalopathy. *Nature* 400, 105.

- Moynagh, J., Schimmel, H., Kramer, G., 1999. The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. European Commission.
- Oppenheim Mason, K., Mason, W.M., Winsborough, H.H., Poole, W.K., 1973. Some methodological issues in cohort analysis of archival data. *Am Sociological Rev* 38, 242-258.
- R Development Core Team, 2008. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found Stat Comput.
- Remontet, L., Bossard, N., Belot, A., Esteve, J., 2007. An overall strategy based on regression models to estimate relative survival and model the effects of prognostic factors in cancer survival studies. *Stat Med* 26, 2214-2228.
- Rodgers, W.L., 1982. Estimable functions of age, period, and cohort effects. *Am Sociological Rev* 47, 774-787.
- Royston, P., 2000. A strategy for modelling the effect of a continuous covariate in medicine and epidemiology. *Stat Med* 19, 1831-1847.
- Royston, P., Altman, D.G., Sauerbrei, W., 2006. Dichotomizing continuous predictors in multiple regression: a bad idea. *Stat Med* 25, 127-141.
- Royston, P., Ambler, G., Sauerbrei, W., 1999. The use of fractional polynomials to models continuous risk variables in epidemiology. *Int J Epidemiol* 28, 964-974.
- Ru, G., Maurella, C., Ponti, A.M., Ingravalle, F., Caramelli, M., 2007. Epidemiological study of the decline of BSE in Italy. *Vet Rec* 161, 511-514.
- Saegerman, C., Speybroeck, N., Vanopdenbosch, E., Wilesmith, J.W., Berkvens, D., 2006. Trends in age at detection in cases of bovine spongiform encephalopathy in Belgium: an indicator of the epidemic curve. *Vet Rec* 159, 583-587.
- Sala, C., Morignat, E., Calavas, D., 2008. Contribution du modèle Age-Période-Cohorte à l'étude de l'Encéphalopathie spongiforme bovine en France: évolution de la prévalence au cours de la période 2001-2007. *Epidemiol Sante Anim* 53, 85-95.
- Sala, C., Morignat, E., Roy, P., Ducrot, C., Calavas, D., 2006. Seasonality of exposure of cattle to BSE in France. In: *Neuroprion (Ed.), Prion 2006, Strategies, advances and trends towards protection of society*, Torino, Italy, pp. 117 (RA-110).
- Savey, M., Belli, P., Coudert, M., 1991. Le réseau d'épidémiosurveillance de la BSE en France : principes — premiers résultats. *Epidemiol Sante Anim* 19, 49-61.
- Schwermer, H., Brulisauer, F., De Koeijer, A., Heim, D., 2007a. Evaluation of the effectiveness of selected measures against bovine spongiform encephalopathy (BSE) in Switzerland by use of the basic reproduction ratio R_0 . *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 120, 189-196.

-
- Schwermer, H., de Koeijer, A., Brulisauer, F., Heim, D., 2007b. Comparison of the historic recycling risk for BSE in three European countries by calculating the basic reproduction ratio R_0 . *Risk Anal* 27, 1169-1178.
- Sugiura, K., Murray, N., 2007. Estimating the prevalence of BSE in dairy birth cohorts and predicting the incidence of BSE cases in Japan. *Prev Vet Med* 82, 213-235.
- Supervie, V., Costagliola, D., 2004. The unrecognised French BSE epidemic. *Vet Res* 35, 349-362.
- Supervie, V., Costagliola, D., 2007. Estimating incidence of the French BSE infection using a joint analysis of both asymptomatic and clinical BSE surveillance data. *Math Biosci* 209, 90-107.
- Vandeschrick, C., 2001. The Lexis diagram, a misnomer. *Demographic Res* 4, 97-124.
- Wilesmith, J.W., Ryan, J.B.M., Atkinson, M.J., 1991. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec* 128, 199-203.
- Wilesmith, J.W., Ryan, J.B.M., Hueston, W.D., 1992. Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bone meal inclusion in proprietary concentrates. *Res Vet Sci* 52, 325-331.
- Wilesmith, J.W., Wells, G.A.H., Cranwell, M.P., Ryan, J.B.M., 1988. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec* 123, 638-644.
- Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousens, S.N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., Smith, P.G., 1996. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet* 347, 921-925.
- Yang, Y., 2007. Age-Period-Cohort Distinctions. In: Markides, K.S. (Ed.), *Encyclopedia of Health and Aging*. Sage Publication, pp. 20-22.

Figure 3.23 - Comparison of the BSE prevalence between the crude and calculated observation period using the linear relationship $\text{period} = \text{age} + \text{cohort}$.

When observation period is calculated, an overlap occurs so that a calculated period is from July 1st of the year under consideration to June 30th of the next year.

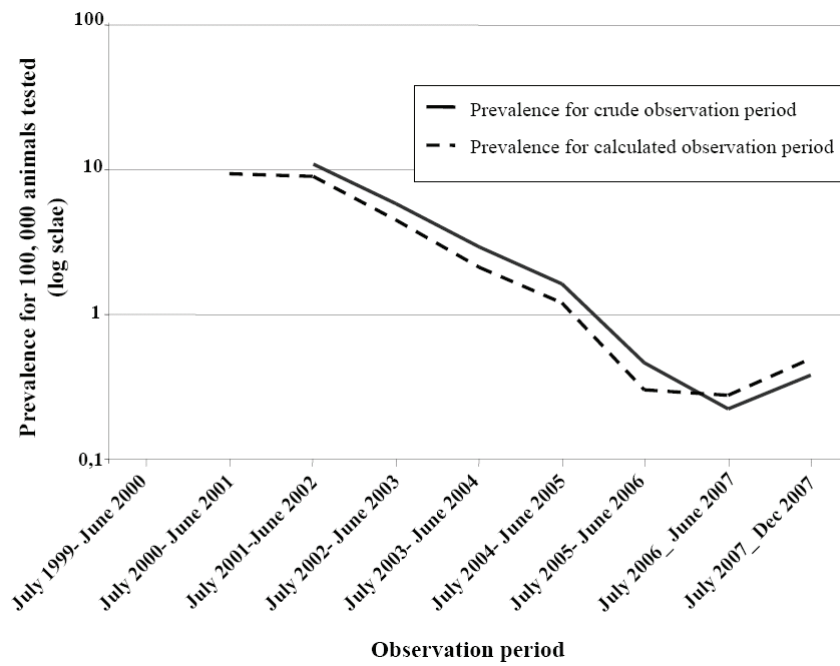
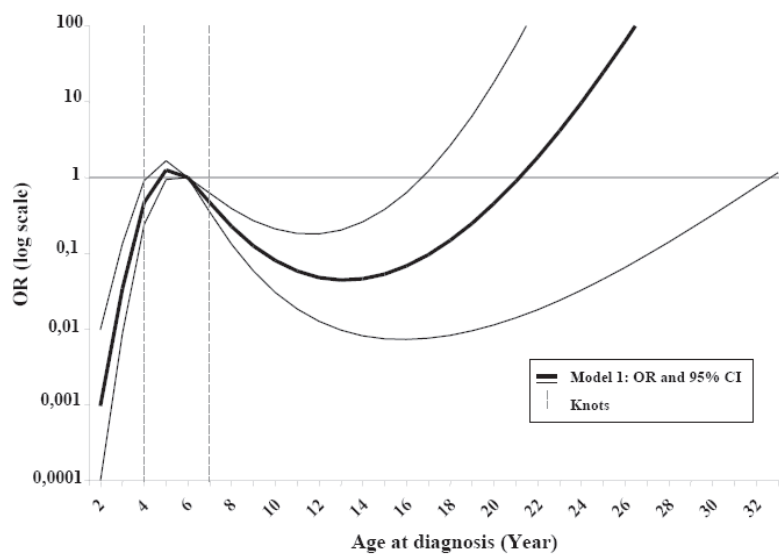
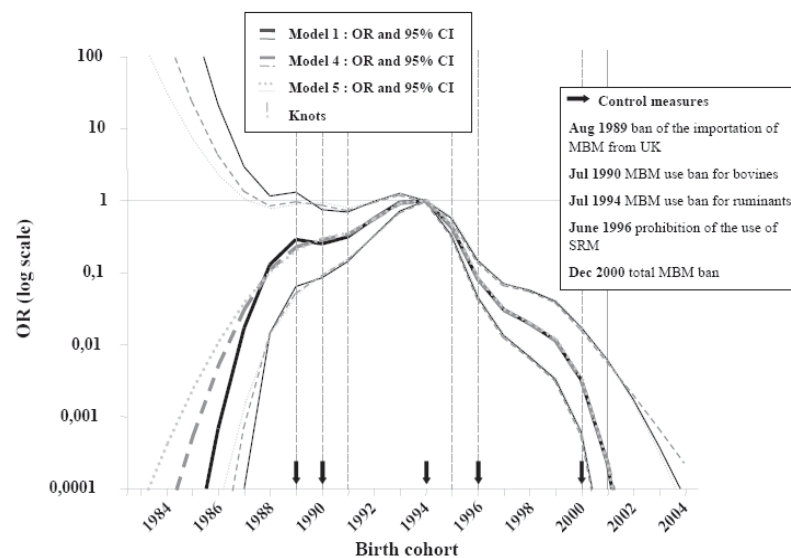


Figure 3.24 - Smoothed effects of the age at testing (a), birth cohort(b) and observation period (c) using restricted cubic regression splines in age-cohort-period models.

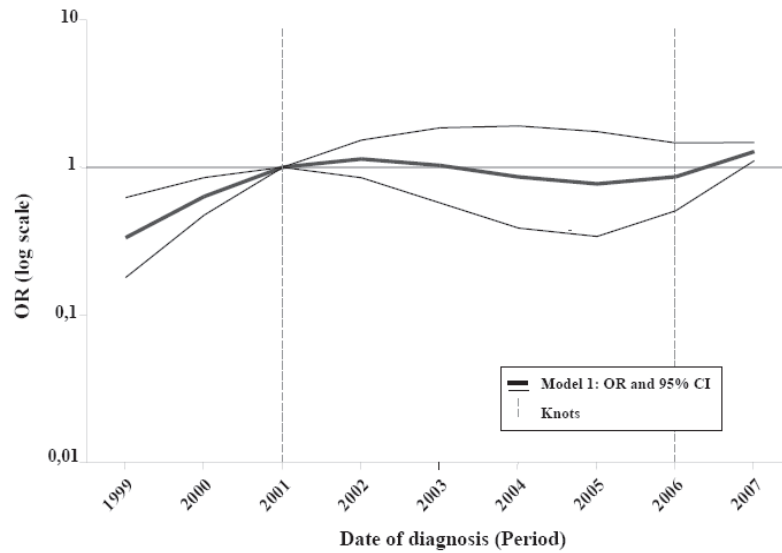
Effects are expressed in OR with 95 % CI, plotted on log scale, and correspond to the risk of BSE for a specific age, cohort or period relatively to the age reference group (6 years), reference cohort (1994) and reference period (2001). The birth cohort is defined from July 1st of the year under consideration to June 30th of the next year. The observation period is defined from July 1st of the year X under consideration to June 30th of the year X+2. Concerning the age and period effects, only the results of the model 1 were plotted because all the selected models gave same results. Concerning the cohort effect we presented the results using the three following sets of knots: 1989, 1990, 1995, 1996 and 2001 in model 1, 1989, 1991, 1995, 1996 and 2000 in model 4 and 1990, 1990, 1995, 1996 and 2001 in model 5. Birth cohorts for which very low ORs and very large CIs were obtained were not represented (cohorts 1970 to 1985).



(a)



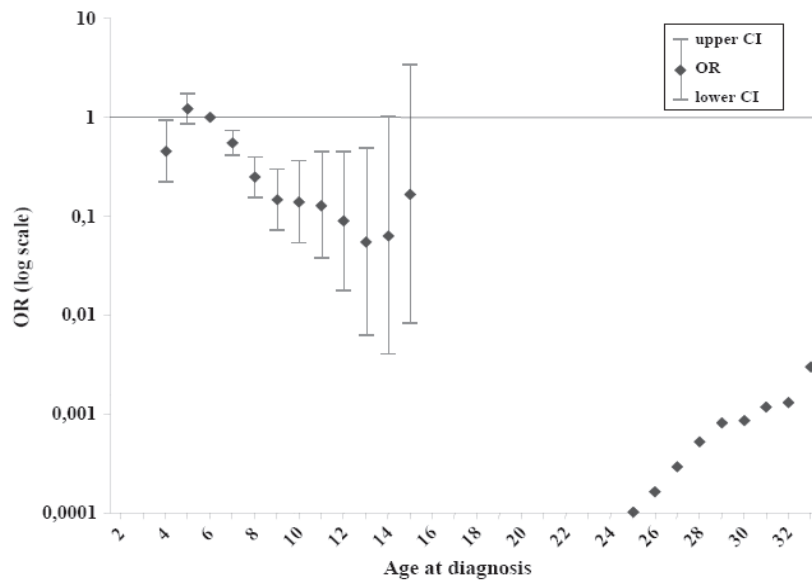
(b)



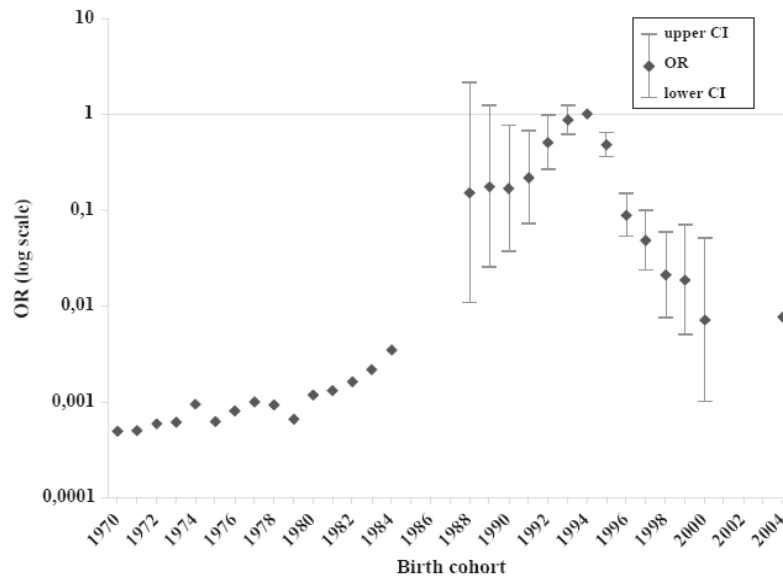
(c)

Figure 3.25 - Effects of the age at testing (a), birth cohort (b) and observation period (c) using age-cohort period model with parameterised step functions to model the effects of the covariates (categorical analysis).

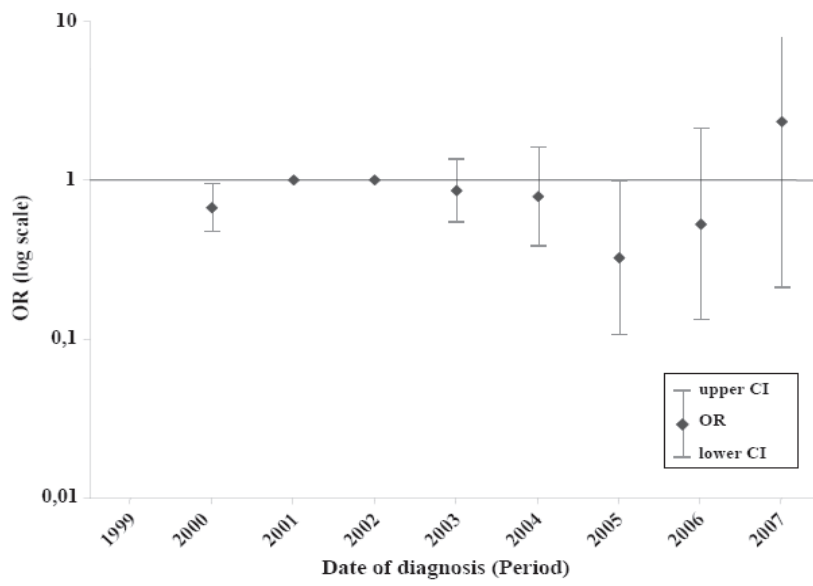
Effects are expressed in OR with 95 % CI, plotted on log scale (null values and very large CI are not represented), and correspond to the risk of BSE of a specific age, cohort or period relatively to the age reference group (6 years), the reference cohort (1994) and the reference period (2001). The age is in complete years. The birth cohort is defined from July 1st of the year under consideration to June 30th of the next year. The observation period is defined from July 1st of the year X under consideration to June 30th of the year X+2.



(a)



(b)



(c)

Table 3.4 - Age-cohort Lexis diagram: prevalence and number of cases per age and birth cohort in France from July 2001 to December 2007.

Data are arranged in 1-year intervals. The calculated periods are 2-year intervals and are defined in the diagonals of the diagram. The birth cohorts 1970 to 1987 and 2001 to 2004, in which no case has been detected, are not presented.

AGE (years)		Age-specific prevalence per 10 000 tested animals (Number of cases)													PERIOD			
															P=A+C	Boundaries		
																	1999	July1999-June2001
																	2000	July2000-June2002
																	2001	July2001-June2003
																	2002	July2002-June2004
																	2003	July2003-June2005
																	2004	July2004-June2006
																	2005	July2005-June2007
																	2006	July2006-Dec2007
																	2007	July2007-Dec2007
A	Boundaries	Total tested																
2	[2-3[2,410,135																
3	[3-4[3,602,914																
4	[4-5[2,348,569																
5	[5-6[1,964,321																
6	[6-7[1,655,334																
7	[7-8[1,343,432																
8	[8-9[1,041,215																
9	[9-10[791,833																
10	[10-11[597,024																
11	[11-12[456,262																
12	[12-13[338,807																
13	[13-14[249,031																
14	[14-15[176,217																
15	[15-16[117,074																
16	[16-17[73,207																
17	[17-18[42,501																
18	[18-19[21,874																
19	[19-20[10,226																
		Total tested	144,502	207,611	274,81	361,997	478,871	635,146	838,098	1,064,437	1,328,478	1,664,467	2,241,769	2,184,715	1,854,413			
		Boundaries	July1988- June1989	July1989- June1990	July1990- June1991	July1991- June1992	July1992- June1993	July1993- June1994	July1994- June1995	July1995- June1996	July1996- June1997	July1996- June1998	July1998- June1999	July1999- June2000	July2000- June2001			
		C	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000			

Table 3.5 - Details on the six best models using spline regression: knot location for the cohort, AIC, AIC weight, evidence ratio, residual deviance, degrees of freedom and p-value.

N° model	Location of the knots for the cohort						AIC	W _i	Evidence ratio (model 1)	Residual deviance	Df	p-value ¹
	1989	1990	1991	1995	1996	2000 2001						
1	×	×		×	×	×	288.68	0.19	1.00	88.92	230	1
2	×	×		×	×	×	288.72	0.19	1.02	88.95	230	1
3	×		×	×	×	×	288.95	0.17	1.14	89.19	230	1
4	×		×	×	×	×	288.98	0.16	1.16	89.22	230	1
5		×	×	×	×	×	289.24	0.15	1.32	89.47	230	1
6		×	×	×	×	×	289.27	0.14	1.34	89.50	230	1

AIC, Akaike Information Criterion

W_i, AIC weight, $w_i = \frac{e(-0.5\Delta_i)}{\sum_{r=1}^R e(-0.5\Delta_r)}$, $\sum e(-0.5\Delta_r) = 5.22$ and $\Delta_i = (AIC(model_i) - \min AIC)$, where minAIC is the

minimum AIC i.e., the AIC of the model 1

Evidence ratio of model 1 = w₁/w_i, I=(1...6)

Df, degree of freedom

¹ goodness of fit test

Table 3.6 - Categorical analysis: stepwise adjustment of the APC models using parameterised step functions.

n°	Model	AIC	Residual deviance	df	p-value ¹
0	Null		1925.30	241	
1	Age	1198.10	958.36	210	0.000
2	Age-drift	613.95	372.19	209	0.000
3a	Age-cohort	404.71	96.94	176	1
3b	Age-period	597.64	341.88	202	0.000
4	Age-cohort-period	395.37	73.60	169	1

AIC, Akaike Information Criterion

df, degree of freedom

¹ goodness of fit test

3.3. Comparaison de l'évolution de l'épizootie en France et en Italie : analyse catégorielle et examen des différences secondes

“Time trends in exposure of cattle to bovine spongiform encephalopathy and cohort effect in France and Italy: value of the classical Age-Period-Cohort approach”

Carole Sala*¹, Giuseppe Ru²

¹AFSSA-Lyon, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon cedex 7, France

²CEA-Instituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, 10154 Torino, Italy

* corresponding author

E-mail addresses:

CS: c.sala@lyon.afssa.fr

GR: giuseppe.ru@izsto.it

Abstract

Background

The Age-Period-Cohort (APC) analysis is routinely used for time trend analysis of cancer incidence or mortality rates, but in veterinary epidemiology, there are still only a few examples of this application. APC models were recently used to model the French epidemic assuming that the time trend for BSE was mainly due to a cohort effect in relation to the control measures that may have modified the BSE exposure of cohorts over time. We used a categorical APC analysis which did not require any functional form for the effect of the variables, and examined second differences to estimate the variation of the BSE trend. We also reanalysed the French epidemic and performed a simultaneous analysis of Italian data using more appropriate birth cohort categories for comparison.

Results

We used data from the exhaustive surveillance carried out in France and Italy between 2001 and 2007, and comparatively described the trend of the epidemic in both countries. At the end, the shape and irregularities of the trends were discussed in light of the main control measures adopted to control the disease. In Italy a decrease in the epidemic became apparent from 1996, following the application of rendering standards for the processing of specific risk

material (SRM). For the French epidemic, the pattern of second differences in the birth cohorts confirmed the beginning of the decrease from 1995, just after the implementation of the meat and bone meal (MBM) ban for all ruminants (1994).

Conclusion

The APC analysis proved to be highly suitable for the study of the trend in BSE epidemics and was helpful in understanding the effects of management and control of the disease. Additionally, such an approach may help in the implementation of changes in BSE regulations.

3.3.1. Background

The first case of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) was described in 1986 in the United Kingdom, where the disease became noticeable from 1987. In spite of early evidence of the role of meat and bone meal (MBM) in transmission of the disease in the United Kingdom [1, 2] and the implementation of the ban on the use of MBM for feeding ruminants, the epidemic extended rapidly to most European countries. In 1996, evidence of BSE's transmission to humans [3, 4] led to one of the most important European food crises, underlining the need for Europe-wide regulations to fight the disease. One major challenge was the possibility of extending BSE surveillance in order to estimate the extent of the epidemic in European countries. During 1999, rapid and accurate post-mortem diagnostic tests were developed and introduced for the monitoring of BSE (Amendment of Commission Decision (EC) 98/272). Initial partial testing programmes revealed that BSE prevalence, when based only on the reporting of clinically suspect animals, was largely underestimated. Then in all European countries (European regulation (EC) No 999/2001 and Amendments), from July 2001 on, screening programmes were enforced so that all cattle over 24 months of age (subsequently changed to 30 months), whether slaughtered for human consumption, dead-on-farm or euthanized, had to be tested. The implementation in Europe of this exhaustive surveillance plan meant that the BSE status of countries, an estimate of the extent of the epidemic and its evolution could be updated year by year.

In the last few years, very few BSE cases have been detected in Europe while there has been a downward trend in the disease in all the affected countries [5]. European countries were variously affected by the BSE epidemics. Recent questions have also addressed the comparison of how BSE evolved differently in each country and the role of the successive national and European control measures adopted since the onset of the epidemic.

Various methods have been used to estimate BSE's prevalence and evolution over time [6-10]. Among these methods, the age-period-cohort (APC) models have proved to be well adapted to studying BSE [11, 12], as they enable the three main factors influencing BSE prevalence to be taken into account: the age and period at which animals are tested and their birth cohort. Mobilising few hypotheses on disease characteristics and efficiency of control measures, the method should be useful for studying and comparing BSE epidemics trends in different countries.

In our study, we analysed Italian and reanalysed French BSE data in parallel, with a more appropriate data categorisation and method, in order to characterise and compare BSE trends in both countries, as they experienced different types of BSE epidemics. We carried out an APC analysis using two main assumptions: i) the evolution of BSE's prevalence over time was mainly due to the cohort effect, ii) the BSE prevalence of a given cohort was proportional to its exposure to BSE and thus proportional to its BSE risk. We estimated the respective effects of age and birth cohort on the BSE risk, after adjusting for the period when necessary. Using the second differences of the estimated parameters, we have characterised the dynamic of the BSE trends, and examined it in the light of the main control measures adopted to reduce exposure of cattle to the BSE agent in France and Italy.

3.3.2. Method

3.3.2.1. Sources and nature of data

The first French BSE surveillance system, based on reporting of clinically suspect animals in farms and at ante-mortem inspections in abattoirs, was implemented in December 1990. In 1999, the development of rapid tests enabled the implementation of large-scale screening programmes which were first restricted to at-risk animals in 2000 and then extended, from January 2001, to all cattle over 30 months of age entering the food chain. This abattoir screening plan was reinforced with the implementation of an active surveillance plan for fallen stock, so that, from 1 July 2001, in accordance with European regulations (European Regulation (EC) 999/2001) and in addition to the clinical surveillance, all dead cattle over 30 months old were tested in France. The individual data provided by the three surveillance streams were stored in databases maintained by the *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments* (AFSSA-Lyon, France) and the *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA Theix, France).

In Italy the active surveillance plan implemented in January 2001 was based on the screening of all animals entering the food chain or dead-on-farm. Subsequently, since the beginning of 2001, all animals over 30 months of age slaughtered and all animals over 24 months of age subject to emergency slaughters or dead-on-farm have been tested. The electronic databases containing the individual data from both surveillance streams were controlled and maintained by the *Centro di Referenza nazionale per le Encefalopatie Animali* (CEA) to which the regional laboratories send analysis results on a monthly basis.

3.3.2.2. Data management and assumptions

We used data from the BSE surveillance streams in place since 1 January 2001 and 1 July 2001, dates of the implementation of the exhaustive surveillance in Italy and France respectively. As was previously done for the French BSE analysis [12], data were merged into single database, one for each country, and analysed independently of the surveillance stream. Animals - especially BSE cases - born or bred outside France and Italy were excluded from the analysis. We considered that such animals may have different feeding histories than those of native cattle, due to specific farming patterns and variations in the implementation of BSE regulations (Table 3.7). Cases of Atypical BSE were also excluded because of recent knowledge of its epidemiological characteristics compared to those of the classical disease [13-16]. Considering that the threshold age for testing varied during the period of interest from 24 to 30 months, and that no BSE case in cattle younger than 30 months old was detected either in France or in Italy, only animals over 30 months of age were included in the analysis. In the end, 17,247,651 negative-tested animals and 633 classical BSE cases were included in the French database and 4,506,951 negative-tested animals and 131 BSE cases in the Italian database (Table 3.8).

The data were arranged in two-way tables using one-year intervals, with one dimension for the age and the other for the cohort. The period was defined in the diagonal by the linear relation: $\text{period} = \text{age} + \text{cohort}$ and had two-year intervals with a one-year overlap (Figure 3.26). As the probability of detecting a BSE case is closely related to the age at which animals are tested [10, 17-19], the age in complete years (age at detection for BSE cases and age at screening for negative-tested animals) was systematically included and entered as the first variable in the models. Unlike previous French analyses [12], the birth cohort was defined from 1 January to 31 December, since this method required only the knowledge of the animals' year of birth. Because a significant cohort effect was expected, the cohort was entered as the second variable in the full APC models. Finally, as in previous French analyses,

we assumed that the period effect, if any, would mainly be due to variations in the efficiency of surveillance systems and evolution of the diagnostic tests [12]. In both countries there was no indication of relevant changes occurring over time in the respective surveillance systems during the period studied. No strong period effect was thus expected. The period was entered as the last variable in the full APC models.

Lastly, as the total cattle population in both countries was not available, we used the tested cattle population as the denominator to model BSE prevalence at death.

3.3.2.3. Measures enforced to control the BSE epidemic in both countries

European and national regulations for both France and Italy were reviewed and listed to describe differences in the time of enforcement for each country. A basic summary of the main measures taken in the two countries is provided in Table 3.7. The relevant measures were considered to be: (1) the ban on the use of meat and bone meal (MBM) for cattle (*feed ban*) or for all farmed species (*total feed ban*), (2) the measures involving the removal of specified risk material (SRM) from the processing of MBM dedicated to animal feed (*prohibition of SRM use*) and (3) the sterilisation of MBM at 133°C, 3 bar and for 20 minutes (*standards for safe rendering*). Although similar measures were enforced in both countries, France applied them earlier than Italy.

3.3.3. Analysis

Datasets were analysed with R software [20] using the following logistic model with dummy variables:

$$\log\left(\frac{P_{ijk}}{1-P_{ijk}}\right) = P_0 + \sum_i^I \alpha_i a_i + \sum_j^J \beta_j c_j + \sum_k^K \gamma_k p_k + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

where a_i , c_j and p_k , ($k=i+j-I$) were the dummy variables for age, cohort and period, α_i , β_j and γ_k were the fixed effects for i^{th} age group, j^{th} cohort and k^{th} period respectively, P_{ijk} the expected prevalence of BSE in the group of age i , cohort j and period k , ε_{ijk} the stochastic error and P_0 the log of the odds of the reference group. Reference groups were defined as the categories with the highest unadjusted prevalence so that $\alpha_6 = \beta_{1995} = \gamma_{2001} = 0$ for the French data and $\alpha_5 = \beta_{1996} = \gamma_{2001} = 0$ for the Italian data (Table 2). For the French data, a second model was fitted with the cohort with the highest adjusted prevalence as a reference to facilitate interpretation of the results ($\alpha_6 = \beta_{1994} = \gamma_{2001} = 0$).

To perform the APC analyses of each dataset, we used, as previously [12, 21], the stepwise procedure recommended by Clayton and Schiffler [22, 23] (Table 3) and fitted the full APC models by equalising the effect of two successive periods so that $\gamma_{2001} = \gamma_{2002}$.

The significance of the effect of each new variable added to the model was assessed by the log-likelihood ratio test (Table 3). The goodness of fit was evaluated by an examination of the residual deviance of the models, which approximately follows a Chi-square distribution [24].

In addition, we calculated the second differences on a log-scale:

$$\alpha_{i-1} - 2\alpha_i + \alpha_{i+1} \quad (2)$$

$$\beta_{j-1} - 2\beta_j + \beta_{j+1} \quad (3)$$

to estimate the local curvature at specific points for the age and cohort. For the period, because of its overlapping intervals, we used the average of adjacent second differences:

$$((\gamma_{k-1} - 2\gamma_k + \gamma_{k+1}) + (\gamma_k - 2\gamma_{k+1} + \gamma_{k+2})) / 2 \quad (4)$$

To facilitate interpretation, the second differences were plotted on a logarithmic scale as the corresponding contrasts (local curvature in Figures 3.27 and 3.28) between adjacent categories: a contrast of one indicates a constant trend, an estimate of more than one indicates acceleration and finally a contrast estimate of less than one is associated with an attenuation of the trend in prevalence [23].

3.3.4. Results

Effects of variables were expressed as the Odd Ratio (OR) with 95% confidence intervals (CIs). In the case of BSE, the OR could be considered as a good approximation of the relative risk (RR) of BSE (subsequently referred to in the text as the BSE risk) i.e., the risk for an animal of age a , birth cohort c and tested at period p , of being a BSE case compared to the same risk for an animal in the reference groups, in which $OR = 1$.

3.3.4.1. French data

The results are presented in Table 3.9 and Figure 3.27. According to the goodness of fit and the log-likelihood ratio tests, the best model was the age-cohort (AC) model, with a highly satisfactory fit ($p=1$). Unlike previous French analyses [12], adding the period effect did not improve the model further ($p=0.052$).

However, results for age and cohort effects did not differ from those previously obtained. Five- and six-year-old animals had the same highest risk of BSE, while animals older than seven years and younger than 16 years presented a significantly lower risk as well as four-

year-old animals. Concerning the BSE risk for the birth cohort, animals born in 1993 and 1994 showed the highest risk while animals born in 1990, 1991 and 1992 had a lower, but increasing, BSE risk. There was a clear decline in risk for animals born in and after 1995. It was not possible to draw any conclusions for animals born before January 1990 and after January 2002, either because CIs included 1 or no estimates were available.

The examination of second differences for the cohort effect showed significant irregularities in the BSE risk trend around the 1994, 1995 (deceleration) and 1996 (acceleration in trend) birth cohorts.

3.3.4.2. Italian data

Although the two BSE epidemics showed a similar decline over time, the results of the APC analysis for the Italian data (Table 3.9 and Figure 3.28) differed from those of the French data. The best model was the full APC model with a very good fit ($p = 0.996$) and statistically significant period effect ($p = 0.017$). However, the AC model also had a very satisfactory goodness of fit ($p = 0.907$) and showed similar results for age and cohort effects (Figure 3.28). Despite the fact that the period effect was significant, the BSE risk (in terms of OR) did not differ from one observation period to another, since all CIs included 1. However, the second differences showed two irregularities around the periods 2001 (acceleration) and 2002 (deceleration of the trend) in which the effect of the period deviated from the overall flat linear trend.

Considering the age effect, although the BSE risk did not differ significantly for the three- to six-year-old animals, an increasing risk from three to five years is suggested, whereas animals from seven- to 11-year-old included, presented a significantly lower risk. For the cohort effect, animals born from January 1992 to December 1995 had the same higher risk of BSE compared to that of animals born in 1996 (no clear peak as in France was evident). An initial apparent decreasing trend was evidenced for animals born after 1995. Afterwards the risk decreased steadily for animals born from January 1996 to December 2001 with the exception of animals born in 1999. In addition, the examination of second differences showed irregularities around the 1996 (deceleration) and 1998 (acceleration in trend) birth cohorts.

3.3.5. Discussion

Using APC modelling to study the time trend of BSE epidemics, we assumed that the trend of the disease was mainly related to the cohort effect itself, due to the control measures adopted

to reduce the BSE exposure of cattle. We expected that the irregularities of the time trend for the cohort effect, corresponding to the curvatures, could be in connection with the main national and European measures implemented in France and Italy to control the disease.

3.3.5.1. Method and assumptions

We used a classical APC categorical analysis with one-year data categorisation. Such categorisation of the data (calculation of the period variable and time span) was based on the same assumptions as those discussed in previous studies [12, 25-27].

The use of a categorical analysis for continuous variables was strongly criticised, as it was noted that such a method was not appropriate [26, 28-31]. In previous studies, we discussed the respective advantages and disadvantages of categorical and continuous APC analyses [12]. Instead of applying the function to continuously model the effect of age, cohort and period effect, we preferred a categorical analysis to compare French and Italian BSE epidemics. Indeed, the introduction of the categorical analysis was easier, as it did not require the choice of functional form to model the effect of the variables, nor the selection of knots, needed by spline regression. We estimated that the categorical approach, even if it suffered from a lack of precision and/or performance in estimating the effects of the variables - especially for extreme categories - would be sufficient to compare global BSE trends. In addition, and where we previously used knots when spline modelling, we used second differences to estimate trend changes in the effects of the variables. We assumed that the examination, for the cohort effect, of global trends and second differences combined, may help in estimating when the control measures became effective and their impact on the disease trend. Additionally, second differences indicating local changes around a specific time did not depend on the constraint used to identify the model [23].

The identification of the full APC model was based on the same assumption as those used in previous French analyses. Firstly, a significant cohort effect was expected. We assumed that i) feeding was the major, if not only, route of BSE infection for cattle [1, 32, 33] and ii) the successive control measures adopted against BSE played the main role in reducing the infectivity of feedstuff over time. Conversely, we expected no or very little period effect as no known change occurred in the surveillance system in either country during the time period of interest. Thus, to identify the full APC model, we used the minimal additional constraint [34] and equalised the effect of two successive periods. We assumed that constraining the parameters of the period would have had a minimal impact on the estimation of the age and

cohort effects. Results obtained confirmed the accuracy of our hypothesis regarding primary age and cohort effects.

3.3.5.2. Results and characterisation of the effect of control measures

The non-linear period effect identified in the Italian analysis could be an artefact due to the design of the study. The significant acceleration of the trend around the 2001 period (second differences over 1) could be related to the particular categorisation of the data which artificially created 1999-2000 periods and discrepancy between the prevalence of the 1999 and 2001 periods. A similar unexpected period effect had already been identified in previous French APC analyses [12, 21]. The lack of a period effect in the current French analysis, where data categorisation differed from that of previous studies, favoured the artefactual nature of the period effect. However, although we could not completely exclude a minor real period effect in connection with a change in sensitivity of diagnostic tests over time [35, 36], such a period effect did not impact on the estimation of the age and cohort effects.

Thus, reanalysing and analysing French and Italian datasets confirmed that the peak of the BSE risk involved animals aged five to six years at testing. This result was consistent with previous estimates of a very young age at infection (under one year of age) and an incubation period of around five years [10, 18, 37].

In line with our hypotheses and previous studies, the models evidenced a strong cohort effect in both countries [37, 38]. The results of the French analysis were in line with those previously obtained with the same model or different approaches [7, 12, 37, 39]. The first significant increasing BSE risk trend was evidenced for the 1990-1993 birth cohorts. As discussed in the spline analysis of French data, this increase followed an initial peak of infection and was probably linked to cross-contamination and recycling of infectious material, demonstrating the inefficiency of the initial control measures adopted in 1989 and 1990 in France. Then, the “second” peak of exposure - and the only one we evidenced in our analysis - was reached for animals born in 1993 and 1994. Considering the one-year delay in implementation of the control measure, the extension of the MBM ban to all ruminants (1994) coincided with the start of the decline of the epidemic (1995). The deceleration in trend around the 1995 birth cohort could be connected with the inversion of the trend at the peak, while the acceleration in the declining trend in 1996 might be related to the enforcement of the ban on the use of SRM and (after few months) of the new standards for rendering systems. These results were in accordance with results obtained with the spline method, in which selected models indicated curve changes in 1995 and 1996.

With regard to the results of the Italian analysis, the pattern of the BSE risk for birth cohorts appeared to be similar to that of the French data but with a one-year time delay, which is similar to the delay that occurred in the application of the control measures. Unlike the French results, no significant BSE risk peak was evidenced. Because of the few cases available for analysis, the declining pattern in the trend between 1992 and 1995 showed very large confidence limits for the annual estimates. The feed ban implemented in 1994 did not result in a steady decline as suggested by the deceleration in the trend in 1996, and this is consistent with previous studies that suggested the potential role of cross contamination in feed mills [38]. Only the combined effect of the 1997 partial SRM ban and the improvement in rendering standards helped accelerate the declining trend. The temporary peak in the 1999 cohort may also suggest that the partial SRM ban was only partially effective.

To date, the number of BSE cases diagnosed in the most recent cohorts is very small and testing of those cohorts is still incomplete: therefore, our analysis did not enable us to assess the effectiveness of the most recent European control measure, i.e., the total MBM feed ban enforced since January 2001. However, the few cases recently detected have mostly been in animals born in the 1990s and so far, only two BSE cases in cattle born after 1 January 2001 have been detected in France and Italy (one French animal born 1 January and one Italian animal born in January 2001[40]).

The classical categorical approach combined with the examination of second differences gave similar results to those obtained with the use of regression splines in modelling the functional form of the covariates. Easier to implement than the continuous method, categorical analysis has enabled a comparison of the time trends experienced by different populations. Currently our approach is being extended to a wider range of countries affected by the BSE epidemic [41].

Conclusion

As shown, the APC approach is, in general, particularly appealing when studying time trends in health problems affecting populations that may have very long latencies and in which the age of individuals, the cohort and/or the year of diagnosis are important factors to take into account. Therefore, the APC analysis was highly suitable for the study of the time trend of a disease such as BSE in cases where adequate hypotheses make it possible to disentangle the effects of the three main factors (i.e. age at diagnosis, birth cohort and period of animal testing) affecting the prevalence of BSE.

Authors' contributions

CS collected the French data, performed the data analyses and drafted the manuscript. GR collected the Italian data, supervised the data analyses and participated in the drafting of the manuscript. Both authors read and approved the final manuscript.

Appendix

The APC models were firstly developed in demographic sciences where they were practical tools for interpreting mortality data. They proved to be well-adapted to all topics in which the age of individuals at the time of the event, their birth cohort and the observation period were influencing factors [27, 42]. Then, ever since Frost [43] introduced APC models to epidemiology, they have played a crucial role in epidemiological studies, where they are still routinely used for time trend analysis of incidence or mortality rates [44-50]. In this matter, the aim of the APC analysis is to estimate the respective effects of age, period (calendar time) and cohort (birth time) on the variable of interest, either the specific mortality rate, or the incidence or prevalence of a disease. In the APC models, age is considered as being the most important influencing factor since it plays a major role in the occurrence of most diseases. While age is associated with inherent biological processes, the observation period is associated with external factors that have an equal and simultaneous effect on all the cohorts and ages at a specific period of time. In these models, the third variable, the birth cohort, is traditionally made up of a set of individuals sharing common experience so that the cohort effect is presumed to reflect all the events that affect all the individuals of a cohort equally, independently of their age and observation period [51, 52].

Classically, before using any formal APC analysis, incidence data – i.e. number of cases and person-years as the denominator – are arranged in a two-way contingency table, better known as the Lexis diagram, with one dimension for the age and the other for the period, the cohort being defined by the diagonal of the diagram [27, 42]. It is recommended to group data using the same interval width (e.g. one-, five- or 10-years) for the two main dimensions while the third dimension is calculated from the two others using the linear algebraic relationship: cohort = period - age. This way of identifying the third variable leads to an overlap of its intervals which are double those of the other variables (Figure 3.26).

Originally, before the development of the analytical approach, the APC method was essentially based on a graphical analysis of the plots of the observed rates of the Lexis diagram to describe the effect of age, period and cohort. Despite the fact that the most common approach

is currently based on statistical methods, it is still recommended to plot such graphs before carrying out any analysis (Figure 3.29) [25, 38, 53]. This ensures that the categorisation of the data is adequate for obtaining stable rates across age groups, periods and cohorts and that the hypothesis of the additive effect of the model's variables is correct [54]. The most common approach to analysing the data, even if it is not the best one for continuous variables [29], is to fit categorical log-linear Poisson regression models with one parameter per level of age, cohort and period. The following model is also used, assuming the effect of additive variables on the log-scale:

$$\log(\lambda_{ijk}) = \lambda_0 + \sum_i^I \alpha_i a_i + \sum_j^J \beta_j p_j + \sum_k^K \gamma_k c_k + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

where λ_{ijk} is the disease rate of the group of age i , period j and cohort k , λ_0 an intercept, a_i , p_j and c_k (where $k=j-i+I$) the dummy variables for the age, period and cohort, α_i , β_j and γ_k the fixed effects for the i^{th} age group, j^{th} period and k^{th} cohort and ε_{ijk} the stochastic error. However, such a model is not identifiable since an over-parametrisation of the model occurs when the three variables are simultaneously entered in it, due to the exact linear dependency between the age, period and cohort. This non-identifiability problem of the full APC model is an old, well-known problem and, despite many suggestions, the question has still not been satisfactorily solved. The usual constraint, consisting in taking one level of age, period and cohort as a reference, i.e. equalising one parameter of each variable to 0, is not sufficient for identifying the model. The model is not capable of differentiating the respective effects of the age, period and cohort. Considering that the effect of each variable could be separated into linear (trend or drift) and non-linear parts (curvature), the linear components of the effects of the covariates cannot be estimated altogether [34, 54, 55].

An attractive solution could be to use two-factor models, i.e. AC or AP models, in which the estimates are possible. However, it was pointed out that these models require strong assumptions with regard to the non-effect of the removed variable and therefore, this solution may be not appropriate in many situations. Using interactions in two-factor models was also proposed, as the period and cohort could be considered as the interaction between age and cohort and age and period respectively. However it was noted that such interactions were very specific forms of interactions whose effects were not all accessible and complicated to interpret [51, 54].

Nevertheless, it has been demonstrated that a minimal additional constraint, equalising to 0 the effect of two levels of one of the covariates,

$$\alpha_i = \alpha_{i+x} = 0 \text{ or } \beta_j = \beta_{j+x} = 0, \text{ or } \gamma_k = \gamma_{k+x} = 0 \quad (2)$$

is sufficient for identifying the model [34, 56]. However, such a constraint is often arbitrary and each different additional constraint, used on the same dataset, may provide completely different estimates of the effects of the variables, despite the same quality of fit, so that it is difficult to know which model is the most appropriate [34, 54, 55, 57]. Using multiple constraints was then proposed, i.e. equalising more than two levels of one or more variables. Under these conditions, if the different sets of constraints used are still providing different estimates of the parameters, different degrees of fit are also provided, so that it is possible to estimate which model is the most appropriate one [34]. Such a process tends to be a stepwise procedure, successively removing one or two variables from the model by equalising all its parameters to 0.

Later, another stepwise procedure was proposed by Clayton and Schiffler [23]. Considering that the effect of each variable included both linear and non-linear components, they based their approach on the concept of an overall “drift” - or global trend - due to the undistinguished linear effects of the period and cohort. Assuming the primacy of the effect of age on disease, they advised successively fitting age-model (A), age-(period or cohort) drift model (B), age-period (C1) and age-cohort (C2) models and, if any of them fit the data correctly, the full APC model (D). With such a process, comparing the fit of model B (in which the effect of the period and cohort are only linear), with models C1 or C2, allows an estimation of the significance of the non-linear effects of the period and cohort respectively. The comparison between models C1 or C2 with model D tests for the cohort effect (linear and non-linear) adjusted for the period and vice versa.

Finally, other strategies were developed around the part of the model that could be estimated without bias, i.e., which would not depend on the additional constraint used to fit the model [23, 53, 55, 58, 59]. Separating the effect of each variable into linear and curvature parts, it was demonstrated that the curvatures, which could be considered as a deviation from the linearity of the effect, and the global slope (net-drift), i.e. the sum of the slopes of two variables, were constant whatever the minimal additional constraint used. However, it was pointed out that the global slope does not enable the discrimination of the respective linear effects of each variable and that the curvatures are not easy to interpret. Nevertheless, Clayton and Schiffler suggested using local curvature which could be expressed as contrasts between relative risk (RR) of adjacent levels of a same variable so that the curvature in *age i* was:

$$\frac{RR_{i+1} / RR_i}{RR_i / RR_{i-1}} \quad (3)$$

These identifiable contrasts determine the curvatures of secular trends, i.e. they represent a measure of the acceleration of the trend around age i . On the log scale, these contrasts corresponded to second differences:

$$(\alpha_{i+1} - \alpha_i) - (\alpha_i - \alpha_{i-1}) \quad (4)$$

A zero value means that the log-risk of the age i is locally a straight line (i.e. absence of change in the local trend). Positive or negative values indicate respectively convex or concave relationships [23], i.e. respectively a sharp deceleration or a sudden acceleration in the trend associated with the age i .

In summary, many suggestions were made on how to handle the non-identifiability problem of the full APC model, while no ideal solution was found. Moreover, despite the fact that the choice of the additional constraint has a major impact on the observed pattern for the estimates of the age, period and cohort effects, this method is a very common way of identifying the role of the three variables in the trend, in particular when we have *a priori* knowledge of the specific effect of one of the three variables. Often, the combining of the stepwise procedure proposed by Clayton and Schiffler and the minimal additive constraint chosen on biological or epidemiological knowledge, is an acceptable solution for performing an APC analysis in major epidemiological studies.

Acknowledgements

The study was conducted and funded within the framework of the NeuroPrion No(FOOD-CT-2004-506578) risk and control group coordinated by Thomas Hagensars. GR was also partially supported by the Master in Epidemiology from the University of Turin and the San Paolo Foundation. We would like to thank Didier Calavas for his useful comments on the manuscript and Christian Ducrot for his coordination of the “BSE trend project”.

References

1. Wilesmith JW, Ryan JBM, Atkinson MJ: **Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin.** *Vet Rec* 1991, **128**:199-203.
2. Wilesmith JW, Wells GAH, Cranwell MP, Ryan JBM: **Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies.** *Vet Rec* 1988, **123**:638-644.
3. Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside J, Hill AF: **Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD.** *Nature* 1996, **383**:685-690.
4. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG: **A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK.** *The Lancet* 1996, **347**(9006):921-925.
5. [http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm]
6. de Koeijer A, Heesterbeek H, Schreuder B, Oberthur R, Wilesmith J, van Roermund H, de Jong M: **Quantifying BSE control by calculating the basic reproduction ratio R0 for the infection among cattle.** *J Math Biol* 2004, **48**(1):1-22.
7. Morignat E, Ducrot C, Roy P, Cohen C, Calavas D: **Prevalence of BSE in cattle found dead euthanased or emergency slaughtered on farms in western France in 2000 - 2001 and 2002.** *Vet Rec* 2004, **155**:481-486.
8. Prattley DJ, Cannon RM, Wilesmith JW, Morris RS, Stevenson MA: **A model (BSurvE) for estimating the prevalence of bovine spongiform encephalopathy in a national herd.** *Prev Vet Med* 2007, **80**(4):330-343.
9. Saegerman C, Speybroeck N, Vanopdenbosch E, Wilesmith JW, Berkvens D: **Trends in age at detection in cases of bovine spongiform encephalopathy in Belgium: an indicator of the epidemic curve.** *Vet Rec* 2006, **159**(18):583-587.
10. Supervie V, Costagliola D: **The unrecognised French BSE epidemic.** *Vet Res* 2004, **35**(3):349-362.
11. Cohen-Sabas CH, Heim D, Zurbriggen A, Stärk KD: **Age-period-cohort analysis of the Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) epidemic in Switzerland.** *Prev Vet Med* 2004, **66**(1-4):19-33.
12. Sala C, Morignat E, Ducrot C, Calavas D: **Modelling the trend of bovine spongiform encephalopathy prevalence in France: Use of restricted cubic spline regression in age-period-cohort models to estimate the efficiency of control measures.** *Prev Vet Med* 2009, **90**(1-2):90-101.

13. Beringue V, Bencsik A, Le Dur A, Reine F, Lai TL, Chenais N, Tilly G, Biacabe AG, Baron T, Vilotte JL *et al*: **Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy.** *PLoS Path* 2006, **2**(10):e112.
14. Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, Baron T: **Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases.** *EMBO Rep* 2004, **5**(1):110-115.
15. Biacabe AG, Morignat E, Vulin J, Calavas D, Baron TG: **Atypical bovine spongiform encephalopathies, France, 2001-2007.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**(2):298-300.
16. Capobianco R, Casalone C, Suardi S, Mangieri M, Miccolo C, Limido L, Catania M, Rossi G, Di Fede G, Giaccone G *et al*: **Conversion of the BASE Prion Strain into the BSE Strain: The Origin of BSE?** *PLoS Path* 2007, **3**(3):1-31.
17. Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse ME, Watt CJ, Udy HJ, MaWhinney S, Dunstan SP, Southwood TR, Wilesmith JW *et al*: **Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle.** *Nature* 1996, **382**(6594):779-788.
18. Arnold ME, Wilesmith JW: **Estimation of the age-dependent risk of infection to BSE of dairy cattle in Great Britain.** *Prev Vet Med* 2004, **66**(1-4):35-47.
19. Ferguson NM, Donnelly CA, Woolhouse MEJ, Anderson RM: **The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. II. Model construction and analysis of transmission dynamics.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997, **352**:803-838.
20. **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** [<http://www.R-project.org>]
21. Sala C, Morignat E, Calavas D: **Contribution du modèle Age-Période-Cohorte à l'étude de l'Encéphalopathie spongiforme bovine en France: évolution de la prévalence au cours de la période 2001-2007.** *Epidemiol Sante Anim* 2008, **53**:85-95.
22. Clayton D, Schifflers E: **Models for temporal variation in cancer rates. I: Age-period and age-cohort models.** *Stat Med* 1987, **6**(4):449-467.
23. Clayton D, Schifflers E: **Models for temporal variation in cancer rates. II: Age-period-cohort models.** *Stat Med* 1987, **6**(4):469-481.
24. McCullagh P, Nelder JA: **Generalized linear models**, vol. 37, 2 edn. London: Chapman and Hall/Crc; 1999.
25. Carstensen B: **Age-period-cohort models for the Lexis diagram.** *Stat Med* 2007, **26**:3018-3045.
26. Greenland S: **Avoiding power loss associated with categorization and ordinal scores in dose-response and trend analysis.** *Epidemiology* 1995, **6**(4):450-454.

27. Vandeschrick C: **The Lexis diagram, a misnomer.** *Demographic Res* 2001, **4**:97-124.
28. Boucher KM, Slattery ML, Berry TD, Quesenberry C, Anderson K: **Statistical methods in epidemiology: a comparison of statistical methods to analyze dose-response and trend analysis in epidemiologic studies.** *J Clin Epidemiol* 1998, **51**(12):1223-1233.
29. Greenland S: **Dose-response and trend analysis in epidemiology: alternatives to categorical analysis.** *Epidemiology* 1995, **6**(4):356-365.
30. **Problems caused by categorizing continuous variables.**
[<http://biostat.mc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/Main/CatContinuous>]
31. Royston P, Altman DG, Sauerbrei W: **Dichotomizing continuous predictors in multiple regression: a bad idea.** *Stat Med* 2006, **25**(1):127-141.
32. Wilesmith JW, Ryan JBM, Hueston WD: **Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates.** *Res Vet Sci* 1992, **52**:325-331.
33. Wilesmith JW, Wells AH, Ryan JBM, Gavier-Widen D, Simmons MM: **A cohort study to examine maternally-associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy.** *Vet Rec* 1997, **141**(10):239-243.
34. Oppenheim Mason K, Mason WM, Winsborough HH, Poole WK: **Some methodological issues in cohort analysis of archival data.** *Am Sociological Rev* 1973, **38**:242-258.
35. Arsac JN, Biacabe AG, Nicollo J, Bencsik A, Baron T: **Biochemical identification of bovine spongiform encephalopathies in cattle.** *Acta Neuropathol* 2007, **114**(5):509-516.
36. Grassi J, Maillet S, Simon S, Morel N: **Progress and limits of TSE diagnostic tools.** *Vet Res* 2008, **39**(4):33.
37. Supervie V, Costagliola D: **Estimating incidence of the French BSE infection using a joint analysis of both asymptomatic and clinical BSE surveillance data.** *Math Biosci* 2007, **209**(1):90-107.
38. Ru G, Maurella C, Ponti AM, Ingravalle F, Caramelli M: **Epidemiological study of the decline of BSE in Italy.** *Vet Rec* 2007, **161**(15):511-514.
39. La Bonnardière C, Calavas D, Abrial D, Morignat E, Ducrot C: **Estimating the trend of the French BSE epidemic over six birth cohorts through the analysis of the abattoir screening in 2001 and 2002.** *Vet Res* 2004, **35**:299-308.
40. [http://www.izsto.it/doc_san/BSE2001_2008.htm]

41. Ducrot C: **Comparative analysis of trend of BSE epidemic across Europe, in relationship with control measure.** In: *Prion 2008: 8 october 2008 2008; Madrid, Spain*: Neuroprion; 2008: 23 (OC24.01).
42. Carstensen B, Keiding N: **Age-Period-Cohort models: statistical inference in the Lexis diagram.** In.; 2005: unpublished manuscript at www.biostat.ku.dk/~bxc/APC.
43. Frost WH: **The age selection of mortality from tuberculosis in successive decades.** *Am J Epidemiol* 1939, **30-SectionA**:91-96.
44. Arbyn M, Van Oyen H, Sartor F, Tibaldi F, Molenberghs G: **Description of the influence of age, period and cohort effects on cervical cancer mortality by loglinear Poisson models (Belgium, 1955-94).** *Arch Public Health* 2002, **60**:73-100.
45. Drieskens S, Quataert P, Tafforeau J, Van Oyen H: **Age-period-cohort model : trends in mortality from lung cancer in women, Belgium 1971-1990.** *Arch Public Health* 1997, **55**:99-117.
46. Holford TR, Cronin KA, Marietto AB, Feuer EJ: **Changing Patterns in Breast Cancer Incidence Trends.** *J Natl Cancer Inst Monographs* 2006(36):19-25.
47. Holford TR, Zhang Z, McKai LA: **Estimating Age, Period and Cohort Effects Using the Multistage Model for Cancer.** *Stat Med* 1994, **13**:23-41.
48. Remontet L, Buemi A, Velten M, Jouglu E, Esteve J: **Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000.** In. Edited by sanitaire Idv. Lyon, France: Réseau français des registres du cancer Francim, Hopitaux de Lyon, Inserm, InVS; 2003: 218.
49. Rewers M, Stone RA, LaPorte RE, Drash AL, Becker DJ, Walczak M, Kuller LH: **Poisson regression modeling of temporal variation in incidence of childhood insulin-dependent diabetes mellitus in Allegheny County, Pennsylvania, and Wielkopolska, Poland, 1970-1985.** *Am J Epidemiol* 1989, **129**(3):569-581.
50. Robertson C, Perone C, Primic-Zakelj M, Kirn VP, Boyle P: **Breast cancer incidence rates in Slovenia 1971-1993.** *Int J Epidemiol* 2000, **29**(6):969-974.
51. Holford TR: **Analysing the temporal effects of age, period and cohort.** *Stat Methods Med Res* 1992, **1**(3):317-337.
52. Yang Y: **Age-Period-Cohort Distinctions.** In: *Encyclopedia of Health and Aging.* Edited by Markides KS. Thousand Oaks: Sage Publication; 2007: 20-22.
53. Holford TR: **Understanding the effects of age, period, and cohort on incidence and mortality rates.** *Annu Rev Public Health* 1991, **12**:425-457.

-
54. Kupper LL, Janis JM, Karmous A, Greenberg BG: **Statistical Age-Period-Cohort Analysis: A Review and Critique.** *J Chronic Dis* 1985, **38**(10):811-830.
 55. Holford TR: **The Estimation of Age, Period and Cohort Effects for Vital Rates.** *Biometrics* 1983, **39**(2):311-324.
 56. Barrett JC: **The redundant factor method and bladder cancer mortality.** *J Epidemiol Community Health* 1978, **32**(4):314-316.
 57. Rodgers WL: **Estimable functions of age, period, and cohort effects.** *Am Sociological Rev* 1982, **47**:774-787.
 58. Holford TR: **An alternative approach to statistical age-period-cohort analysis.** *J Chronic Dis* 1985, **38**(10):831-840.
 59. **The intrinsic estimator for age-period-cohort analysis: what it is and how to use it** [http://www.princeton.edu/~ssschulho/files/YSFL_apcie.pdf]

3.3. Modélisation des épizooties française et italienne

Figure 3.26 - Overlapping intervals of the calculated period.

Animals aged five years (in complete years) and from the 1996 cohort (born from 1 January 1996 to 31 December 1997) were tested from 1 January 2001 to 31 December 2002 and are thus included in the 2001 period ($1996 + 5 = 2001$); animals aged five years (in complete years) and from the 1997 cohort (born from 1 January 1997 to 31 December 1998) were tested from 1 January 2002 to 31 December 2003 and are included in the 2002 period ($1997 + 5 = 2002$) and so on.

COHORT	AGE	PERIOD					
		2001	2002	2003	2004	2005	
Jan	Dec	Jan	Dec	Jan	Dec	Jan	Dec
1996	5 years; [60-72[months	2001					
1997	5 years; [60-72[months		2002				
1998	5 years; [60-72[months			2003			
1999	5 years; [60-72[months				2004		

Figure 3.27 - Results of the AC modelling of the French data and second differences.

The effects are expressed in OR with 95% CIs, plotted on a log scale (null values and very large CIs are not represented) and correspond to the BSE risk of a specific age group and birth cohort relative to the reference age group and the reference birth cohort (respectively five years and 1994 and indicated using dotted light grey vertical lines on the graph). To facilitate interpretation, the second differences on the logarithmic scale were plotted as corresponding contrasts (local curvatures).

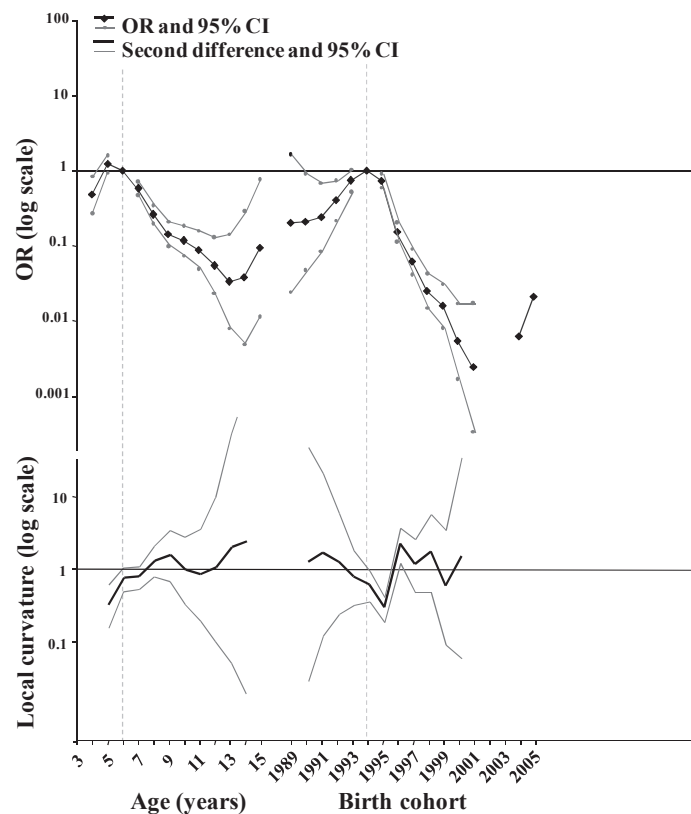
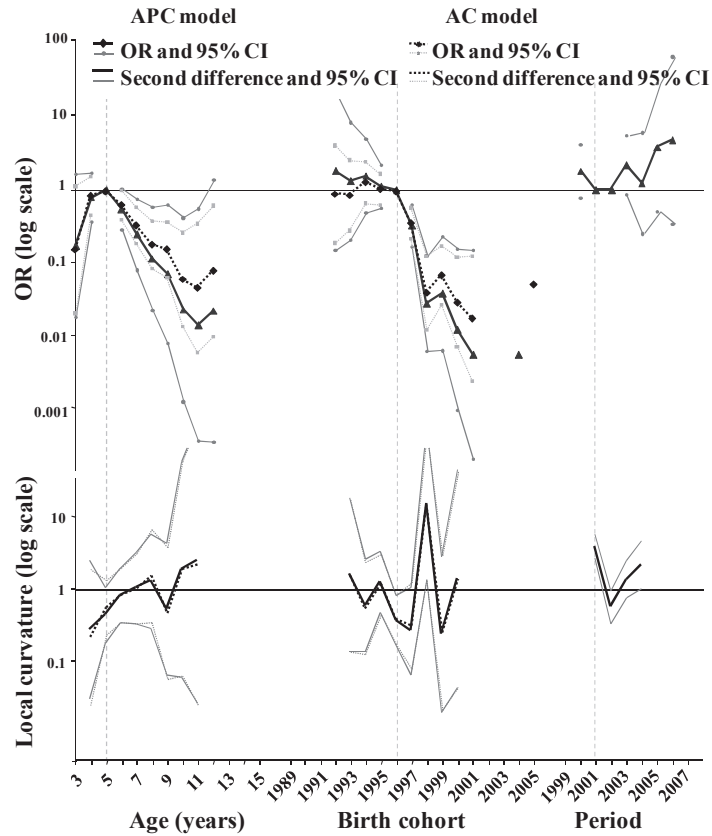


Figure 3.28 - Results of the APC and AC modelling of the Italian data and second differences.

The effects are expressed in OR with 95% CIs, plotted on a log scale (null values and very large CIs are not represented) and correspond to the BSE risk of a specific age group and birth cohort detected at a specific period relative to the age, birth cohort and period reference groups (respectively five years, 1996 and 2001 and indicated using dotted light grey vertical lines on the graph). To facilitate interpretation, the second differences on the logarithmic scale were plotted as corresponding contrasts (local curvatures).



3.3. Modélisation des épizooties française et italienne

Figure 3.29 - The classical plots for observation data of the Lexis diagram in the case of BSE in France.

BSE prevalence per 10,000 tested animals in the 2001-2007 period (calculated period): (a) age-specific prevalence per period of diagnosis; (b) age-specific prevalence by birth cohort.

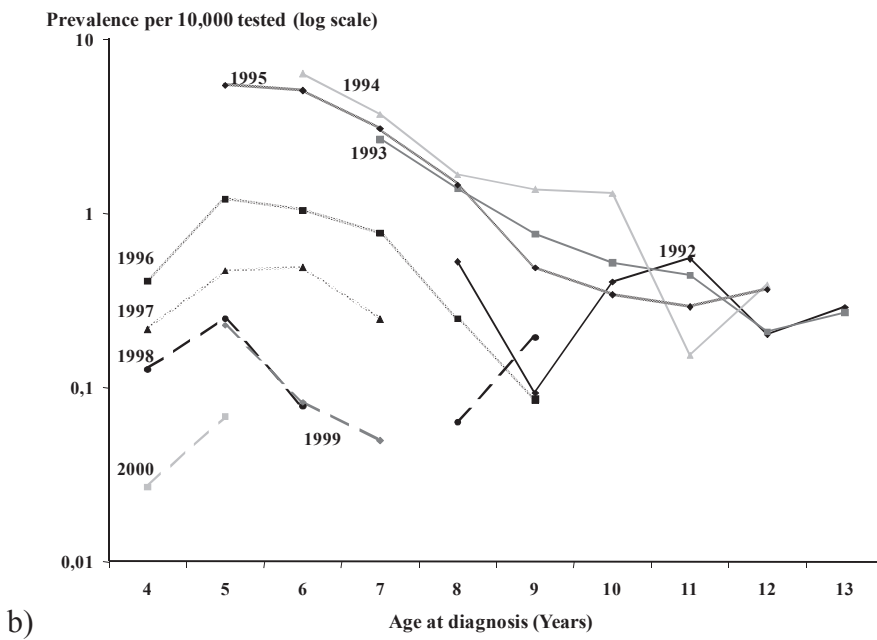
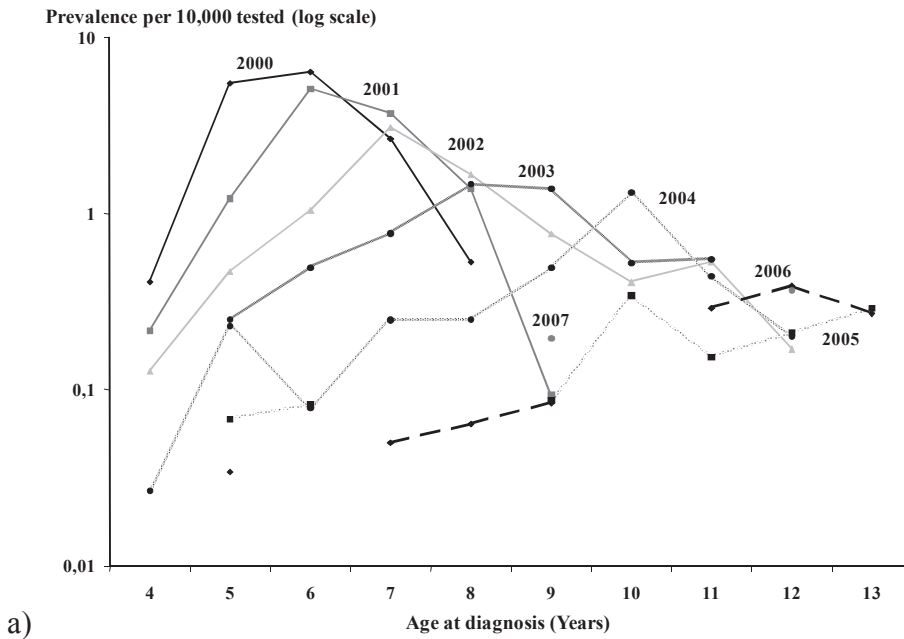


Table 3.7 - Date and content of main control measures enforced in France, Italy and Europe to control BSE.

Date of implementation	European measure	Content of the measure	Country concerned
August 1989	no	Ban on the importation of MBM from UK	France
July 1990	no	Ban on the use of MBM* for bovines	France
July 1994	no	Ban on the use of MBM for ruminants	France
August 1994	Decision 94/381/EC		EU members
June 1996	no	Ban on the use of SRM**	France
April 1997	Decision 96/449/EC	Standards for batch processing in rendering systems	EU members
January 1997	no	Partial SRM ban from BSE-affected countries	Italy
October 2000	Decision 2000/418/EC (replacing Decision 97/534/EC that was never enforced)	Ban on the use of SRM	EU members
January 2001	Decision 2000/766/EC	Total ban on the use of MBM for farmed animals	EU members

* MBM, Meat and Bone Meal, ** SRM, Specified Risk Material

Table 3.8 - Data available and data included in the analysis.

	Data available*		Data included		Data categorisation**			Reference groups***		
	Number of tested animals	Number of BSE cases	Number of tested animals	Number of BSE cases	Age (years)	Birth cohort	Period (calculated)	Cohort	Age	Period
France	17,306,300	660	17,248,284 ⁽¹⁾	633 ⁽²⁾	2 to 33	1971 to 2005	1999 to 2007	1994/1995	6	2001
Italy	4,692,377	141	4,506,951 ⁽³⁾	131 ⁽⁴⁾	2 to 12	1988 to 2005	1999 to 2007	1996	5	2001

* data available from the implementation of complete active surveillance in the countries (January 2001 in Italy, July 2001 in France) to 31 December 2007.

** one-year intervals were used to define age groups and birth cohorts. The period was calculated using the relationship: period = age + cohort.

*** the reference groups chosen were the groups with the highest unadjusted prevalence. If necessary, a second model was fitted with the groups with the highest adjusted prevalence as a reference.

⁽¹⁾ 58,002 animals with unknown date of birth were removed.

⁽²⁾ 14 atypical cases, three imported cases, nine secondary cases and one case with unknown date of birth were removed.

⁽³⁾ 16,248 animals under two years old, and 19 animals with incorrect age and/or date of birth were removed. 169,156 animals over 12 years old were also removed, because only pooled data for these animals were available (class: "≥ 13 years").

⁽⁴⁾ three atypical cases, three classical cases over 12 years old and four imported cases were removed.

Table 3.9 - List of the APC models fitted and selection of the best models.

Quality of fit and contribution of each new variable added to the model are presented.

N° model.	Adjustment of the models			Estimate of the effect of the covariates				Tested effect	
	Residual deviance	df	p- value*	Comparison with model	Difference of deviance	Difference of df	p- value**		
France									
0	Null	1958.7	232	0.000					
1	Age	991.8	201	0.000	0	966.9	31	0.000	Age
2	Age-Drift	344.3	200	0.000	1	647.5	1	0.000	Drift ⁽¹⁾
3a	Age-Cohort	68.0	167	1	2	276.3	33	0.000	Non-linear cohort effect
3b	Age-Period	336.4	194	0.000	2	7.9	6	0.246	Non-linear period effect
4	Age-Cohort-Period ⁽²⁾	55.5	161	1	3a	12.5	6	0.051	Period effect (non-linear + linear)
Italy									
0	Null	347.4	91	0.000					
1	Age	224.9	81	0.000	0	122.5	10	0.000	Age
2	Age-Drift	101.4	80	0.053	1	123.6	1	0.000	Drift ⁽¹⁾
3a	Age-Cohort	49.6	64	0.907	2	51.8	16	0.000	Non-linear cohort effect
3b	Age-Period	90.3	73	0.082	2	11.1	7	0.134	Non-linear period effect
4	Age-Cohort-Period ⁽²⁾	32.5	57	0.996	3a	17.1	7	0.017	Period effect (non-linear + linear)

* goodness of fit test, ** log-likelihood ratio test ($\alpha=5\%$), for $p > 0.05$ the effect of the variable is non-significant

df, degree of freedom

⁽¹⁾ linear effect of the period and cohort combined

⁽²⁾ period is the last covariate entered in the model

3.4. Modélisation des données européennes : analyse APC catégorielle couplée au calcul du nombre reproductif de base (R_0)

“Modelling BSE trend over time in Europe, a risk assessment perspective”

Ducrot Christian, Sala Carole, Ru Giuseppe, de Koeijer Aline, Sheridan Hazel, Saegerman Claude, Selhorst Thomas, Arnold Mark, Polak Miroslaw P, Calavas Didier

Ducrot Christian DVM PhD, INRA, UR346 Epidémiologie Animale, France

Sala Carole DVM Msc, AFSSA Lyon, Unité Epidémiologie, France

Ru Giuseppe DVM PhD MsE, IZSPLVA, Italian Reference Centre for Animal TSE, Italy

de Koeijer Aline A. PhD, CVI, veterinary epidemiology and modelling, the Netherlands

Sheridan Hazel MVB MSc(Epi), Department of Agriculture, Fisheries and Food, Ireland

Saegerman Claude DVM PhD Dipl ECVPH, University of Liege, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Epidemiology and Risk analysis applied to Veterinary Sciences, Belgium

Selhorst Thomas DVM PhD, Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Epidemiologie, Germany

Arnold Mark MSc PhD, VLA Sutton Bonington, UK

Polak Miroslaw P DVM PhD, NVRI, Department of Virology, Pulawy, Poland

Calavas Didier DVM PhD, AFSSA Lyon, France

Corresponding author Ducrot Christian, INRA, UR346 Epidémiologie Animale, F63540 Saint Genes Champanelle, France, tel (33) 4 73 62 42 63, fax (33) 4 73 62 45 48, e-mail ducrot@clermont.inra.fr

Abstract

BSE is a zoonotic disease that caused the emergence of variant Creutzfeldt-Jakob disease in the mid 1990s. The trend of the BSE epidemic in seven European countries was assessed and compared, using Age-Period-Cohort and Reproduction Ratio modelling applied to surveillance data 2001 to 2007. A strong decline in BSE risk was observed for all countries that applied control measures during the 1990s, starting at different points in time in the different countries. Results were compared with the type and date of the BSE control measures implemented between 1990 and 2001 in each country. Results show that a ban on the feeding of meat and bone meal (MBM) to cattle alone was not sufficient to eliminate BSE. The fading

out of the epidemic started shortly after the complementary measures targeted at controlling the risk in MBM. Given the long incubation period, it is still too early to estimate the additional effect of the ban on the feeding of animal protein to all farm animals that started in 2001. These results provide new insights in the risk assessment of BSE for cattle and Humans, which will especially be useful in the context of possible relaxing BSE surveillance and control measures.

Key-words

Age period cohort model, Basic Reproduction Number, Bovine Spongiform Encephalopathy Epidemiology, European Union, Risk assessment, prevention and control,

Abbreviations

APC Age period cohort model,

BSE Bovine spongiform encephalopathy

EU European Union

MBM meat and bone meal

OIE Office International des Epizooties

OR odds ratio

R_0 Basic Reproduction Number

SRM specified risk material

UK United Kingdom

vCJD variant Creutzfeldt-Jakob disease

3.4.1. Introduction

The first cases of Bovine spongiform encephalopathy (BSE) were observed in 1985 in the United Kingdom (UK), and evidence of the zoonotic impact of the disease was found in 1996 [1], as the source of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD); since then, 216 cases of vCJD were detected in Humans (<http://www.cjd.ed.ac.uk/vcidworld.htm>; consulted June 29, 2008). Epidemiological studies on BSE indicated that meat and bone meal (MBM) played a major role in disease transmission [2, 3]. This led to a ban on the feeding of MBM to ruminants, implemented in 1988 in the United Kingdom and subsequently throughout the European Union (EU). Although the ban significantly decreased exposure [4], by itself it proved insufficient to eliminate disease. Further measures were taken in the mid 1990s by some countries (controls on cross contamination, SRM removal) to eliminate the residual risk posed

by MBM. In 2001 the European Union imposed a ban on the feeding of animal protein to all farmed animal species with limited exceptions (so called total feed ban) (http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/chronological_list2008_en.pdf; consulted October 20, 2008). As the various control measures, prior to the total EU ban in 2001 were implemented at different times in different EU Member States, it is expected to see variations in the trend of the BSE epidemic by country connected with the date and type of control measures introduced in each of them.

As the incidence of disease declines, there is a huge pressure from different stakeholders to lift certain BSE control measures. In the TSE roadmap published in 2005 (http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/roadmap_en.pdf; consulted 20 October 2008), the European Commission planned a relaxation of aspects of the total feed ban provided certain conditions were met. In part these relaxations are based on risk assessments. For this reason, analyses of the trend of the epidemic and the effect of control measures is of major concern for risk assessments and risk management in the coming years.

A comprehensive surveillance system for BSE has been in place in the EU since 2001. The surveillance system is based on clinical surveillance as well as on systematic rapid testing of risk animals (emergency slaughter and animals that die on farm) over 24 months of age and healthy slaughtered cattle over 30 months of age. Data generated by this surveillance programme has been analyzed in the past and has provided insight into the trend of the epidemic in different countries (Netherlands [5], UK [6], Italy [7], France [8, 9], Switzerland [10]). The length and variability of the incubation period for BSE [11] means that a large percentage of the infected animals are already dead or slaughtered before infection can be detected. This must be taken into account when analyzing the epidemic. Over the years different approaches have been used [12] varying from relatively simple approaches based on the age of cases at detection [13, 14] to more complicated approaches such as back calculation modelling [6, 15] and birth cohort modelling with extrapolation based on the reproduction ratio (called R_0 in the text) [5, 16, 17]. Regression integrating birth cohort and year of test [8], and Age-Period-Cohort (APC)[18] models have also been used to model disease trends.

The goal of this study was to compare the trend of the BSE epidemic in several European countries using two different standardized methods and the surveillance data collected between 2001 and 2007. In addition the study examined whether the overall trend was towards eradication and if so at what point in time did this decline start. The results were discussed in comparison with the date and type of control measures introduced. This up to date analysis provides precise risk estimates for birth cohorts born in the second half of the

1990s; it gives new insight into the effect of measures introduced before the total feed ban in 2001, and provides key aspects in a risk assessment perspective for Human Health in the context of relaxing BSE surveillance and control measures.

3.4.2. Material and method

3.4.2.1. Data

Seven EU Member States (Table 3.10) were involved in the study. BSE cases identified between 2001 and 2007 in all three BSE surveillance streams (clinical surveillance, risk animals and healthy slaughter animals) were used. All positives were confirmed at the Member States' National Reference Laboratories using validated tests (OIE [Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals](#) Chapter 2.4.6) [19, 20]. Data from the three surveillance streams were merged to facilitate comparison between countries based on the assumption that the surveillance streams varied little among countries (with the exception of the UK with mainly clinical surveillance) and that rapid tests for BSE are detecting infected animals close to onset of clinical disease.

As animals below 2 years of age are not required to be tested under European legislation, these animals were excluded from the study (http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/chronological_list2008_en.pdf, consulted 20 October 2008). Moreover imported cases were excluded when such information was available. Atypical cases were included although they have different epidemiological characteristics as not all countries are capable of identifying them and they represented only a small proportion of all BSE cases [21].

For the calculation of the R_0 an estimation of the adult cattle population of each country was used as the background population. The APC model used the number of animals tested in all three surveillance streams. BSE cases and the tested population were classified by age and by birth cohort. The age was calculated in complete years by subtracting the date of birth from the date of diagnosis. The birth cohort was defined as the calendar year of birth. In the R_0 method, the year of detection was the calendar year of detection while in the APC method the year of detection, called the period, was calculated from the age and birth cohort.

The country specific type and year of implementation of the main BSE control measures prior to 2001 for each country included in the study are detailed in Figure 1 and summarized in Figure 2. Initially, the primary BSE control measure was a ban on the feeding of MBM to cattle (or ruminants in some countries). This was followed by complementary measures involving

the removal of specified risk material (SRM), controls on cross contamination and the sterilization of MBM at 133° under 3 bar pressure and for 20 minutes (with size particles less than 5 cm). In January 2001, a total ban on the feeding of animal protein to all farmed animal species with certain limited exceptions has been enforced. Finally in May 2001, control measures were harmonized throughout the EU with the introduction of a comprehensive TSE Regulation (Regulation (EC) 999/2001).

3.4.2.2. Methods

Two complementary methods were used to analyze the data.

Age Period Cohort analysis (APC)

A logistic regression model was used to model the respective effects, expressed as odds ratios, of the age at diagnosis (age), birth cohort (cohort) and period of detection (period) on BSE prevalence, expressed as cases per 10,000 cows tested. For the cohort, the reference group chosen in each country was the birth cohort in which the highest crude prevalence was observed.

For each country, before fitting the full age-period-cohort (APC) model, we used a stepwise procedure recommended by Clayton and Schiffler [22], and run successively four sub models, including respectively age, age and drift, age and period, age and cohort. The drift is the global trend, due to the undistinguished linear effects of the period and cohort, that we tested (model 2) before adding the non-linear components of the period (model 3) or cohort (model 4) effects. The drift cannot be attributed specifically to cohort or period, because of the interrelation between age, period and cohort. Identifying the complete APC model required a minimal additional constraint; this was done by equalizing the effect of two successive periods as we expected little, if any, period effect due to the stability in the surveillance systems during the studied period of time [23, 24]. The significance of each variable was assessed by a log-likelihood ratio test. Goodness of fit was evaluated by the examination of the residual deviance of the models, which approximates a Chi-square distribution [25] (table 3.11).

Calculation of the reproduction ratio R_0 per cohort

The reproduction ratio (R_0) [5] provides an estimate of the expected number of newly infected animals resulting from an initial infection. When R_0 is above 1, more than one new

infection is expected from each infectious animal, so the epidemic increases; similarly, a R_0 smaller than 1 is linked to a decreasing epidemic. A cohort model with yearly increments was applied on the BSE case data that were categorized by age (2 to 12 yrs) and year of birth (1991 to 2002). The method is described in [17, 26]. We determined the test window of age for each birth cohort which had been tested between January 2001 and December 2007. Next we calculated the expected number of BSE cases in the full cohort using a distribution for the age at onset, derived from the EU15 data [17]; it was applied to all the evaluated countries without further adjustment to the national age distribution of the standing cattle population. From these initial steps, we obtained the estimated number of BSE cases in all age groups and for every cohort from 1991 to 2003, including the age groups that were culled before 2001 and the ones still alive in 2008. From these estimates we calculated the expected number of cases in each age group by test year. The reproduction ratio was calculated as the ratio of the expected number of cases estimated to appear in a birth cohort and the expected number of cases in that test year. For estimates before 1997, this required an estimate of the number of cases found in cohorts born before 1991, which was not available in the data. We assumed that no BSE case was found in animals born before 1991; this led to an increasing overestimation of the R_0 , the further we go back from 1997. Confidence intervals (95%) for the reproduction ratio were computed using the method described in [26]. The model was based on three major assumptions. Firstly, all infections occurred at a young age (first year of life); secondly, all imports of infectious animals or material are ignored; and thirdly the age at clinical onset distribution was assumed to be the same for all countries, without further adjustment to the country cattle age distribution or the different exposure pattern because of the difficulty in obtaining country specific information.

3.4.3. Results

The results of APC models and R_0 estimates are presented in Table 3.11 and Figure 3.30. The cohort effect from the APC model was expressed as an Odds Ratio (OR) and plotted on a log scale. As BSE is a disease with a low prevalence the OR can be assumed to be equivalent to the Relative Risk (RR); it provides the risk of an animal of a specific cohort to be detected as a BSE case compared to the risk for an animal of the reference cohort at the same age and observation period. The results of the APC model showed that in the UK, the BSE risk decreased significantly from the 1988 birth cohort onwards. In the other countries a significant decrease started later; from the 1995 cohort onwards in France, from the 1996

cohort onwards in Ireland, from the 1997 cohort onwards in Italy and Germany and the from the 1998 cohort onwards in the Netherlands. Birth cohort was not a significant variable in the Polish model pointing to the lack of a specific temporal trend in BSE risk in Poland in the late nineties. A small increase in risk was observed in Germany, Italy and Ireland in 1999 and in the Netherlands in 2000.

Estimates of R_0 and the upper confidence limit showed that the epidemic was consistently fading out (i.e. estimated upper confidence limit of R_0 below 1) in all countries except Poland. This trend could be observed from the 1996 cohort onwards in the UK, from the 1997 cohort onwards for France and Ireland, from the 1998 cohort onwards for Italy, from the 1999 cohort onwards for the Netherlands and from the 2000 cohort onwards for Germany. In the case of Poland although R_0 was consistently very close to 1, it did not show a clear tendency to decrease below that level. A decline in the Polish BSE epidemic would need to be confirmed using later cohort data that is not yet available.

Figure 3.31 summarizes conjointly the results of the models and the date of the implementation of control measures per country.

3.4.4. Discussion

3.4.4.1. Temporal trend of BSE

An important result of the study is the clearly observable decline of the BSE epidemic in all studied countries except Poland. This represents a true decline as the study focused on the period 2001 to 2007, a period during which intensive and exhaustive surveillance with little bias or uncertainty was carried out for BSE in the EU. In addition both methods (APC and R_0) produced similar results and indicated similar trends. The decrease of the number of cases detected between 2001 and 2007 already gave the idea of a decline of the epidemic. However, our models accounted for the main factors influencing the prevalence, in particular the length and variability of the incubation time, the age at which the animals are tested, and they provided an adjusted estimate of the year when the decrease started and the slope of it.

The study focused on birth cohorts as previous analyses of data from the UK BSE epidemic have shown that the age at infection is mostly likely to be early in life [6], with more than 90% of case animals infected before 12 months of age. Both methods were used in a complementary way. APC modelling was based on an analysis of tested animals and provides an exact calculation of the evolution of BSE risk over successive birth cohorts. R_0 modelling provides an estimate of the prevalence per birth cohort, similar to the evolution of risk

derived from the APC model, but in addition can provide a measure for the transmission of infection. An assessment of the efficacy of the various control measures can be derived from the results of both models. Unlike the APC model, which looks for statistical correlations in the data, the R_0 model is mechanistic. It assumes that there is a cohort effect because cattle become infected at a young age. It also assumes that there is no period effect, which is likely because there was no change to surveillance requirements during the period of interest. Both of these assumptions are supported by the results of the APC modelling.

The difference in time (a few years) between the first cohort to exhibit decreased risk and the year where R_0 first declined below 1 can be explained by the wave effect [17]. The first cohort with decreased risk results from a combination of exposure (i.e. infection pressure in the past) and transmission level (i.e. R_0). If there was a steeply increasing epidemic in the past, then even if R_0 remains above 1, a temporary decrease in risk for the cohort may be observed. If there are no further changes in the control measures, this would then be followed by an increase in successive birth cohorts, because the exposure from the past is still increasing although the transmission level remains the same. This pattern is typically observed in epidemics when the transmission level (R_0) declines more slowly than the exposure level increases. The theoretical background for this is discussed in [16], although the development of second waves is not specifically addressed there.

The results produced by the APC model and the R_0 model are in agreement with the evolution of the average age of the cases, as suggested previously by Saegerman et al. [13, 14]. Although not reported in this paper an increase in the mean age of the cases was detected for the period 2001-2007 coinciding with a strong decline in cohort risk and R_0 [12, 17].

Finally, it can be observed from results of the APC model (Figure 3.30) that the shape of the decline in risk between cohorts differed between countries varying from sharp for Ireland through moderate for Germany. This shape results from the combined effect of the force of the epidemic in the years preceding the decline and the effectiveness of control measures introduced. Furthermore, this decline started at different times in different countries; R_0 was already below 1 in the UK in 1996 though it only declined below 1 in the year 2000 in Germany. It is interesting to note the small increase in risk for animals born in 1999 and 2000 in the case of Germany, Ireland, Italy and the Netherlands. This finding has also been observed in other countries such as Japan, Canada and countries that joined EU recently (Poland, Czech Republic, Slovak Republic, Republic of Slovenia) (Ru, personal communication). It would be worth investigating this further to determine whether there is an identifiable source of these

miniature increases in prevalence or whether they are just statistical fluctuations caused by low prevalence.

4.3.4.2. Control measures

The risk of infecting cattle with the BSE agent is for a given birth cohort influenced by three main parameters. The first one is the level of infectivity in cattle in fallen stock and abattoir in that period; it is the direct consequence of the infection rate about 5 to 7 years earlier due to incubation period and can be viewed as a wave effect [17]. The second parameter is of course the existence and quality of control measures, which restricts recycling of the BSE agent. The last one is the risk of BSE in other countries in case of imports of feed or living animals. In our study we were interested in analyzing the pattern of the BSE trend in connection with the control measures. This attempt at interpreting the evolution of the BSE trend in terms of efficiency of control measures is possible if we make the assumption that the two other aspects did not have a great impact on the time differences in BSE trend between countries. In fact, the wave effect was almost synchronized between countries, due to the major impact of the UK BSE epidemic on all European countries, with the main peak in 1988 [6] and the closest peak wave on birth cohort 1995 for France [15]. The analysis by reproduction ratio can distinguish this effect from the control measures although this ignores imports of live animals and feed. The third aspect, infections from imported feed might only attenuate the differences in the observed trend of BSE between countries, and might be marginal in most countries with an endemic BSE. For these reasons, we were confident that we can interpret the trend of BSE in relationship with control measures.

Some points arose from analysing the trend of BSE in comparison with the type and date of the introduction of control measures. The first point is that the ban of MBM for cattle alone was not sufficient to control the risk, at least in the Netherlands, France, Italy and Ireland, since it was not followed by a strong decrease of the epidemic and the R_0 remained above 1. This does not mean that in theory the feed ban is not sufficient to control the risk of BSE; it only means that the way it was implemented in various countries did not fully or immediately stop the transmission process. This resulted from the effect of cross-contaminations between feed for monogastrics and feed for cattle, which were observed in different countries and analyzed in detail in different epidemiological studies [12]. The second point of interest is that in almost all the countries studied, such as Ireland, Italy, France and the Netherlands, we observed that the risk decreased significantly and the R_0 was below 1 shortly after removal of SRM from MBM and treatment of MBM at 133°/3bars/20'/particles<5cm were applied. These

two measures were often introduced within a short period of time and it is therefore difficult to separate their respective effects. Also, in some countries such as France [15], the wave effect could have coincided with the effect of a given control measure such as SRM removal, these two effects being difficult to disentangle. It could be argued that since these complementary measures were implemented shortly after the announcement on March 1996 of the zoonotic consequences of BSE, this announcement might have prompted countries and feed industries to step up compliance with previous regulation measures, such as the ban of MBM for cattle. This could have resulted in an overlap between implementation of complementary actions and increased compliance with previous measures. We believe strongly that the announcement of the zoonotic feature of BSE cannot explain alone the decrease trend observed because the starting date of the decrease varied largely between countries, from birth cohort 1995 to birth cohort 1998. We definitely believe that the complementary measures had a significant impact on the observed decrease, specifically because we observed similar timing between the time of implementation of the complementary measures and the time of decrease in the countries studied (Figure 3.31).

The third point of interest is that in all studied countries apart from Germany and Poland, the R_0 was already below 1 (progressive fading out of the epidemic) before the implementation of the ban on the feeding of animal protein to all farm animals in 2001. This does not mean that this total feed ban did not have any effect. In the case of a disease with long incubation time, the fading out of the epidemic can be very slow even with the R_0 below 1. However, it is still a bit too early to quantify the precise effect of this total feed ban in these countries.

In this study, we analyzed the data separately for each country. However, the situation of BSE in a given country is linked to other countries because of the high level of trade; without trade, most of these countries would not have had a BSE epidemic in the first place. Therefore the control measures decided at the EU level (http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/chronological_list2008_en.pdf; consulted October 20, 2008) such as ban on the use of proteins derived from mammalian tissues for feeding ruminants in 1994, pressure cooking system for processing mammalian waste into MBM in 1996, prohibition of the use of SRM in 2000 (application of decision 96/534 was postponed until October 2000 with Decision 2000/412), total ban on the feeding of MBM to all farm animals in 2001, might have had a stronger impact on the international BSE situation than those taken at the country level. However, implementation of these measures was not always at the same time so we specifically looked at the real date of implementation of the measures in our analysis (Figures 3.30 & 3.31).

Conclusion

The modelling of the BSE epidemic in seven EU countries using two different methods has shown very coherent results concerning the effect of various types of control measures as they were applied in these countries. We observed a strong decline of the risk of BSE for countries that applied control measures in the nineties. The results show that the implementation of the ban on feeding MBM to cattle alone was not followed by a decrease of the epidemic, which can be linked with the quality of implementation of this measure in the field. We did observe fading out of the epidemic following the introduction of complementary measures which were targeted at controlling the risk in MBM (SRM removal and MBM treatment). It is still too early to quantify the additional effect of the total feed ban of MBM for farm animals implemented in 2001. These comparative results add a new insight in the risk assessment of BSE for cattle and Humans, which will especially be useful in the context of the feasibility to possible lifting control measures in the future.

Acknowledgements

This work was based on data collected through active surveillance programmes on BSE organized at the EU level. The study was conducted and funded within the framework of Neuroprion NoE (FOOD-CT-2004-506578), risk and control group, coordinated by Thomas Hagenaars.

References

- [1] Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet*. 1996;347(9006):921-5.
- [2] Wilesmith JW, Wells GAH, Cranwell MP, Ryan JBM. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *The Veterinary Record*. 1988;123:638-44.
- [3] Wilesmith JW, Ryan JBM, Hueston WD. Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates. *Research in Veterinary Science*. 1992;52:325-31.
- [4] Heim D, Wilesmith JW. Surveillance of BSE. *Archives of Virology*. 2000;16:127-33.
- [5] de Koeijer A, Heesterbeek H, Schreuder B, Oberthür R, Wilesmith JW, Van Roermund H, et al. Quantifying BSE control by calculating the basic reproduction ratio R_0 for the infection among cattle. *Journal of Mathematical Biology*. 2004 2004/01/;48(1):1-22.
- [6] Arnold ME, Wilesmith JW. Estimation of the age-dependent risk of infection to BSE of dairy cattle in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine*. 2004;66(1-4):35-47.
- [7] Ru G, Maurella C, Ponti AM, Ingravalle F, Caramelli M. Epidemiological study of the decline of BSE in Italy. *Veterinary Record*. 2007;161:511-4.
- [8] Morignat E, Ducrot C, Roy P, Cohen C, Calavas D. Prevalence of BSE in cattle found dead euthanased or emergency slaughtered on farms in western France in 2000 - 2001 and 2002. *The Veterinary Record*. 2004;155:481-6.
- [9] La Bonnardière C, Calavas D, Abrial D, Morignat E, Ducrot C. Estimating the trend of the French BSE epidemic over six birth cohorts through the analysis of the abattoir screening in 2001 and 2002. *Veterinary Research*. 2004;35:299-308.
- [10] Schwermer H, Heim D. Cases of bovine spongiform encephalopathy born in Switzerland before and after the ban on the use of bovine specified risk material in feed. *Veterinary Record*. 2007;160(3):73-7.
- [11] Ferguson NM, Donnelly CA, Woolhouse MEJ, Anderson RM. The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. II. Model construction and analysis of transmission dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B London*. 1997;352:803-38.
- [12] Ducrot C, Arnold M, de Koeijer A, Heim D, Calavas D. Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemics. *Veterinary Research* 2008:15.
- [13] Saegerman C, Speybroeck N, Vanopdenbosch E, Wilesmith J, Vereecken K, Berkvens D. Evolution de l'âge moyen lors de la détection des bovins atteints d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) : un indicateur utile du stade de la courbe épidémique d'un pays. *Epidémiologie et santé animale*. 2005;47:123-39.

-
- [14] Saegerman C, Speybroeck N, Vanopdenbosch E, Wilesmith JW, Berkvens D. Trends in age at detection in cases of bovine spongiform encephalopathy in Belgium: an indicator of the epidemic curve. *The Veterinary Record*. 2006 Oct 28;159(18):583-7.
- [15] Supervie V, Costagliola D. The unrecognised French BSE epidemic. *Veterinary Research*. 2004;35:349-62.
- [16] de Koeijer AA, Schreuder BEC, Bouma AM. Factors that influence the age distribution of BSE cases: potentials for age targetting in surveillance. *Livestock Production Science*. 2002;76:223-33.
- [17] European Food Safety Authority. Risk for Human and Animal Health related to the revision of the BSE Monitoring regime in some Member States, Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards (Question No EFSA-Q-2008-007), Adopted on 10 July 2008. *The EFSA Journal* © 2008;762:1-47.
- [18] Cohen-Sabas CH, Heim D, Zurbriggen A, Stärk KD. Age-period-cohort analysis of the Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) epidemic in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine*. 2004 Dec 15;66(1-4):19-33.
- [19] Gavier-Widén D, Stack MJ, Baron T, Balachandran A, Simmons M. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J Vet Diagn Invest*. 2005;17(6):509-27.
- [20] Grassi J, Maillet S, Simon S, Morel N. Progress and limits of TSE diagnostic tools *Vet Res*. 2008;39(4):33.
- [21] Biacabe AG, Morignat E, Vulin J, Calavas D, Baron TGM. Atypical bovine spongiform encephalopathies, France, 2001-2007. *Emerging Infectious Diseases*. 2008;14(2):298-300.
- [22] Clayton D, Schifflers E. Models for temporal variation in cancer rates. I: Age-period and age-cohort models. *Stat Med*. 1987 Jun;6(4):449-67.
- [23] Oppenheim Mason K, Mason WM, Winsborough HH, Poole WK. Some methodological issues in cohort analysis of archival data. *Am Sociological Rev*. 1973;38:242-58.
- [24] Barrett JC. The redundant factor method and bladder cancer mortality. *J Epidemiol Community Health*. 1978 Dec;32(4):314-6.
- [25] McCullagh P, Nelder J-A, eds. *Generalized linear models*. London: Chapman and Hall 1989.
- [26] de Koeijer AA. Analyzing BSE transmission to quantify regional risk. *Risk Analysis*. 2007;27(5):1095-103.

3.4. Modélisation de l'épizootie en Europe

Table 3.10 - Data per country included for APC analysis and R_0 estimation.

	APC modelling		R_0 estimation		Period of interest
	Nb BSE cases	Nb tested animals	Nb BSE cases	Adult cattle population (million heads 2005)	
France	647	17,248,284 ⁽¹⁾	716	10.4	2001 to 2007
Germany	317 ⁽²⁾	13,879,451 ⁽³⁾	400	5.9	2001 to 2007
Ireland	657 ⁽⁴⁾	3,594,378 ⁽⁵⁾	972	3.1	2001 to 2007
Italy	135 ⁽⁶⁾	4,506,951 ⁽⁶⁾	137	2.9	2001 to 2007
Poland	56 ⁽⁷⁾	2,968,541 ⁽⁸⁾	57	3.0	2002 to 2007
The Netherlands	70 ⁽⁹⁾	2,815,671 ⁽⁹⁾	74	1.7	2001 to 2007
United Kingdom	1795 ⁽¹⁰⁾	2,964,963 ⁽¹¹⁾	3326	4.9	2001 to 2007

(1) only indigenous animals over 30 months and tested since July 1st, 2001 were included.

(2) 89 cases detected before 2001 and 4 BSE cases with incomplete or incorrect data were removed from the analysis.

(3) 3282 animals tested before 2001 were excluded.

(4) 17 cases born before 1990 and 67 cases without date of birth were excluded.

(5) number of tested animals derived from the Department of Agriculture, Fisheries and Food Computerised Monitoring and Movement system. Animals born before 1990 were not considered.

(6) animals 13 years old and over (whose 3 cases) were removed from the analysis because only pooling data for these animals was available (class: "+ 12 years").

(7) 1 case excluded because secondary and 2 more cases excluded because the number of tested animals for the same age and period was not estimable.

(8) estimate

(9) animals 9 years old and over were removed from the analysis because only pooling data for these animals was available (class: "+ 9 years").

(10) 9 cases for which the date of birth was unknown were removed from the analysis.

(11) animals for which the date of birth was unknown and /or under 2 years old were excluded from the analysis.

Table 3.11 - Best APC model per country, effect of adding each variable to the model and goodness of fit.

	Effect of the variables			Best model	Goodness of fit of the best model		
	(p-value*)				Residual Deviance	Df ²	p-value**
	Age	Cohort	Period				
France	0.00	0.00	0.06	Age-cohort	77.57	167	1.00
Germany	0.00	0.00	0.19	Age-cohort	45.81	70	0.99
Ireland ¹	0.00	0.00	0.88	Age-cohort	49.75	46	0.33
Italy	0.00	0.00	0.02	Age-period-cohort	48.61	64	0.98
Poland ¹	0.00	0.45	0.03	Age-period	52.41	50	0.38
The Netherlands	0.00	0.00	0.12	Age-cohort	29.95	30	0.47
UK	0.00	0.00	0.13	Age-cohort	113.39	152	1.00

*Log likelihood ratio test ($\alpha=5\%$); a p-value < 0.05 corresponds to a significant effect of the variable

**Goodness of fit test. A p-value > 0.05 indicates a good fit

¹ For Poland and Ireland, because the structure of the tested population by age and cohort was not available, the period was defined as the calendar year of detection and the birth cohort was calculated by subtracting the age from the year of detection

² Df degree of freedom

3.4. Modélisation de l'épizootie en Europe

Figure 3.30 - Plot (log scale) of the reproduction ratio (R_0) and Odds ratio (compared to a reference cohort defined per country ($OR=1$)), per birth cohort per country.

Type and year of control measures are indicated for each country (in the UK, dedicated line for rendering SRM in 1995; in Italy, partial SRM ban from countries with BSE in 1996)

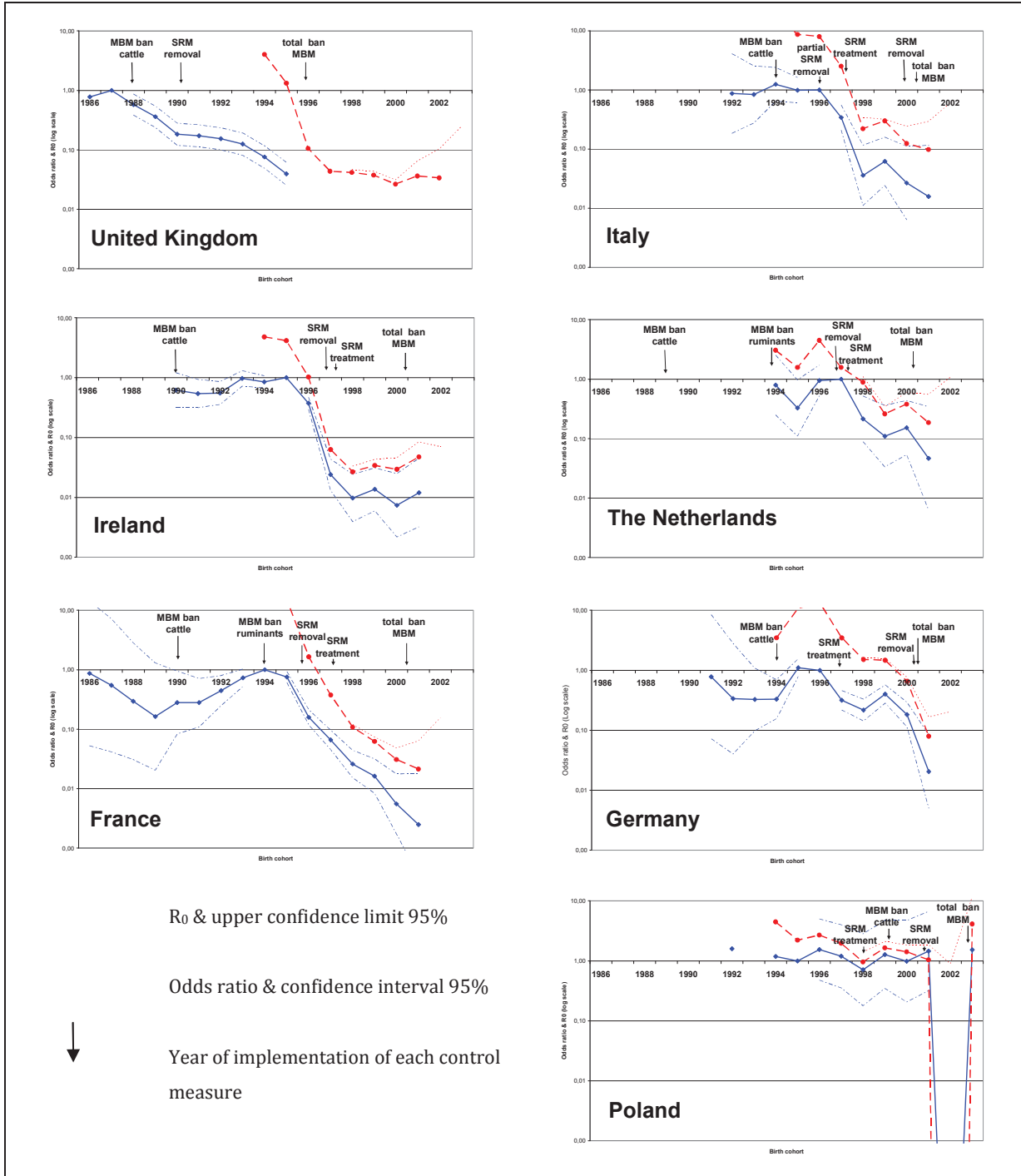
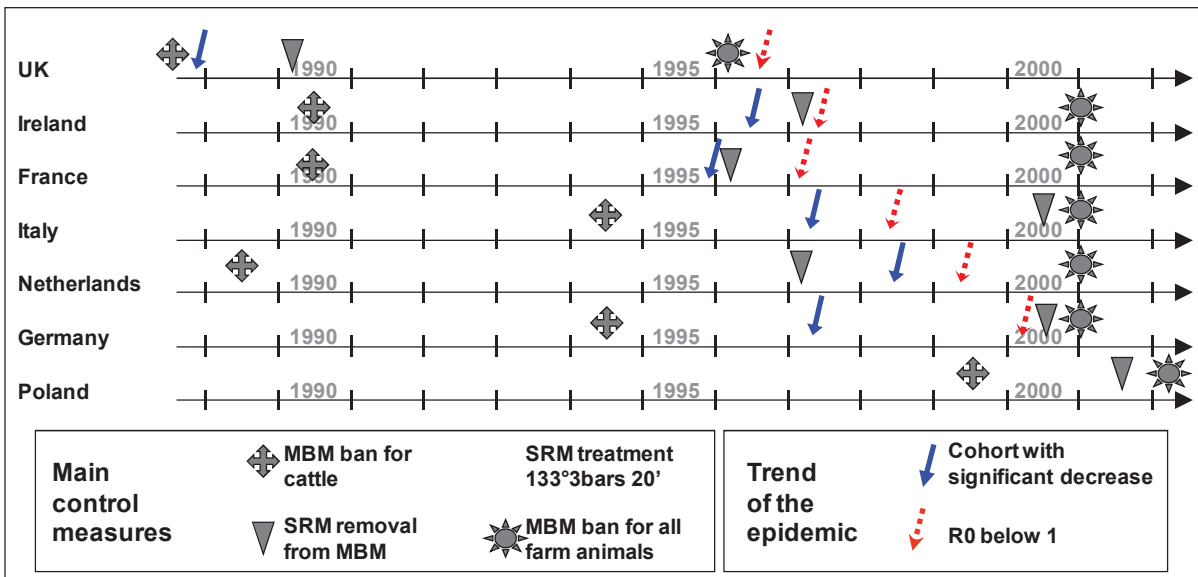


Figure 3.31 - Schematic time schedule of the main control measures and trend of the BSE epidemic per country.



Chapitre 4 - Evaluation du modèle APC dans le cadre de son application à l'épizootie d'ESB en France : une approche par simulation

Lors des premières modélisations APC des données ESB françaises, un effet significatif de la période d'observation a été mis en évidence (cf. partie 3.2.). Cet effet période n'était pas attendu, le jeu de données analysé ayant été restreint afin de s'affranchir d'un effet période lié aux variations du système de surveillance de l'ESB. Ainsi, seules avaient été incluses les données de surveillance des bovins de plus de 30 mois testés entre juillet 2001 et décembre 2007, période pendant laquelle la surveillance de l'ESB était exhaustive et stable pour ces animaux. Cependant, dans l'analyse comparative des données françaises et italiennes portant sur la même période d'observation et utilisant un découpage différent des cohortes de naissance (janvier-décembre), l'effet période n'était pas détecté (cf. partie 3.3.). Des résultats inverses ont été observés avec les données italiennes. Un effet période significatif a ainsi été mis en évidence lors de l'utilisation d'un découpage janvier-décembre des cohortes de naissance, tandis qu'aucun effet période n'était détecté avec d'un découpage juillet-juin.

En considérant que l'efficacité des systèmes de surveillance n'a pas varié au cours de la période étudiée, nous avons émis plusieurs hypothèses pouvant expliquer la détection de l'effet période lors de l'analyse des données françaises. La première hypothèse est que l'effet période observé est dû à une variation au cours du temps de la sensibilité des tests de dépistage. Les tests de dépistage développés depuis 1999 ont en effet subi des évolutions techniques ayant probablement eu pour conséquence une augmentation de leur sensibilité (cf. partie 1.1.3.2.). Cependant, les analyses statistiques réalisées sur des jeux de données restreints, issus des données ESB françaises, n'ont pas permis de mettre en évidence une différence de prévalence de l'ESB en fonction du test de diagnostic rapide [Maltaverne 2009]. La deuxième hypothèse repose sur le fait que, dans le modèle APC, l'effet période peut être vu comme une interaction très particulière de l'âge et de la cohorte (cf. partie 2.2.4.). Il est alors possible que l'effet période détecté soit le reflet d'une interaction âge-cohorte liée, par exemple, à l'augmentation au cours du temps de la durée d'incubation de la maladie [Supervie and Costagliola 2007]. Enfin, une dernière hypothèse est que l'effet période détecté est un artéfact lié à la faible prévalence de la maladie et à la très courte période d'observation, proche de la durée d'incubation de la maladie. Cette hypothèse nous semblait la plus plausible, vu l'inconstance de la détection de l'effet période relativement aux modalités de

catégorisation des données : prise en compte de la période réelle ou calculée et découpage utilisé pour la cohorte de naissance.

Afin d'explorer la validité des deux dernières hypothèses, nous avons développé une approche basée sur l'analyse APC de données simulées. Le premier objectif de cette simulation était d'évaluer le comportement du modèle APC, notamment les conditions de détection d'un effet période et la qualité de restitution des données, en fonction du profil épidémique -déterminant la prévalence globale de la maladie- et de la période d'observation. Le deuxième objectif était d'évaluer l'impact de la variation de la durée d'incubation de l'ESB sur les résultats du modèle, en termes de détection de l'effet période et de modification de l'âge moyen des animaux au diagnostic. Nous avons ainsi mis en place une simulation de données nous permettant : i) de faire varier la forme de la courbe épidémique et le niveau de prévalence de la maladie, ii) d'agrandir et de déplacer la fenêtre d'observation, iii) de faire varier au cours du temps la durée moyenne d'incubation de l'ESB.

Dans un second temps, l'analyse APC des jeux de données simulés permettait de déterminer pour chaque variation introduite, si un effet période était détecté, et d'évaluer la performance du modèle quant aux effets des variables âge et cohorte.

La première partie de ce chapitre est consacrée à la description de la méthode de simulation/analyse développée. La deuxième partie présente les résultats obtenus lors de l'étude spécifique de la nature artificielle de l'effet période menée à partir de profils épidémiques simples, sans variation de la durée d'incubation de la maladie. Dans une troisième partie nous présenterons les premiers résultats obtenus à partir des données simulées avec une augmentation au cours du temps de la durée moyenne d'incubation.

4.1. Matériel et méthode

L'objectif de la simulation des données était d'obtenir des jeux de données sous un format adapté à l'analyse APC, c'est à dire avec les cas ESB et les animaux testés regroupés par âge au dépistage, cohorte de naissance et année de détection. Comme précédemment nous avons modélisé la prévalence de l'ESB à la mort.

4.1.1. Paramètres de la simulation

4.1.1.1. Paramètres démographiques

Les données ont été simulées à partir des caractéristiques démographiques de la population bovine française estimées à partir d'informations extraites de la base de données nationale d'identification (BDNI).

Taille des cohortes de naissance

La taille initiale des cohortes de naissance, correspondant au nombre annuel des naissances, a été estimée à partir du nombre de naissances de bovins enregistrées en France entre 2003 et 2006. Nous avons fait l'hypothèse d'une stabilité des naissances au cours du temps et arrondi à 7 500 000 animaux la taille initiale de chaque cohorte de naissance (moyenne réelle de 7 506 817 animaux sur quatre ans).

Distribution de survie et survie conditionnelle

La distribution de survie des bovins a été estimée à partir du nombre d'animaux présents dans chaque groupe d'âge au premier janvier des années 2003 à 2006 (données BDNI). La courbe de survie présentait une partie décroissante quasi linéaire de 0 à 2 ans suivie d'une partie exponentielle décroissante (figure 4.32).

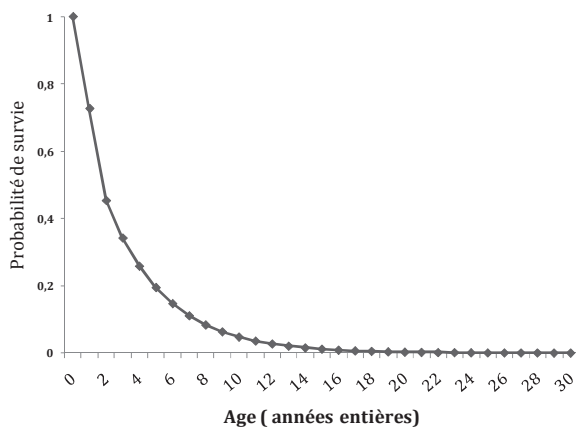


Figure 4.32 - Probabilité de survie de la population française bovine.

L'utilisation d'une fonction exponentielle unique visant à simplifier l'expression de la survie créait un écart important avec la courbe réelle de survie entre 2 et 6 ans, âges qui nous intéressaient particulièrement. Afin d'obtenir une estimation plus précise, la probabilité de

survie $P(s)$ a été modélisée au moyen d'une fonction en deux parties avec une solution de continuité à 2 ans :

$$P(s) = \begin{cases} -0,2733a + 1 & \text{si } 0 \leq a < 2 \\ 0,7961 * \exp(-0,2815a) & \text{si } 2 \leq a \leq 29 \\ 1 & \text{si } a = 0 \\ 0 & \text{si } a > 29 \end{cases} \quad (4.1)$$

avec a , l'âge en années révolues.

La survie maximale a été fixée à 29 ans en années révolues et la probabilité de survie a été normalisée de sorte à ce que la probabilité cumulée soit égale à 1.

Une survie conditionnelle au fait d'être en vie au moment de l'infection par l'ESB a été utilisée pour les animaux infectés.

Nous avons fait l'hypothèse d'une distribution de survie stable dans le temps et avons ainsi utilisé pour tous les animaux, quelle que soit leur cohorte de naissance, la même fonction de survie ou de survie conditionnelle.

4.1.1.2. Paramètres épidémiologiques de l'ESB

Ils permettent de définir pour chaque animal infecté un âge à l'infection et une période d'incubation. Nous avons supposé que la densité de l'âge à l'infection et celle de la période d'incubation étaient indépendantes, c'est à dire que la période d'incubation de la maladie ne dépendait pas de l'âge auquel l'animal avait été infecté.

Age à l'infection

Nous avons utilisé la distribution de l'âge à l'infection estimée par Supervie *et al* [Supervie and Costagliola 2004] en la simplifiant de manière à n'avoir plus d'infection après 3 ans d'âge (figure 4.33). La distribution de l'âge à l'infection (a_{inf}) a été définie par la fonction de probabilité en escalier discontinue suivante :

$$P(a_{inf}) = \begin{cases} 0 & \text{si } 0 \leq a \leq 0,5 \\ 0,856 & \text{si } 0,5 < a \leq 1 \\ 0,093 & \text{si } 1 < a \leq 2 \\ 0,051 & \text{si } 2 < a \leq 3 \\ 0 & \text{si } a > 3 \end{cases} \quad (4.2)$$

avec a l'âge des animaux.

Période d'incubation

Nous avons utilisé la fonction de distribution de la période d'incubation réévaluée par Supervie *et al* lors de la prise en compte des données de surveillance active de l'ESB [Supervie and Costagliola 2007]:

$$f(p_{inc}) = \frac{\gamma_1}{\Gamma(\gamma_3)} [\gamma_2 \exp(-\gamma_1 p_{inc})]^{\gamma_3} \exp[-\gamma_2 \exp(-\gamma_1 p_{inc})] \quad (4.3)$$

La simulation des données sans variation de la période d'incubation a été réalisée en utilisant les valeurs des paramètres de la fonction estimées par ces même auteurs : $\gamma_1 = 0,8$ $\gamma_2 = 65$ et $\gamma_3 = 0,845$, correspondant à une période d'incubation de moyenne 6,3 ans et de variance 3,3 ans² (figure 4.34).

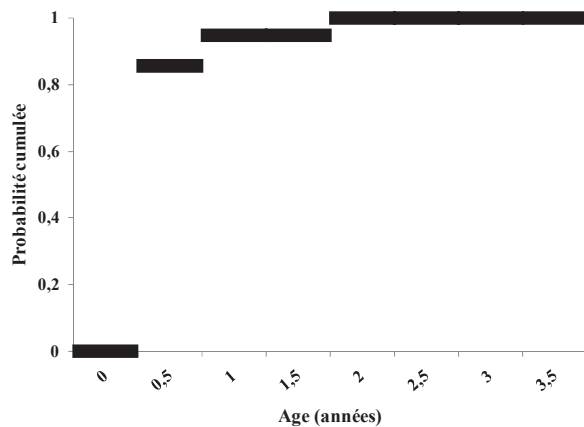


Figure 4.33 - Probabilité cumulée de l'âge à l'infection.

(adaptée de Supervie *et al*) [Supervie and Costagliola 2004]

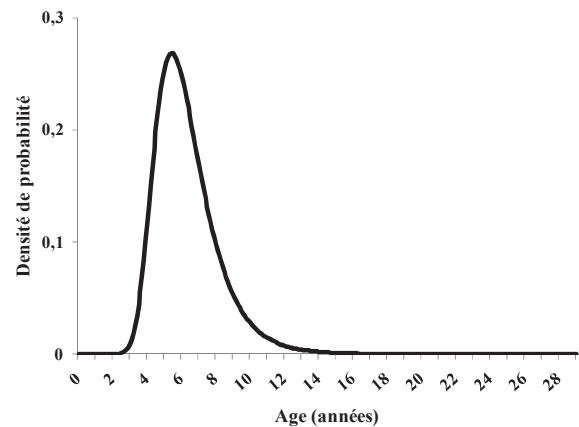


Figure 4.34 - Densité de probabilité de la période d'incubation de l'ESB.

(d'après Supervie *et al*) [Supervie and Costagliola 2007]

4.1.1.3. Paramètres liés à la surveillance de l'ESB

Systeme de surveillance

Contrairement aux précédentes études [ESST 2003; Supervie and Costagliola 2007; Supervie and Costagliola 2007], la question du canal de surveillance n'a pas été considérée et aucune distinction n'a été faite en fonction du système de surveillance auquel l'animal était soumis (équarrissage, abattoir ou suspicion clinique). Nous avons ainsi négligé la durée de la période clinique de la maladie. Cette approximation a été jugée pertinente dans la mesure où la durée de la période clinique, en général quelques semaines, est négligeable par rapport à l'âge des animaux à la mort. Cette hypothèse a été confortée par le fait que l'âge des cas

détectés via les différents systèmes de surveillance n'est pas statistiquement différent¹¹. Nous avons ainsi considéré que la fin de la période d'incubation d'un animal infecté correspondait à sa mort liée à la maladie.

Sensibilité des tests de diagnostic

A partir des évaluations de la sensibilité des tests de diagnostic rapides utilisés en France [Grassi *et al.* 2001], nous avons fixé la sensibilité du diagnostic à 100% pendant la période clinique et les 6 mois précédant la fin de la période d'incubation d'un animal infecté et à 0% sinon. Tous les animaux infectés, mourant dans les 6 mois précédant la fin de leur période d'incubation, étaient donc détectés comme des cas ESB.

Population testée

Afin de rester en accord avec le système français de surveillance de l'ESB (cf. partie 1.3.1.2.), tout en simplifiant le processus de simulation, la population bovine testée était exclusivement composée d'animaux âgés de 2 ans. Les données issues des plans de surveillance de l'ESB à l'abattoir et à l'équarrissage ont montré que la mortalité dans chaque groupe d'âge suivait la même distribution entre 2001 et 2007. Cette distribution était similaire à la distribution de survie des animaux de plus de 2 ans issue des données BDNI. Ceci nous a conforté dans le choix d'appliquer la même distribution de survie à toutes les cohortes.

4.1.1.4. Profils d'infection, périodes d'observation et variation de la durée d'incubation

Profils d'infection et population infectée

Les animaux infectés constituaient une population de taille variable, définie par un profil d'infection. Un profil d'infection était défini par deux paramètres : un nombre annuel d'animaux infectés et une période d'infection, correspondant au nombre d'années pendant lesquelles ces infections étaient programmées. Cinq profils d'infection de même durée ont été utilisés (figure 4.35 et tableau 4.12) :

- trois profils simples : profil P1 constant, profil P2 exponentiel croissant et profil P3 exponentiel décroissant

¹¹ Cas ESB atypiques exclus, la moyenne d'âge des cas détectés à l'abattoir entre juillet 2001 et décembre 2007 était de 7,32 ans [7,08-7,57] et celle des cas détectés à l'équarrissage et par le réseau clinique était, dans le même laps de temps, de 7,39 ans [7,25-7,54], sans différence significative de la moyenne de l'âge des cas entre les programmes au seuil de 5% ($z = 0,46$).

- deux profils plus complexes : profil P4 unimodal avec un pic d'infection en 1989 et profil P5 bimodal avec un premier pic d'infection en 1989 et un second atténué en 1994 déterminé à partir des estimations de Supervie *et al* [Supervie and Costagliola 2007].

Afin d'être concordant avec l'épizootie française, un maximum de 12 000 animaux par an a été infecté et une période d'infection de 16 ans, de 1985 à 2000, a été utilisée pour tous les profils d'infection.

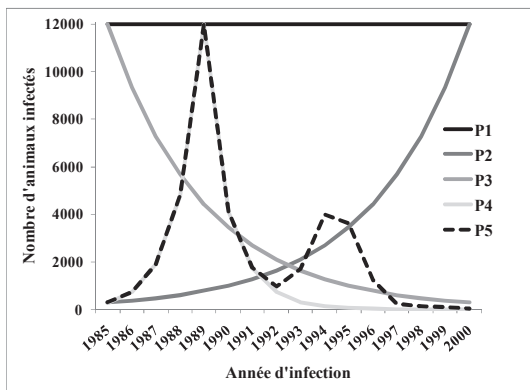


Figure 4.35 - Profils d'infection : nombre d'animaux infectés annuellement.

Tableau 4.12 - Nombre total d'animaux infectés par profil d'infection.

Profil d'infection	Total infecté sur 16 ans
P1	192 000
P2	53 209
P3	53 205
P4	26 821
P5	37 380

Période d'observation

Nous avons fait varier la durée et la position (place dans le temps par rapport au début de l'épizootie) de la période d'observation, afin d'évaluer son influence sur les résultats du modèle APC, notamment sur la détection d'un effet période. Pour cela, nous avons tout d'abord défini quatre périodes d'observation à partir desquelles la durée d'observation a été allongée ou raccourcie :

- période 1985-2014 : période d'observation de 30 ans débutant en 1985, en même temps que l'épizootie et se terminant en 2014, date à laquelle la quasi totalité des cohortes infectées était testée,
- période 1985-1991 : période d'observation de 7 ans de 1985 à 1991,
- période 1985-2044 : période d'observation de 60 ans, commençant en 1985 et se terminant en 2044, permettant de couvrir la période suivant l'épizootie,
- période 1970-1991 : période d'observation de 22 ans commençant en 1970 et se terminant en 1991 permettant de couvrir la période précédant l'épizootie.

Deux modalités de variation des périodes d'observation ont été mises en œuvre :

4.1. Matériel et méthode

- une réduction par la gauche afin de juger de l'effet d'un retard à la mise en place de la surveillance par rapport au début de l'épizootie. Cette réduction a été appliquée aux périodes 1985-2014 et 1985-2044.
- un allongement par la droite des périodes 1985-1991 et 1970-1991, illustrant le suivi dans le temps de l'épizootie.

En complément, afin d'étudier plus précisément la période d'observation dont nous disposons pour les données françaises, nous avons défini une fenêtre d'observation de sept ans placée de 2001 à 2007. Cette fenêtre a été élargie à gauche puis à droite pour juger de l'effet respectivement, du retard à la mise en œuvre et de la prolongation de la surveillance sur les résultats du modèle.

Période d'incubation

Afin d'étudier la validité de la deuxième hypothèse que nous avons formulée pour expliquer l'effet période détecté (effet période lié à une interaction âge-cohorte), nous avons allongé progressivement la durée moyenne d'incubation au cours de la période d'infection, en faisant varier le paramètre γ_2 de la fonction (4.3). Dans leur travaux, Supervie *et al* [Supervie and Costagliola 2007] avaient estimé une possible augmentation de la durée d'incubation de l'ESB de 1,3 ans entre leur première estimation, basée sur les données ESB de 1990 à 2001, et leur seconde estimation, basée sur des données étendues jusqu'à 2004. Afin de reproduire ce schéma, nous avons fait varier la durée moyenne d'incubation de 5 à 6,5 ans entre 1985 et 2000, la variance étant maintenue à 3,3 ans² (tableau 4.13).

Tableau 4.13 - Moyenne de la période d'incubation en fonction de la valeur du paramètre γ_2 de la fonction (4.3).

Année d'infection	Moyenne théorique	Moyenne estimée*	Valeur de gamma2	Année d'infection	Moyenne théorique	Moyenne estimée*	Valeur de gamma2
1985 (y0)	5	4,98	22,5	1994 (y9)	5,9	5,91	47,5
1986 (y1)	5,1	5,11	25	1995 (y10)	6	6	51
1987 (y2)	5,2	5,2	27	1996 (y11)	6,1	6,09	55
1988 (y3)	5,3	5,31	29,5	1997 (y12)	6,2	6,2	60
1989 (y4)	5,4	5,42	32	1998 (y13)	6,3	6,3	65
1990 (y5)	5,5	5,51	34,5	1999 (y14)	6,4	6,39	70
1991 (y6)	5,6	5,61	37,5	2000 (y15)	6,5	6,5	76
1992 (y7)	5,7	5,71	40,5				
1993 (y8)	5,8	5,81	44				

*moyenne calculée à partir d'un échantillon de 1 000 000 tirages avec remise.

4.1.2. Processus de la simulation

Pour chaque profil d'infection, 100 itérations ont été effectuées. La simulation des données a été réalisée au moyen du logiciel R (programmes disponibles en Annexe I) et du générateur de nombre aléatoire Mersenne-Twister, dont la graine a été automatiquement changée au début de chaque simulation, en utilisant une suite de nombres préétablie. Ce procédé a permis de s'assurer de l'indépendance des 100 jeux de données simulés pour chaque profil d'infection. Les populations d'animaux infectés et testés ont été constituées de manière indépendantes selon le processus décrit ci-dessous.

4.1.2.1. Population infectée

A chacun des n animaux infectés chaque année y_{inf} de la période d'infection allant de y_0 (1985) à y_{15} (2000), nous avons attribué de manière aléatoire :

- un âge à l'infection (a_{inf}) en utilisant de la distribution de probabilité (4.2),
- une durée d'incubation (p_{inc}) à partir de la fonction (4.3) avec γ_2 fixe, indépendant de y_{inf} , ou γ_2 dépendant de y_{inf} lors de la variation de la période d'incubation au cours du temps,
- une durée de survie conditionnellement au fait d'être en vie au moment de l'infection (s_c) dérivée de la fonction de survie (4.1).

Nous avons alors calculé pour chaque animal :

- son âge au moment des symptômes cliniques a_{cli} correspondant à la fin de sa période d'incubation : $a_{cli} = p_{inf} + a_{inf}$,
- sa cohorte de naissance C : $C = y_{inf} - a_{inf}$,
- son âge au diagnostic A en considérant que :
 - o l'animal sera testé et détecté à l'âge
 - $A = a_{cli}$, si $s_c > a_{cli}$
 - $A = s_c$, si $a_{cli} \geq s_c > a_{cli} - 0,5$
 - o l'animal sera testé mais non détecté si $a_{cli} > s_c \geq 2$; nous avons alors fixé arbitrairement $A = 0$
 - o l'animal ne sera pas testé s'il meurt avant l'âge de 2 ans ($s_c < 2$) ; nous avons alors fixé arbitrairement $A = -1$
- son année de détection P : $P = A + C$

4.1.2.2. Population testée

Le nombre annuel d'animaux testés négatifs a été calculé en appliquant la distribution de survie (4.1) à chaque cohorte de naissance. Nous avons ainsi obtenu le nombre d'animaux morts à chaque âge dans chaque cohorte de naissance. Les animaux étant testés au moment de leur mort, nous disposions donc de la population testée par âge, cohorte et année de détection cette dernière étant calculée à partir de l'âge et de la cohorte. Les animaux décédant avant l'âge de 2 ans ont alors été exclus.

4.1.2.3. Constitution des jeux de données

Les cas ESB correspondant aux animaux infectés détectés (animaux ayant un âge au diagnostic supérieur à 0 (cf. supra)), et les animaux testés négatifs ont été regroupés par âge, cohorte et période (année de détection) en utilisant des intervalles de un an. Par simplicité et ce nombre étant très faible par rapport à la taille de la population, le nombre d'animaux infectés n'a pas été ajouté au nombre d'animaux testés négatifs pour constituer un dénominateur « exact » pour le calcul de la prévalence de l'ESB à la mort.

Au final, seuls les animaux (négatifs et cas) dont la mort survenait au cours de la période d'observation d'intérêt étaient conservés dans les jeux de données soumis à l'analyse APC.

4.1.3. Analyse APC

Les jeux de données ont été analysés directement après leur simulation au moyen du modèle APC binomial catégoriel utilisé précédemment. Un modèle sans intercept a été utilisé de façon à obtenir la prévalence pour la cohorte ou l'âge, selon la variable entrée en premier dans le modèle [Venables and Ripley 2002], la période étant systématiquement entrée en dernier dans les modèles AP et ACP. Les groupes de référence ont été fixés à 6 ans pour l'âge et 1989 pour la cohorte lorsque nécessaire (pas de référence nécessaire pour la première variable entrée dans le modèle pour laquelle c'est la prévalence qui est obtenue). Pour la période d'observation, le groupe de référence P_{ref} dépendait de la modalité de variation de la période d'observation. Dans le modèle AP, l'année de référence a été ainsi définie comme l'année d'observation ayant la prévalence non ajustée la plus élevée sauf pour la fenêtre d'observation 2001-2007 et ses variations pour lesquelles l'année de référence médiane était alors utilisée comme référence. Pour rendre le modèle ACP identifiable, une contrainte supplémentaire a été utilisée sur la période ; lorsque la période d'observation était allongée, nous avons défini $P_{bis} = P_{ref} - 1$, et $P_{bis} = P_{ref} + 1$ sinon. L'ajustement des modèles a été réalisé selon la procédure

pas à pas proposée par Clayton et Schiffler [Clayton and Schifflers 1987; Clayton and Schifflers 1987]. Pour sélectionner le meilleur modèle nous avons utilisé, comme précédemment, le critère d'Akaike en se basant sur une différence de plus de 4 entre l'AIC minimal et celui du modèle retenu [Burnham and Anderson 1998].

4.1.4. Exploitation des résultats

A la fin du processus de simulation-analyse, nous avons étudié pour chaque simulation de chaque profil d'infection et pour chaque période d'observation le type de modèle sélectionné et les effets de l'âge (ORs ou prévalence), de la cohorte (ORs ou prévalence) et de la période (ORs). A partir de ces résultats, un premier travail, sans variation de la période d'incubation à permis : i) de déterminer les conditions dans lesquelles un effet période de type artefact était mis en évidence ii) d'évaluer les performance du modèle APC en fonction de la présence de cet effet période et de la période d'observation (partie 4.2.). Dans un deuxième temps, nous avons introduit dans le processus de simulation des données une augmentation progressive de la durée moyenne d'incubation de la maladie afin d'évaluer son impact sur la détection de l'effet période. Les premiers résultats obtenus sont présentés en troisième partie de ce chapitre (partie 4.3.).

4.2. Evaluation du modèle APC en situation épidémique

“Age-Period-Cohort modelling in an epidemic context: a simulation approach to explain the period effect evidenced for the bovine spongiform encephalopathy epidemic in France”

Carole Sala^{1*}, Benoît Durand², Dominique Costagliola³, Christian Ducrot⁴ and Didier Calavas¹

¹ AFSSA Lyon, 31 Av. Tony Garnier, F69364 Lyon Cedex 07, France

² AFSSA Alfort, 23 Av. du Gén. De Gaulle, F94703 Maisons-Alfort Cedex, France

³ INSERM, U943; UPMC Université Paris VI, UMR-S 943; AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Service des maladies Infectieuses et tropicales F 75013 Paris, France

⁴ INRA Theix, F63122 St. Genès Champanelle, France

Corresponding author: Carole Sala, Unité Epidémiologie, AFSSA Lyon, c.sala@afssa.fr

Summary

Age-Period-Cohort (APC) models are routinely used in time trend analyses of chronic diseases but very few examples of their application to epidemic diseases are available. APC analyses of the French bovine spongiform encephalopathy (BSE) epidemic evidenced an unexpected period effect first attributed to the design of the study, in relation to low BSE prevalence and a short surveillance period. The aim of our study was to evaluate the relevance of our hypothesis and the impact of parameters such as prevalence level and surveillance period on the results of an APC model in a BSE epidemic context. We simulated datasets mimicking the French BSE epidemic and its varying pattern, as well as duration and location in time of surveillance period, and analysed them with a categorical APC model. Results showed that the period effect was evidenced in around 50% of analysed datasets while no period effect was introduced in the data simulation process. Such an artefactual period effect was detected when a sudden change of cohort prevalence occurred over a short period of time. However this artefactual period effect did not have a strong impact on the estimation of cohort prevalence, which was more sensitive to the duration and location of the surveillance period in relation to the year at which highly infected birth cohorts are detected as BSE cases.

Keywords: Data simulation, Age-Period-Cohort models, bovine spongiform encephalopathy

4.2.1. Introduction

Age-Period-Cohort (APC) modelling is routinely used in time trend analysis of chronic diseases, as it enables the estimation of the respective effects of age, surveillance period (calendar time) and birth cohort on the incidence or prevalence of the disease [1-4]. In such a model, age is associated with inherent biological processes while the surveillance period is associated with external factors that equally and simultaneously affect all ages and birth cohorts at a specific period of time. The birth cohort effect is presumed to reflect all events affecting all individuals in a cohort equally, independently of their age and surveillance period. Therefore, the cohort is traditionally considered as a set of individuals sharing a common experience, such as exposure to risk factors varying over time [5, 6]. Despite some methodological problems - in particular non-identifiability of the model [1-4] - APC models have played a crucial role in epidemiological studies and are still routinely used for time trend analysis of cancer incidence or mortality rates [7-10].

We recently used an APC model to estimate the time trend of the bovine encephalopathy spongiform (BSE) epidemic in France [11, 12]. Such a model is well suited for studying BSE, as the age at diagnosis and birth cohort are the main factors influencing the observed BSE prevalence. The results obtained were consistent with those from previous BSE modelling [13-15]. However, despite the fact that no period effect was expected, as we used data collected during a stable surveillance period, a significant non-linear period effect was evidenced, in both categorical and continuous analyses. The hypotheses accounting for this unexpected period effect were i) a real period effect due to unidentified variations in the surveillance system, such as a temporal variation in the sensitivity of diagnostic procedures, ii) an artefactual period effect due to the structure of the dataset, and probably linked to the very low disease prevalence, limited surveillance period and incomplete testing of some of the infected birth cohorts.

The aim of the current work was to evaluate the behaviour of the APC model in the case of an epidemic disease such as BSE. To do this, firstly we simulated a dataset of a cattle population infected with BSE; it mimicked a theoretical epidemic and was based on French cattle population dynamics and BSE epidemiological characteristics. Then, we examined various epidemiological situations and varying surveillance periods, to analyse in which situations a period effect was detected and its impact on the estimated cohort prevalence when we applied the categorical APC model to the data. Comparing the results of the APC model to the simulated data, we discussed the conditions in which the period effect was detected and

evaluated the impact of such an effect on the estimation of the cohort prevalence in a BSE-based epidemic situation.

4.2.2. BSE context

The first case of BSE was identified in the United Kingdom in 1986 before being identified in most other European countries [16]. In France, around 1,000 BSE (<http://agriculture.gouv.fr/esbinfo/esbinfo.htm>, accessed on 11 August 2009) cases have been detected so far in the adult cattle population, by testing approximately 20 million animals since July 2001.

BSE is a fatal infectious neurodegenerative prion disease affecting cattle and transmissible to humans, as the cause of variant Creutzfeldt-Jakob disease [17]. BSE is characterised by a long incubation period and early age at infection. Modelling studies have estimated that in 80% of cases, cattle were infected before 12 months of age with a mean incubation period of around 5 years [15, 18-21].

The origin of BSE remains uncertain but is probably linked to changes in the processing of meat and bone meal (MBM) used in cattle feed, that enabled the prion to be recycled and amplified [22]. Since risk factor studies demonstrated the role of prion-contaminated MBM, feeding has been considered as the main, if not sole, source of infection [23-27]. Successive control measures have therefore been adopted to reduce the exposure of cattle to BSE and control the bovine epidemic. At the end of 2000, European regulations imposed a total ban on MBM feed for all farm species and exhaustive BSE surveillance, testing all cattle over 30 months of age, dead-on-farm or slaughtered for human consumption (http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/chronology_en.htm, accessed on 11 August 2009). Analysis of the BSE surveillance data evidenced the decline of the BSE epidemic in most BSE-affected European countries .

4.2.3. Material and method

4.2.3.1. Simulated datasets

Simulation parameters

French cattle population dynamics

The annual number of births in French cattle was rounded to 7,500,000 animals for all the birth cohorts, using the average annual number of births registered from 2003 to 2006 in the French bovine identification database (Base de Données Nationale d'Identification, BDNI). The

survival distribution of cattle was estimated from the same dataset. We assumed that the survival curve of cattle was constant over time and not influenced by the BSE epidemic. The maximal age was fixed at 29 years, in complete years, and the survival distribution normalised, so that the cumulative probability of death at 29 years of age equalled one.

Natural BSE infection parameters

We used the distributions of age at infection and incubation period estimated by Supervie et al from French BSE data modelling [15, 21]. The distribution of the age at infection was slightly simplified, with no infection occurring before 0.5 and after 3 years of age. For the distribution of the incubation period we used the gamma distribution estimated by the same authors with 6.3 years and 3.3 years², respectively for the mean and variance of the incubation period.

Patterns of epidemic: definition of infection profiles

The infection profile was defined by the number of animals infected annually in the cattle population and the duration of the period in which infections occurred (referred to hereafter as the infection period). We used four simple infection profiles (Figure 4.36a): a linear constant pattern (profile 1), an exponentially decreasing function (profile 2), an exponentially increasing function (profile 3) and a pattern including a peak of infection after an exponential increase followed by an exponential decrease (profile 4). Levels and duration of infection profiles were chosen to be consistent with the estimates for the French BSE epidemic. A maximum of 12,000 animals were infected annually and infections occurred over a 16-year infection period from $y_0 = 1985$ to $y_{15} = 2000$. We arbitrarily fixed a minimal number of infections at the beginning of each increasing infection profile, considering that this was necessary to induce an epidemic.

Surveillance parameters: tested population and sensitivity of diagnostic test

As in current French BSE surveillance, only cattle over 2 years old were tested, i.e., only data from this sub-population were analysed. We estimated the BSE prevalence at death, which is the number of BSE-positive animals in the cattle population submitted to a diagnostic test at the time of death.

According to current knowledge, we fixed the sensitivity of the diagnostic tests at 100% during the 6-month period preceding the end of the incubation period and at 0% beforehand

[28]. Infected animals dying or being slaughtered from 0 to 6 months before the end of their incubation period would therefore be tested as positive and counted as BSE cases.

Range of variation of the surveillance period

We varied the starting point and duration of the surveillance period to analyse their impact on the APC results, more precisely detection of the period effect and accuracy of the cohort prevalence estimate. We defined two surveillance periods from which we derived other surveillance periods using year-by-year left-reduction or right-extension as follows:

- a 1985-2014 surveillance period of 30 years, reduced year-by-year to a 7-year 2008-2014 period,
- a 1985-1991 surveillance period of 7 years, extended year-by-year to a 1985-2014 period.

The left-reduction was used to explore the effect of delaying the implementation of disease surveillance, while the right-extension mimicked prolongation of the surveillance. The maximal 30-year surveillance period enabled the complete testing of all the infected birth cohorts, while the minimal 7 years corresponded to the duration of the period for which we analysed the average time of BSE occurrence in cattle.

In addition we also explored two other surveillance periods in order to cover more widely the time preceding or following the infection period:

- a 1985-2044 surveillance period reduced year-by-year to a 2008-2044 period,
- a 1970-1991 surveillance period extended year-by-year to a 1970-2014 period.

Simulation process

Datasets were simulated with R software [29] using the Mersenne-Twister random number generator to determine age at testing and year of animal testing. The simulation process is described in detail in the Appendix. To introduce variability in our data, we simulated 100 datasets per infection profile. To ensure that each dataset was unique, the seed used in the random sampling process was updated at the start of each data simulation. Datasets were simulated for the 1970-2044 surveillance period in which animals from 2 to 29 years, born in the 1941 to 2042 birth cohorts, were tested.

4.2.3.2. APC analyses

APC analysis of simulated datasets was carried out using a categorical binomial model as previously done [12]. Only data corresponding to the surveillance period of interest were analysed.

We used the stepwise procedure defined by Clayton and Schiffler [30]. Thus we fitted successively the age model (A), age-drift model (AD), age-period model (AP), age-cohort model (AC) and then the full APC model. In the AD model, the drift corresponds to the linear trend in prevalence which could not be attributed separately to the period or cohort effect.

The model was formulated to estimate prevalence per birth cohort, and Odds ratios (ORs) for age and period effects. To do this, the intercept was excluded from the analysis and the cohort was entered first in the AC and APC models [31]. Using such a design, no reference group needed to be defined for the birth cohort. The age reference group was fixed at 6 years in all analyses, while the period reference group was the one with the highest non-adjusted prevalence. The full APC model was identified using a minimal additional constraint [1, 4, 32] on period parameters by equalising to 0 the value of the period adjacent to the reference one.

The parameters were estimated using the maximum likelihood method. Selection of the best models was based on the Akaike Information Criterion (AIC) following the proposal of Burnham and Anderson [33] to retain model i if $\Delta_i = (\text{AIC}(\text{model}_i) - \text{minAIC}) \leq 4$, where minAIC is the minimum AIC i.e., that of the best model. When such a process selected an APC model, the corresponding AC model was also considered to compare cohort prevalence estimates of the two models.

4.2.3.3. Evaluation of the performance of the model in estimating cohort prevalence

To evaluate the performance of the APC analysis, we calculated the deviation in the estimate of cohort prevalence compared to the simulated cohort prevalence, for the different infection profiles, surveillance periods and in the presence or absence of a detected period effect. For each infection profile, surveillance period and infected birth cohort, we therefore calculated the following standardised bias [Burton *et al.* 2006]:

$$100 * \frac{\bar{\beta}_{i,p} - \beta_i}{\sqrt{\text{var}(\hat{\beta}_{i,p}) + \text{var}(\beta_i) - 2\text{cov}(\hat{\beta}_{i,p}, \beta_i)}} \quad (1)$$

where $\bar{\beta}_{i,p}$ is the average estimate of prevalence at 6 years of age in the infected cohort i observed during the period p , $\bar{\beta}_{i,p} = \sum_1^S \frac{\hat{\beta}_{i,p}}{S_{i,p}}$, $S_{i,p}$ is the number of simulations included to

calculate $\bar{\hat{\beta}}_{i,p}$ and $\bar{\beta}_i$ is the average simulated prevalence computed on the 100 simulations at 6 years of age in the infected cohort i and for a 30-year surveillance period. $\bar{\hat{\beta}}_{i,p} - \bar{\beta}_i$ is also the average bias for cohort i observed during the period p and $\sqrt{\text{var}(\hat{\beta}_{i,p}) + \text{var}(\beta_i) - 2\text{cov}(\hat{\beta}_{i,p}, \beta_i)}$ corresponds to the variation of $(\hat{\beta}_{i,p} - \beta_i)$.

To evaluate the impact of the period effect on the estimate of cohort prevalence, the standardised bias was calculated for APC and the corresponding AC models selected as previously defined.

As this bias is a percentage of a standard error, it can only be calculated when at least two APC or AC models are selected. It has been proposed that such a standardised bias was significant for absolute values greater than 40%, revealing the poor performance of the model[35].

4.2.4. Results

4.2.4.1. Simulated datasets

The simulated population for the 1985-2014 period was very homogenous over the 400 datasets (100 simulations for each infection profile) and showed variability of less than 1% in the number of tested animals per year of surveillance. Similar variability was observed in the number of tested animals in birth cohorts from 1975-2012 and age groups from 2 to 20 years. However, outside this range and only for the extreme categories, variations of up to 4% and 24% were observed for age groups and birth cohorts respectively. Concerning the infected animals, due to the distribution of the age at infection, 18 birth cohorts, from 1983 to 2000, were infected over the 16-year infection period (Figure 4.36b). Whatever the infection profiles and datasets, in the best conditions (30-year surveillance period), less than 20% of animals initially infected were detected (Figure 4.37). The proportion of detected infected animals, which varied with the infection profile, was strongly affected by the position and duration of the surveillance period. Less than 10% of infected animals were detected for profile 1 when the 1985-2014 surveillance period was left-reduced to a 16-year 1999-2014 period (Figure 4.37a). This proportion was reached from the 2004-2014 period for profile 2, the 1994-2014 period for profile 3 and the 1996-2014 period for profile 4 (Figure 4.37a). When the 1985-1991 surveillance period was right-extended, the maximal percentage of detected infected animals was reached from the 1985-2007 surveillance period for profile 1 (Figure 4.37b). Such a percentage was reached with an additional year of surveillance for

profile 2 (1985-2008 period), but observed with shorter surveillance periods for profiles 3 and 4 from the 1985-2004 and 1985-2000 periods respectively (Figure 4.37b).

4.2.4.2. Model selection

The results of the model selection are detailed for each infection profile and surveillance period, in Table 4.14a for the left-reduction of the 1985-2014 surveillance period and Table 4.14b for the right-extension of the 1985-1991 surveillance period. A period effect was detected at least once whatever the infection profile, but the proportion of APC or AP models selected from the 4800 ($2*24*100$) datasets analysed for each infection profile with the reduction and extension of the surveillance period varied strongly with the infection profile and surveillance period.

When the surveillance period was left-reduced, the APC model was thus selected for profile 1 in 54.3% of analyses performed for this profile, with a variation from 100% of APC models selected for the five longest surveillance periods (30 to 26 years of duration) to 0% for the shortest periods (Table 4.14a). For profile 2 this proportion varied from 1 to 94% with a mean for the 2400 datasets analysed of 70.9%. For profiles 3 and 4, the APC model was selected less often with respectively 20.3% (0-100%) and 33.0% (0-99%) of APC models selected (Table 4.14a). The APC model was also detected much more often when the surveillance period included the beginning of the epidemic.

When the 1985-1991 surveillance period was right-extended, the APC model was selected in 100% of analyses for profiles 1 and 3 (Table 4.14b). It was also often selected for profile 4 with an average APC selection of 80.4% (0-100%). For profile 2, results differed and the APC model was only selected in 23.1% of the analyses and mostly for surveillance periods over 24 years of duration (Table 4.14b).

When the surveillance period largely covered the period following the end of the epidemic (Table 4.14c), the APC model was selected less often. It was thus selected in 17.5% of the 2400 analyses performed with profile 1, from 0 to 97% depending on the surveillance period. This percentage fell to 0.3% (0-1%) for profile 2, 16.4% (0-100%) for profile 3 and 4.6% (0-20%) for profile 4 (Table 4.14c). Similarly, when the surveillance period covered the period preceding the epidemic (Table 4.14d), the APC model was selected slightly less often with an average for the 2400 analyses performed for each infection profile of 97%, 2.5%, 97.3% and 63% respectively for profiles 1, 2, 3 and 4.

Whatever the infection profile and modality of the variation of the surveillance period, the AP model was never selected for profile 1 (Table 4.14). And it was seldom selected for other

infection profiles, in 0.1% of analyses for profile 3 when the 1985-2014 surveillance period was left-reduced (Table 4.14a), in 3.5% of analyses for profile 4 when the 1985-1991 surveillance period was right-extended (Table 4.14b) and in 6.9% and 3.9% of analyses for profile 2 when respectively the 1985-1991 and 1970-1991 surveillance periods were right-extended (Table 4.14b and 4.14d).

To summarise, a period effect was detected in 67.2% of overall analyses for profile 1, 26.9% for profile 2, 58.5% for profile 3 and 46.1% for profile 4.

4.2.4.3. Estimate of the birth cohort prevalence

Distribution of the standardised bias calculated for each infected birth cohort and surveillance period is presented in Table 4.15 for each infection profile, model type (APC or AC) and modality of surveillance period variation. In addition, the mean of this standardised bias per infected birth cohort and observation period is illustrated in Figure 4.39 for profile 1 and 2. Standardised biases appeared small overall whatever the model (AC or APC) and infection profile considered. Only one significant value of the bias was observed for profile 4, model APC and extension of the 1985-1991 surveillance period (Table 3.15b). Signs of standardised bias indicated that both APC and AC tended to overestimate the cohort prevalence especially for the oldest cohorts and/or shortest surveillance periods (Figure 4.39a and 4.39c).

4.2.5. Discussion

BSE is a disease whose epidemiological parameters are currently well known but whose prevalence at death has only been accessible since 2001 in France. Moreover, due to the epidemiological characteristics of BSE, modelling approaches, such as APC analysis, are needed to estimate the time trend of the disease. In this study, we used simplified epidemic patterns to evaluate the results of APC analysis in controlled situations. The goal was to understand the unexpected period effect previously evidenced in French BSE modelling and in addition to explore the bias potentially induced by the presence of this period effect. We thus evaluated the behaviour of the APC model in simple and contrasted epidemic situations and for various surveillance periods.

4.2.5.1. Material and method

Concerning simulation parameters, the unrealistic temporal stability of the size of birth cohorts may not have affected results of cohort prevalence as the number of BSE cases

simulated was very low compared to the cattle population size. No variation in the efficiency of the surveillance system was introduced in the simulation process, i.e., every animal that could be detected with regard to its incubation period and age at death was detected. Constant distributions of incubation time and age at infection were also used to ensure that no interaction between age and cohort, that might be detected by the model as a period effect, would occur.

The use of different infection profiles and surveillance periods made it possible to estimate the percentage of cases for which a period effect could be detected, as was the case in the analysis of the French situation. The exploration of two additional surveillance periods more widely covering the time preceding and following the infection period, respectively 1970-1991 and 1985-2044, was performed to evaluate whether the period effect detected was due to the time of implementation and duration of the surveillance. Indeed, we assumed that the beginning of surveillance in a developing epidemic might be detected by the model as a period effect due to the characteristics of the surveillance system.

4.2.5.2. Results

Despite no period effect being introduced in the simulated datasets, significant non-linear period effects were evidenced in 49.6% of the overall datasets analysed (38,400 analyses). Situations where APC or AP models were selected differed.

AP models were indeed selected when no cohort effect was yet detectable due to very short surveillance periods located at the beginning of exponentially increasing epidemic profiles (Table 4.14b and Figure 4.36). With such an infection profile, the number of BSE cases at the beginning of the epidemic does not differ strongly from one cohort to the next. In this case the model attributes the time trend of BSE prevalence to a period effect (AP models) or to a linear global trend that cannot be attributed to cohort or period effects (AD models) [36].

Concerning the selection of APC models, an artefactual period effect was most often detected when the epidemic curve showed sudden changes in cohort prevalence within a short period of time. It is also possible that such changes in cohort prevalence, leading to sudden changes in prevalence per year of surveillance (Figure 4.38), may be incorrectly attributed, resulting in the detection of an artefactual period effect, whereas the trend of BSE prevalence was actually due to a pure cohort effect.

In the case of BSE, the rapid change in cohort prevalence led to similar change in the prevalence observed per year of surveillance by the combination of two phenomena. First, due to the specific distribution of age at infection that concerns mostly the first 3 years of life,

the infection pattern per birth cohort differed from those of the infection profile for the first three infected cohorts (Figure 4.36b). This induced a steep increase in the prevalence per birth cohort within a very short period of time for profiles 1 and 3. Second, due to the age at infection and infection period distributions, animals infected at year y_0 would be mainly detected between years y_6 and y_7 , when they reached the end of their incubation period. This led to a sudden change in the annual prevalence within a 6 or 7 year timeframe (Figure 4.38). This could explain why the detection of a period effect seemed more sensitive to sudden prevalence changes located at the beginning of the surveillance period, more specifically between 1985 and 1990 (Table 4.14a and 4.14c). Indeed left-reduction of the surveillance period (from 1985-2014/2044 to 2008-2014/2044) induced a reduction in the proportion of models in which the period effect was detected, whatever the infection profile. The detection of this artefactual period effect seemed mitigated by the increase in the duration of the surveillance period for profiles in which sudden changes in the prevalence curve occurred over longer time intervals (profiles 2 and 4 in table 4.14c), but did not totally disappear.

However, the presence of an artefactual period effect in the APC models did not strongly affect the estimation of the cohort effect, as the overall standardised bias for the APC models remained close to the standardised bias calculated for AC models on the same datasets (Table 4.15). Cohort prevalence generally showed higher variability and more overestimation with APC than with AC modelling. As expected, and independently of the period effect, infection profiles and position and duration of surveillance period also affected the estimate of the cohort effect. Indeed the overall level of disease prevalence and birth cohorts observed at specific time periods depended on the infection profile and the position and duration of the surveillance period. In the case of BSE, the accuracy of the estimates would also be higher when prevalence is high, with more infected cases being detected as soon as birth cohorts are tested at an age close to the end of the disease's incubation period.

The results of this simulation study showed that in an epidemic context, an artefactual period effect can be detected even in the best conditions (relatively high prevalence, fully tested birth cohorts, long surveillance period and no change in surveillance system) as soon as the epidemic pattern includes sudden changes in cohort prevalence over a relative short period of time. APC modelling is mainly used for the study of long latency diseases and few examples of its application to epidemic diseases are available. In chronic diseases, time trend variations are often slow and prevalence patterns such as those studied in our simulation are rarely observed. It is likely that the artefactual period effect evidenced in our study was never detected in APC analyses of long-term diseases. However as evidenced in recent studies of

breast cancer incidence [37, 38], sudden changes in chronic disease incidence can be observed over a short period of time. In the situation where a period effect is expected due to simultaneous changes in the exposure of all cohorts or variations in disease surveillance, it is possible that the period effect could be overestimated if such changes led to sudden variations in disease incidence within a short period of time.

In situations like ours, where no period effect was expected, as no change occurred in the surveillance system, the question remains whether or not to disregard this artefactual effect in the final model, even if the period effect is significant. However, as we can rarely be sure that a period effect is totally absent, we would recommend retaining the full APC model if the period effect is significant, and quantifying the consequence of this effect on the other variable estimates. Should this effect change these estimates significantly, one would have to question the existence of a real, not expected, period effect.

References

1. Oppenheim Mason, K., et al., Some methodological issues in cohort analysis of archival data. *Am Sociological Rev*, 1973. 38: p. 242-258.
2. Rodgers, W.L., Estimable functions of age, period, and cohort effects. *Am Sociological Rev*, 1982. 47: p. 774-787.
3. Holford, T.R., The Estimation of Age, Period and Cohort Effects for Vital Rates. *Biometrics*, 1983. 39(2): p. 311-324.
4. Kupper, L.L., et al., Statistical Age-Period-Cohort Analysis: A Review and Critique. *J Chronic Dis*, 1985. 38(10): p. 811-830.
5. Holford, T.R., Analysing the temporal effects of age, period and cohort. *Statistical Methods in Medical Research*, 1992. 1(3): p. 317-337.
6. Yang, Y., Age-Period-Cohort Distinctions, in *Encyclopedia of Health and Aging*, K.S. Markides, Editor. 2007, Sage Publication. p. 20-22.
7. Rewers, M., et al., Poisson regression modeling of temporal variation in incidence of childhood insulin-dependent diabetes mellitus in Allegheny County, Pennsylvania, and Wielkopolska, Poland, 1970-1985. *Am J Epidemiol*, 1989. 129(3): p. 569-581.
8. Holford, T.R., Z. Zhang, and L.A. McKai, Estimating Age, Period and Cohort Effects Using the Multistage Model for Cancer. *Stat Med*, 1994. 13: p. 23-41.
9. Holford, T.R., et al., Changing Patterns in Breast Cancer Incidence Trends. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 2006(36): p. 19-25.
10. Remontet, L., et al., An overall strategy based on regression models to estimate relative survival and model the effects of prognostic factors in cancer survival studies. *Stat Med*, 2007. 26(10): p. 2214-28.
11. Sala, C., E. Morignat, and D. Calavas, Contribution du modèle Age-Période-Cohorte à l'étude de l'Encéphalopathie spongiforme bovine en France: évolution de la prévalence au cours de la période 2001-2007. *Epidemiol Sante Anim*, 2008. 53: p. 85-95.
12. Sala, C., et al., Modelling the trend of bovine spongiform encephalopathy prevalence in France: Use of restricted cubic spline regression in age-period-cohort models to estimate the efficiency of control measures. *Preventive Veterinary Medicine*, 2009. 90(1-2): p. 90-101.
13. La Bonnardière, C., et al., Estimating the trend of the French BSE epidemic over six birth cohorts through the analysis of the abattoir screening in 2001 and 2002. *Vet Res*, 2004. 35: p. 299-308.

14. Morignat, E., et al., Prevalence of BSE in cattle found dead euthanased or emergency slaughtered on farms in western France in 2000 - 2001 and 2002. *Vet Rec*, 2004. 155: p. 481-486.
15. Supervie, V. and D. Costagliola, Estimating incidence of the French BSE infection using a joint analysis of both asymptomatic and clinical BSE surveillance data. *Math Biosci*, 2007. 209(1): p. 90-107.
16. Wells, G.A.H., et al., A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, 1987. 121: p. 419-420.
17. Will, R.G., et al., A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet*, 1996. 347(9006): p. 921-925.
18. Anderson, R.M., et al., Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*, 1996. 382(6594): p. 779-88.
19. Arnold, M.E. and J.W. Wilesmith, Estimation of the age-dependent risk of infection to BSE of dairy cattle in Great Britain. *Prev Vet Med*, 2004. 66(1-4): p. 35-47.
20. Ferguson, N.M., et al., The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. II. Model construction and analysis of transmission dynamics. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological sciences*, 1997. 352: p. 803-838.
21. Supervie, V. and D. Costagliola, The unrecognised French BSE epidemic. *Vet Res*, 2004. 35(3): p. 349-62.
22. Wilesmith, J.W., et al., Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec*, 1988. 123: p. 638-644.
23. Hoinville, L.J., J.W. Wilesmith, and M.S. Richards, An investigation of risk factors for cases of bovine spongiform encephalopathy born after the introduction of the feed ban. *Vet Rec*, 1995. 136: p. 312-318.
24. Wilesmith, J.W., J.B.M. Ryan, and M.J. Atkinson, Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec*, 1991. 128: p. 199-203.
25. Wilesmith, J.W., J.B.M. Ryan, and W.D. Hueston, Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates. *Research in Veterinary Science*, 1992. 52: p. 325-331.
26. Wilesmith, J.W., et al., A cohort study to examine maternally-associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec*, 1997. 141(10): p. 239-243.
27. Jarrige, N., et al., Case-control study on feed risk factors for BSE cases born after the feed ban in France. *Veterinary Research*, 2007. 38(3): p. 505-16.
28. Grassi, J., et al., Progress and limits of TSE diagnostic tools. *Vet Res*, 2008. 39(4): p. 33.

-
29. R Development Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found Stat Comput, 2008.
 30. Clayton, D. and E. Schifflers, Models for temporal variation in cancer rates. II: Age-period-cohort models. *Stat Med*, 1987. 6(4): p. 469-81.
 31. Venables, W.N. and B.D. Ripley, *Modern Applied Statistics with S*. 4 ed. Statistics and computing, 2002: Springer. 495.
 32. Barrett, J.C., The redundant factor method and bladder cancer mortality. *J Epidemiol Community Health*, 1978. 32(4): p. 314-6.
 33. Burnham, K.P. and D.R. Anderson, *Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach*. 2 ed. 1998, U.S.A.: Springer. 488.
 34. Burton, A., et al., The design of simulation studies in medical statistics. *Statistics in Medicine*, 2006. 25(24): p. 4279-92.
 35. Collins, L.M., J.L. Schafer, and C.M. Kam, A comparison of inclusive and restrictive strategies in modern missing data procedures. *Psychological Methods*, 2001. 6(4): p. 330-351.
 36. Clayton, D. and E. Schifflers, Models for temporal variation in cancer rates. I: Age-period and age-cohort models. *Stat Med*, 1987. 6(4): p. 449-67.
 37. Bouchardy, C., et al., Changing pattern of age-specific breast cancer incidence in the Swiss canton of Geneva. *Breast Cancer Res Treat*, 2009.
 38. Ravdin, P.M., et al., The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med*, 2007. 356(16): p. 1670-4.

4.2. Evaluation du modèle APC en situation épidémique

Figure 4.36 - Number of infected animals for each infection profile a) per year of infection, b) per birth cohort (mean for 100 simulations) at the end of the 16-year infection period.

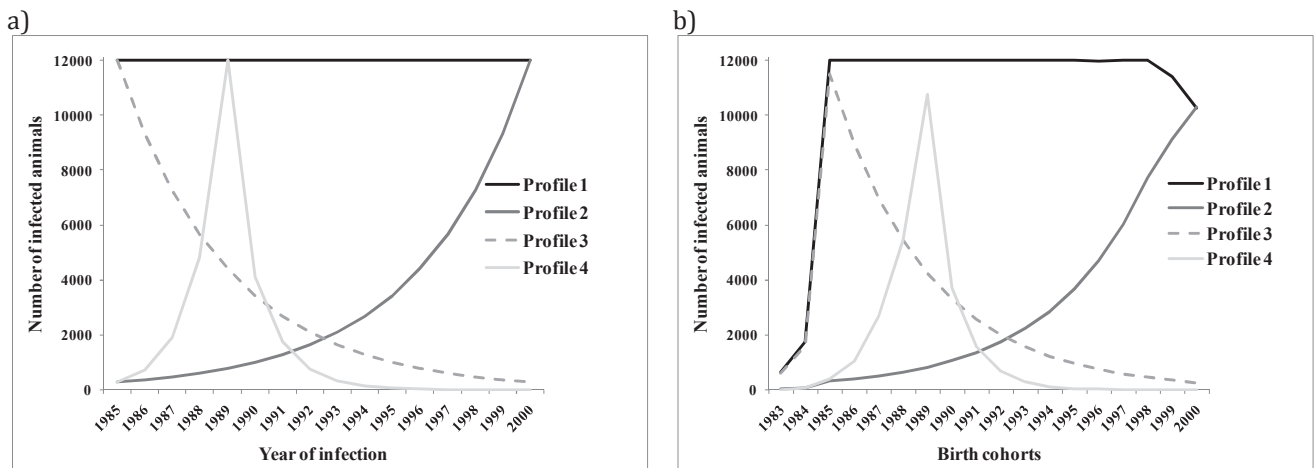


Figure 4.37 - Percentage (mean for 100 iterations) of infected animals detected for each infection profile and surveillance period; a) left-reduction of the 1985-2014 surveillance period, b) right-extension of the 1985-1991 surveillance period.

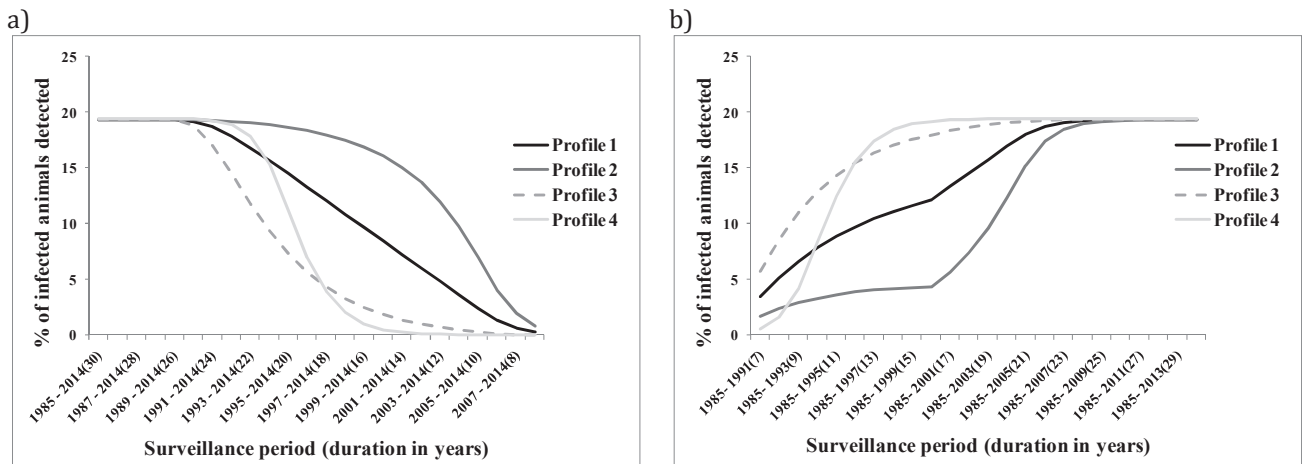


Figure 4.38 - Prevalence in 6-year old animals per infection profile and year of surveillance.

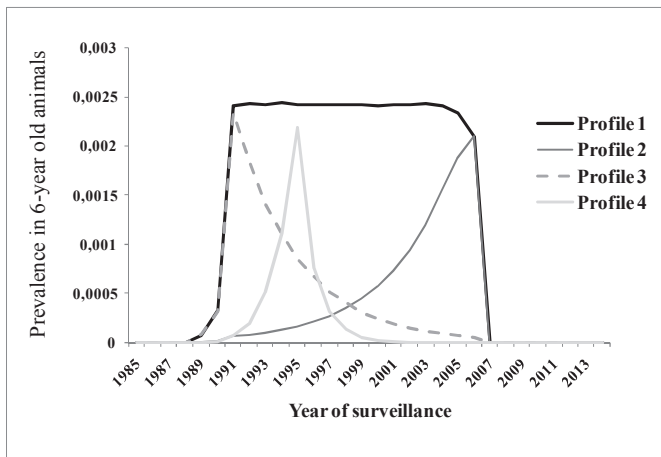
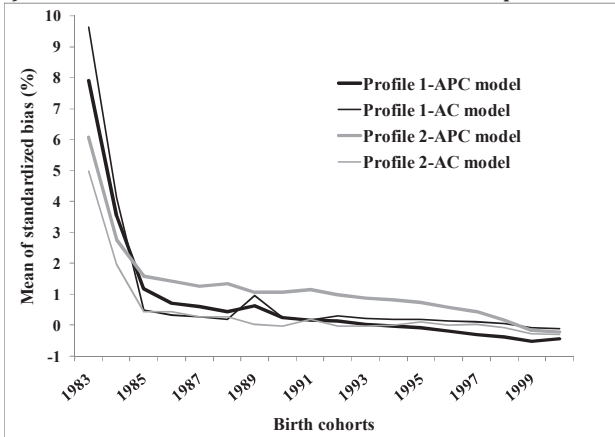
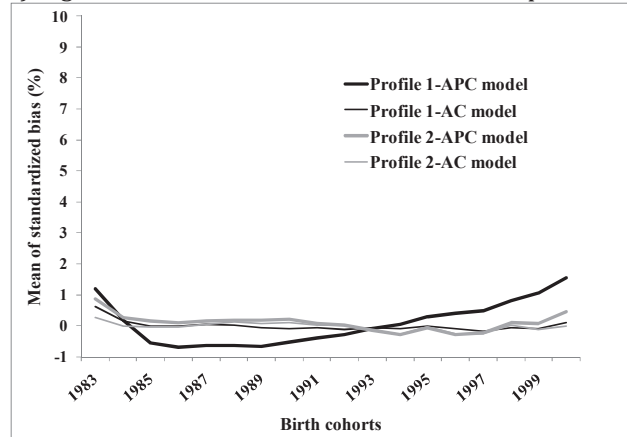


Figure 4.39 - Mean of standardised bias by birth cohort (a and b) and surveillance period (c and d).

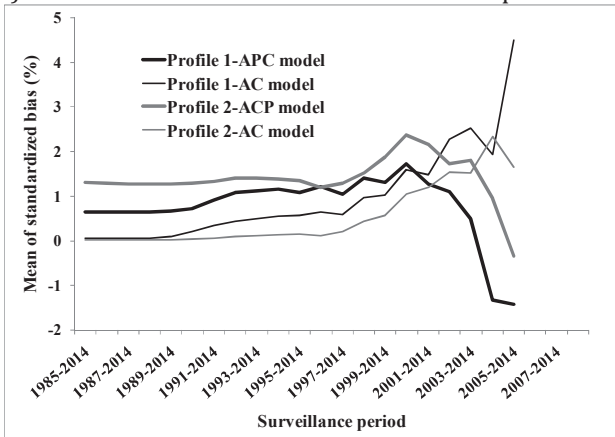
a) Left-reduction of 1985-2014 surveillance period



b) Right-extension of 1985-1991 surveillance period



c) Left-reduction of 1985-2014 surveillance period



d) Right-extension of 1985-1991 surveillance period

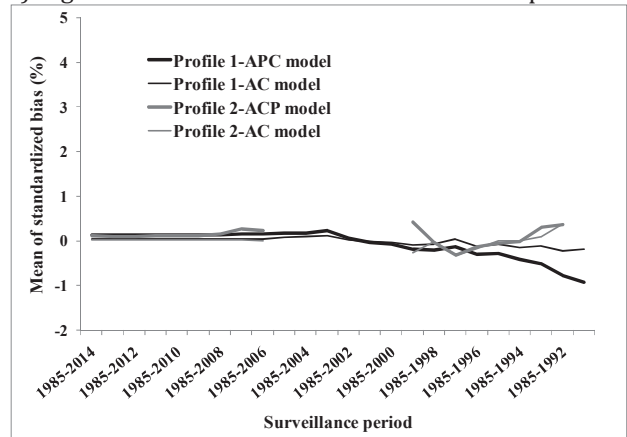


Tableau 4.14 - Number of age, age-drift, age-cohort, age-period and age-period-cohort models selected from the 100 datasets analysed for each observation period and infection profile;

a) Left-reduction of the 1985-2014 observation period

Surveillance period	Boundaries	Duration (years)	Profile 1					Profile 2					Profile 3					Profile 4				
			A	AD	AC	AP	APC	A	AD	AC	AP	APC	A	AD	AC	AP	APC	A	AD	AC	AP	APC
1985-2014	30	0	0	0	0	100	0	0	28	0	72	0	0	0	0	100	0	0	2	0	98	
1986-2014	29	0	0	0	0	100	0	0	21	0	79	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99	
1987-2014	28	0	0	0	0	100	0	0	18	0	82	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99	
1988-2014	27	0	0	0	0	100	0	0	17	0	83	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99	
1989-2014	26	0	0	0	0	100	0	0	18	0	82	0	0	16	0	84	0	0	1	0	99	
1990-2014	25	0	0	24	0	76	0	0	18	0	82	0	0	97	0	3	0	0	1	0	99	
1991-2014	24	0	0	45	0	55	0	0	17	0	83	0	0	100	0	0	0	0	1	0	99	
1992-2014	23	0	0	51	0	49	0	0	15	0	85	0	0	100	0	0	0	0	12	0	88	
1993-2014	22	0	0	49	0	51	0	0	14	0	86	0	0	100	0	0	0	0	87	0	13	
1994-2014	21	0	0	52	0	48	0	0	10	0	90	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	
1995-2014	20	0	0	49	0	51	0	0	10	0	90	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	
1996-2014	19	0	0	45	0	55	0	0	7	0	93	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	
1997-2014	18	0	0	46	0	54	0	0	7	0	93	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	
1998-2014	17	0	0	44	0	56	0	0	6	0	94	0	0	100	0	0	0	4	96	0	0	
1999-2014	16	0	0	41	0	59	0	0	7	0	93	0	0	100	0	0	0	94	6	0	0	
2000-2014	15	0	0	40	0	60	0	0	6	0	94	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	
2001-2014	14	0	0	42	0	58	0	0	6	0	94	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	
2002-2014	13	0	0	48	0	52	0	0	9	0	91	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	
2003-2014	12	0	0	57	0	43	0	0	21	0	79	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	
2004-2014	11	0	0	74	0	26	0	0	55	0	45	0	1	99	0	0	12	88	0	0	0	
2005-2014	10	0	0	91	0	9	0	0	92	0	8	0	33	66	0	1	60	40	0	0	0	
2006-2014	9	0	0	99	0	1	0	0	99	0	1	0	98	2	0	0	91	9	0	0	0	
2007-2014	8	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1	0	99	0	1	0	99	1	0	0	0	
2008-2014	7	0	0	99	0	1	0	0	98	0	2	0	99	0	1	0	100	0	0	0	0	
Percentage per profile*			0	0	45.7	0	54.3	0	0	29.1	0	70.9	0	13.8	65.8	0.1	20.3	15.1	26.5	25.4	0	33.0

A, age model; AD, age-(cohort)drift model, drift corresponding to the linear trend that cannot be attributed separately to cohort or period effect; AP, age-period model; APC, age-period-cohort model

*percentage of each model type selected over the 2400 analyses performed for each infection profile.

b) Right-extension of the 1985-1991 observation period

Surveillance period		Profile 1					Profile 2					Profile 3					Profile 4				
Boundaries	Duration (years)	A	AD	AC	AP	APC	A	AD	AC	AP	APC	A	AD	AC	AP	APC	A	AD	AC	AP	APC
1985- 1991	7	0	0	0	0	100	0	88	0	12	0	0	0	0	0	100	0	96	0	4	0
1985- 1992	8	0	0	0	0	100	0	28	3	67	2	0	0	0	0	100	0	79	0	20	1
1985- 1993	9	0	0	0	0	100	0	4	30	62	4	0	0	0	0	100	0	27	12	60	1
1985- 1994	10	0	0	0	0	100	0	0	72	24	4	0	0	0	0	100	0	0	98	0	2
1985- 1995	11	0	0	0	0	100	0	0	96	1	3	0	0	0	0	100	0	0	57	0	43
1985- 1996	12	0	0	0	0	100	0	0	97	0	3	0	0	0	0	100	0	0	4	0	96
1985- 1997	13	0	0	0	0	100	0	0	98	0	2	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99
1985- 1998	14	0	0	0	0	100	0	0	98	0	2	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99
1985- 1999	15	0	0	0	0	100	0	0	98	0	2	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2000	16	0	0	0	0	100	0	0	99	0	1	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2001	17	0	0	0	0	100	0	0	99	0	1	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2002	18	0	0	0	0	100	0	0	99	0	1	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2003	19	0	0	0	0	100	0	0	99	0	1	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2004	20	0	0	0	0	100	0	0	99	0	1	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99
1985- 2005	21	0	0	0	0	100	0	0	99	0	1	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99
1985- 2006	22	0	0	0	0	100	0	0	96	0	4	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99
1985- 2007	23	0	0	0	0	100	0	0	76	0	24	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99
1985- 2008	24	0	0	0	0	100	0	0	43	0	57	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99
1985- 2009	25	0	0	0	0	100	0	0	30	0	70	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99
1985- 2010	26	0	0	0	0	100	0	0	26	0	74	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99
1985- 2011	27	0	0	0	0	100	0	0	26	0	74	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99
1985- 2012	28	0	0	0	0	100	0	0	22	0	78	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99
1985- 2013	29	0	0	0	0	100	0	0	27	0	73	0	0	0	0	100	0	0	1	0	99
1985- 2014	30	0	0	0	0	100	0	0	28	0	72	0	0	0	0	100	0	0	2	0	98
Percentage per profile*		0	0	0	0	100	0	5.0	65.0	6.9	23.1	0	0	0	0	100	0	8.4	7.7	3.5	80.4

A, age model; AD, age-(cohort)drift model, drift corresponding to the linear trend that cannot be attributed separately to cohort or period effect; AP, age-period model; APC, age-period-cohort model.

*percentage of each model type selected over the 2400 analyses performed for each infection profile.

c) Left-reduction of the 1985-2044 surveillance period

Surveillance period		Profile 1					Profile 2					Profile 3					Profile 4				
Boundaries	Duration (years)	A	AD	AC	AP	APC	A	AD	AC	AP	APC	A	AD	AC	AP	APC	A	AD	AC	AP	APC
1985-2044	60	0	0	3	0	97	0	0	100	0	0	0	0	1	0	99	0	0	85	0	15
1986-2044	59	0	0	3	0	97	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	85	0	15
1987-2044	58	0	0	3	0	97	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	83	0	17
1988-2044	57	0	0	4	0	96	0	0	100	0	0	0	0	6	0	94	0	0	80	0	20
1989-2044	56	0	0	67	0	33	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1	0	0	81	0	19
1990-2044	55	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	85	0	15
1991-2044	54	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	92	0	8
1992-2044	53	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1
1993-2044	52	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0
1994-2044	51	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0
1995-2044	50	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0
1996-2044	49	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0
1997-2044	48	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0
1998-2044	47	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1	0	0	100	0	0	0	85	15	0	0
1999-2044	46	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
2000-2044	45	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
2001-2044	44	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1	0	1	99	0	0	0	100	0	0	0
2002-2044	43	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	17	83	0	0	0	100	0	0	0
2003-2044	42	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	74	26	0	0	0	100	0	0	0
2004-2044	41	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	96	4	0	0	0	100	0	0	0
2005-2044	40	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	19	81	0	0	0
2006-2044	39	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	58	42	0	0	0
2007-2044	38	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	79	21	0	0	0
2008-2044	37	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	89	11	0	0	0
Percentage per profile*		0	0	82.5	0	17.5	0	0	99.7	0	0.3	0	24.5	59.1	0	16.4	10.2	35.0	50.2	0	4.6

A, age model; AD, age-(cohort)drift model, drift corresponding to the linear trend that cannot be attributed separately to cohort or period effect; AP, age-period model; APC, age-period-cohort model.

*percentage of each model type selected over the 2400 analyses performed for each infection profile.

d) Right-extension of the 1970-1991 surveillance period

Surveillance period		Profile 1					Profile 2					Profile 3					Profile 4				
Boundaries	Duration (years)	A	AD	AC	AP	APC	A	AD	AC	AP	APC	A	AD	AC	AP	APC	A	AD	AC	AP	APC
1970-1991	22	0	0	71	0	29	0	0	91	0	9	0	0	0	0	100	0	0	37	0	63
1970-1992	23	0	0	0	0	100	0	0	90	0	10	0	0	0	0	100	0	0	35	0	65
1970-1993	24	0	0	0	0	100	0	0	90	0	10	0	0	0	0	100	0	0	32	0	68
1970-1994	25	0	0	0	0	100	0	0	90	0	10	0	0	0	0	100	0	0	25	0	75
1970-1995	26	0	0	0	0	100	0	0	91	0	9	0	0	0	0	100	0	0	20	0	80
1970-1996	27	0	0	0	0	100	0	0	93	0	7	0	0	0	0	100	0	0	17	0	83
1970-1997	28	0	0	0	0	100	0	0	96	0	4	0	0	0	0	100	0	0	16	0	84
1970-1998	29	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	12	0	88
1970-1999	30	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	10	0	90
1970-2000	31	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	9	0	91
1970-2001	32	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	7	0	93
1970-2002	33	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	7	0	93
1970-2003	34	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	6	0	94
1970-2004	35	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	5	0	95
1970-2005	36	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	6	0	94
1970-2006	37	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	8	0	92
1970-2007	38	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	16	0	84
1970-2008	39	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	34	0	66
1970-2009	40	0	0	0	0	100	0	0	95	5	0	0	0	0	0	100	0	0	85	0	15
1970-2010	41	0	0	0	0	100	0	0	62	38	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0
1970-2011	42	0	0	0	0	100	0	36	22	42	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0
1970-2012	43	0	0	0	0	100	0	90	1	9	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0
1970-2013	44	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	1	0	99	0	100	0	0	0
1970-2014	45	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	64	0	36	0	100	0	0	0
Percentage per profile*		0	0	3.0	0	97	0	13.6	80.0	3.9	2.5	0	0	2,7	0	97.3	0	12.5	24.5	0	63.0

A, age model; AD, age-(cohort)drift model, drift corresponding to the linear trend that cannot be attributed separately to cohort or period effect; AP, age-period model; APC, age-period-cohort model.

*percentage of each model type selected over the 2400 analyses performed for each infection profile.

4.2. Evaluation du modèle APC en situation épidémique

Table 4.15 - Distribution of the standardised bias calculated between the cohort prevalence estimated by the APC or AC models and the simulated prevalence for 6-year old animals and in infected birth cohorts.

Absolute values under 40% are not significant.

a) Left-reduction of the 1985-2014 surveillance period

Profile	Surveillance periods*	Model	Standardised bias (%)				
			Minimum	1st Quartile	Median	3th Quartile	Maximum
1	1985-2014 to 2005-2014	APC	-4.05	-0.30	0.26	1.08	18.22
		AC	-2.12	0.01	0.04	0.29	30.94
2	1985-2014 to 2005-2014 and 2008-2014	APC	-4.30	0.40	1.14	1.66	18.43
		AC	-4.13	0.02	0.05	0.21	19.18
3	1985-2014 to 1990-2014	APC	-0.17	-0.12	-0.06	0.12	3.68
		AC	-0.19	-0.03	-0.02	0.00	2.79
4	1985-2014 to 1993-2014	APC	-0.10	0.01	0.02	0.96	1.88
		AC	-0.25	-0.03	-0.01	0.10	1.11

b) Right-extension of the 1985-1991 surveillance period

Profile	Surveillance periods*	Model	Standardised bias (%)				
			Minimum	1st Quartile	Median	3th Quartile	Maximum
1	1985-1991 to 1985-2014	APC	-4.52	-0.50	0.00	0.60	2.04
		AC	-2.85	-0.02	0.01	0.06	0.98
2	1985-1992 to 1985-1999 and 1985-2006 to 1985-2014	APC	-3.43	0.04	0.09	0.20	3.92
		AC	-3.09	-0.04	0.02	0.05	1.94
3	1985-2014 to 1985-2014	APC	-2.63	0.15	0.45	0.64	3.12
		AC	-0.64	-0.03	-0.01	0.05	3.73
4	1985-1994 to 1985-2014	APC	-0.46	0.36	0.42	0.72	48.46
		AC	-0.27	-0.03	0.01	0.10	19.26

* Surveillance periods for which calculations of standardised bias were possible, i.e., for which at least two APC or AC models were selected.

Appendix

We simulated infected animals and populations testing negative using a function of the infection profile $P_{N,t_{inf}}$ and seed. The seed was thus updated for each iteration and infection profile. We simulated the characteristics of infected animals (age at infection, incubation period and age at death) and animals testing negative (age at death) using the distributions presented in Figures 4.40 and 4.41.

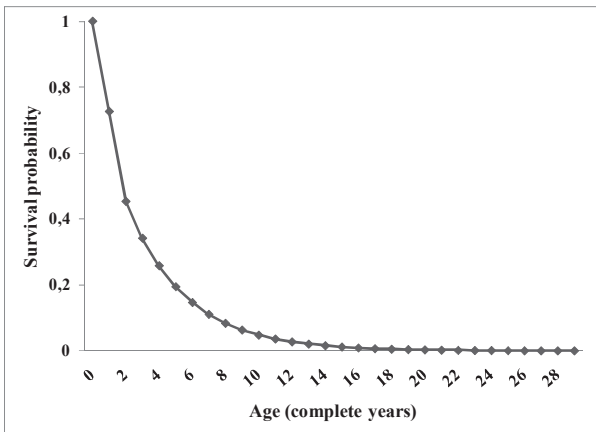
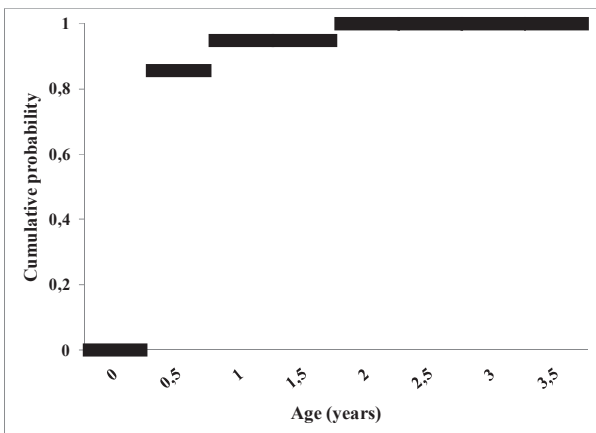


Figure 4.40 - French cattle survival distribution.

a) Cumulative probability of the age at BSE infection



b) Probability density of BSE incubation period

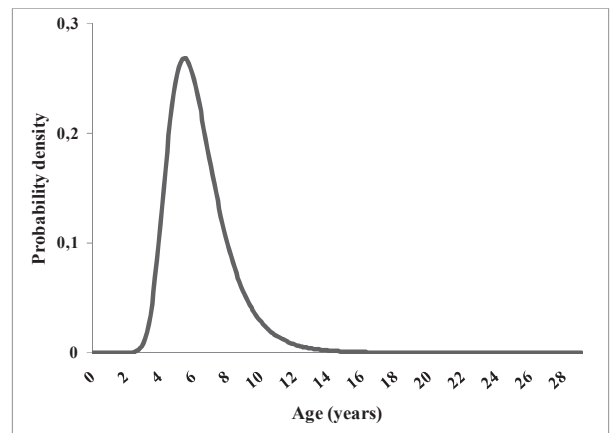


Figure 4.41 - BSE parameters (estimated from Supervie *et al*).

For each of the n infected animals each year y_{inf} , of the infection period t_{inf} , we randomly attributed:

- an age at infection $a_{inf} = 0$ for $[0.5-1[$, 1 for $[1-2[$ and 2 for $[2-3[$ with the following probabilities

$$p(0) = 0.863, p(1) = 0.093 \text{ and } p(2) = 0.051$$

- a duration of incubation period (p_{inc}) using the following distribution:

$$f(p_{inc}) = \frac{\gamma_1}{\Gamma(\gamma_3)} [\gamma_2 \exp(-\gamma_1 p_{inc})]^{\gamma_3} \exp[-\gamma_2 \exp(-\gamma_1 p_{inc})] \quad (1)$$

with $\gamma_1 = 0.8$, $\gamma_2 = 65$ and $\gamma_3 = 0.845$.

We also assumed that age at infection and incubation period were independent.

- a survival duration (s_c) conditionally to be alive at the age at infection

For each infected animal, we also calculated:

- the age at clinical onset a_{cli} which corresponds to the end of the incubation period

$$a_{cli} = p_{inc} + a_{inf}$$

- the birth cohort C

$$C = y_{inf} - a_{inf}$$

- the age at diagnosis A which depended on both the survival duration and age at clinical onset considering that:

- o animal would be tested and detected if

$$s_c > a_{cli}, \text{ and } A = a_{cli}$$

$$\text{or } a_{cli} \geq s_c > a_{cli} - 0.5, \text{ and } A = s_c$$

- o animal would not be tested (so not detected) if

$$s_c < 2, \text{ and we fixed arbitrarily } A = -1$$

- o animal would not be detected if

$$a_{cli} < s_c, \text{ and we fixed arbitrarily } A = 0.$$

- the year of detection P for detected animals using the linear relation

$$P = A + C \quad (2)$$

For the population testing negative, for each birth cohort C from 1941 to 2042, we randomly sampled the number of animals in each age group using the survival distribution defined above. As animals were tested for BSE at death, the age at death was used for the age at testing (A). The year of testing was defined using the relation (2).

At the end of the simulation process, infected-detected and negative animals were grouped by age at diagnosis (age at testing for negative animals) in complete years, birth cohort and year of diagnosis (year of testing for negative animals). We used 1-year intervals for grouping data. Only animals that were over 2 years old at death and whose death had occurred during surveillance periods of interest were maintained in datasets for APC analysis.

4.3. Impact d'une augmentation de la durée moyenne d'incubation de l'ESB sur les résultats du modèle APC

Afin d'étudier l'impact d'un allongement progressif de la durée d'incubation de l'ESB au cours du temps sur les résultats du modèle, nous avons fait varier la durée moyenne d'incubation de 5 à 6,5 ans entre 1985 et 2000. Nous présentons dans cette partie, les premiers résultats obtenus et les comparons à ceux issus de la simulation précédente, dans laquelle nous avons utilisé une durée moyenne d'incubation stable de 6,3 ans.

4.3.1. Proportion d'animaux infectés détectés

La durée moyenne d'incubation de la maladie a été progressivement augmentée de 0,1 +/- 0,02 an entre deux années d'infection successives (tableau 4.13 page 177). Cependant, du fait de la distribution de l'âge à l'infection (infection répartie sur les trois premières années de vie des animaux), l'infection de chacune des cohortes de 1985 à 1997 a été réalisée à partir de trois durées d'incubation différentes (tableau 4.16), ce qui a lissé un peu l'augmentation de la durée d'incubation entre les cohortes.

Pour les cohortes de naissance 1985 à 1997, on a attribué aux animaux infectés une durée moyenne d'incubation inférieure à celle utilisée dans la simulation avec durée d'incubation stable (6,3 ans). Pour ces cohortes, la proportion d'animaux infectés détectés au cours de la période d'observation 1985-2014 a donc été supérieure à celle obtenue lorsque les données étaient simulées à partir d'une durée d'incubation stable et plus longue en moyenne (tableau 4.16 et figure 4.42) et ce, quel que soit le profil d'infection (figure 4.42). Ainsi pour la cohorte 1983 ayant la durée d'incubation moyenne la plus courte (5 ans), en moyenne, 32,5% des animaux infectés ont été détectés contre 22,3% lorsque les données étaient simulées avec une moyenne d'incubation de 6,3 ans (tableau 4.16a). Ceci est dû au fait que les animaux de ces cohortes atteignent plus rapidement, en moyenne, la période de détectabilité de la maladie (dans les 6 mois avant l'apparition des signes cliniques). Or, vu la distribution de survie des bovins, plus l'animal a une période d'incubation courte plus sa probabilité d'être détecté est importante. Ainsi la proportion d'animaux infectés détectés dans chaque cohorte a diminué avec l'augmentation de la durée moyenne d'incubation. Pour les cohortes 1999 et 2000, cette proportion était ainsi inférieure à celle obtenue avec des données simulées à partir d'une durée d'incubation stable (18,5 et 17% versus 19,1 et 18%), ces cohortes ayant une durée moyenne d'incubation supérieure à 6,3 ans.

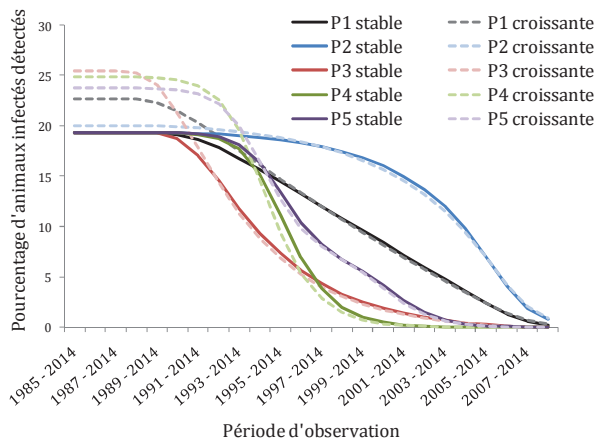
4.3. Impact de l'augmentation de la durée moyenne d'incubation

Tableau 4.16 - Pourcentage moyen (sur 100 itérations) d'animaux infectés détectés au cours de la période d'observation 1985-2014, par cohorte de naissance, tous profils d'infection confondus.

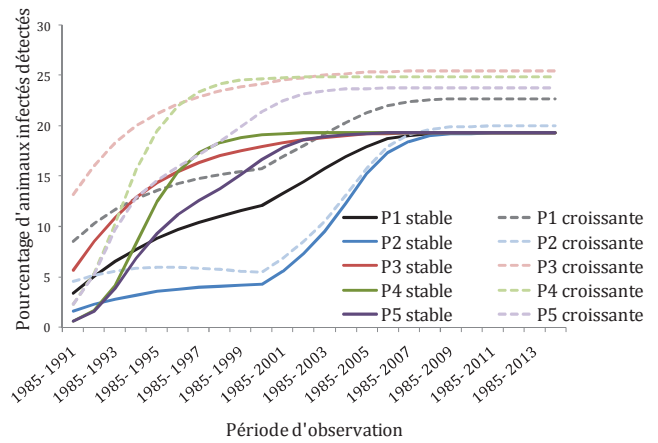
Cohorte	Année(s) d'infection*	Période d'incubation		Cohorte	Année(s) d'infection*	Période d'incubation	
		stable	croissante			stable	croissante
1983	1985	22,3	32,5	1993	1993-94-95	19,3	22,0
1984	1985-86	21,0	29,8	1994	1994-95-96	19,3	21,5
1985	1985-86-87	19,4	27,9	1995	1995-96-97	19,2	20,9
1986	1986-87-88	19,6	27,1	1996	1996-97-98	19,5	20,4
1987	1987-88-89	19,6	26,4	1997	1997-98-99	19,6	19,7
1988	1988-89-90	19,4	25,4	1998	1998-99-00	19,3	19,1
1989	1989-90-91	19,3	24,6	1999	1999-2000	19,1	18,5
1990	1990-91-92	19,3	24,0	2000	2000	18,0	17,0
1991	1991-92-93	19,2	23,2	Pourcentage moyen		19,5	23,5
1992	1992-93-94	19,3	22,7				

* en gras, année d'infection de la majorité des animaux infectés dans chaque cohorte

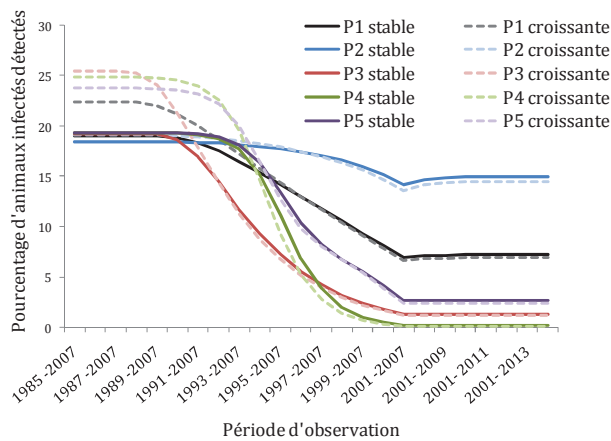
La proportion d'animaux infectés détectés a globalement peu varié avec le profil d'infection pour la période d'observation 1985-2014 (autour de 20%), mais a présenté une variabilité plus importante lorsque les données étaient simulées avec une durée moyenne d'incubation variable (entre 20 et 25%). Ceci est dû au fait que, à la fin de cette période d'observation de 30 ans, la quasi totalité des animaux de plus de 2 ans, issus des cohortes infectées, est testée. Cependant la proportion d'animaux infectés détectés était fonction de la longueur et de la localisation dans le temps de la période d'observation (figure 4.42). Cette proportion a peu varié tant que la période d'observation était supérieure à 24 ans, lorsque la période 1985-2014 était réduite à gauche (figure 4.42a) ou la période 1985-1991 étendue à droite (figure 4.42b). De même, avec l'extension à gauche de la période 2001-2007, pour une durée d'observation comprise 19 et 23 ans, la proportion de détection des animaux infectés était de l'ordre de 20% (durée d'incubation stable) ou comprise entre 20 et 25 % (allongement de la durée d'incubation). La proportion d'animaux infectés détectés a diminué avec le raccourcissement de la période d'observation 1985-2014 ; cette diminution était plus ou moins rapide selon le profil d'infection, le profil 2 présentant la décroissance la plus tardive (figure 4.42a). Au final, quel que soit le profil d'infection, la proportion d'animaux infectés détectés était proche de 0 pour la période d'observation 2008-2014.



a) Réduction à gauche de la période d'observation 1985-2014



b) Extension à droite de la période d'observation 1985-1991



c) Extension à gauche puis à droite de la période d'observation 2001-2007

Figure 4.42 - Pourcentage d'animaux infectés détectés en fonction du profil d'infection, de la période d'observation et la durée d'incubation (stable ou croissante).

P1, profil 1 constant ; P2, profil 2 exponentiel décroissant ; P3, profil 3 exponentiel croissant ; P4, profil 4 exponentiel croissant, pic d'infection puis décroissant ; P5, profil 5 exponentiel croissant, pic d'infection puis décroissance avec second pic d'infection.

La proportion d'animaux infectés détectés au cours la période 1985-1991 était nettement plus importante pour les données simulées avec un allongement de la durée d'incubation et cette différence s'est maintenue au cours de l'extension de la période d'observation, et ce, dans tous les profils d'infection (figure 4.42b). La proportion d'animaux infectés détectés a augmenté régulièrement avec l'extension de la période 1985-1991, jusqu'à atteindre, plus ou moins rapidement selon les profils, un maximum proche de 20% avec les données simulées à partir d'une durée d'incubation stable, et entre 20 et 25% avec des données simulées avec un allongement de la durée d'incubation. Lors de l'extension à gauche de la période 2001-2007 à 1985-2007, on a observé le même schéma que celui obtenu lors de la réduction de la période d'observation 1985-2014 à 2001-2014 (figure 4.42a et c). Le schéma changeait à partir de la période 2001-2007 lors de l'extension de cette période à la période 2001-2014 ; on a alors observé une stagnation de la proportion d'animaux infectés détectés autour de la valeur

4.3. Impact de l'augmentation de la durée moyenne d'incubation

observée pour la période 2001-2007. Que les données aient été simulées avec une durée d'incubation stable ou croissante, cette valeur était la même pour un profil donné, mais variait selon le profil d'infection : autour de 14% pour le profil 2, 7% pour le profil 1, moins de 3% et 2% respectivement pour les profil 5 et 3 et pratiquement 0 pour le profil 4.

Du fait de la particularité de la distribution de survie des bovins et du diagnostic post-mortem possible, au mieux, dans les 6 mois précédant l'apparition des symptômes, on s'attendait à ce que la proportion d'animaux infectés détectés soit plus importante dans les données simulées à partir d'une durée d'incubation augmentée de 5 à 6,5 ans que celle observée lorsque les données étaient simulées une durée d'incubation stable, mais plus longue en moyenne (6,3 ans). En effet, plus la période d'incubation de la maladie est courte, plus la probabilité pour un animal infecté d'atteindre la période de détectabilité de la maladie avant de mourir d'une cause compétitive est importante. Cependant, ainsi que nous l'avons vu, la proportion d'animaux infectés détectés est modulée conjointement par le profil d'infection et la période d'observation, un certain nombre d'animaux infectés, atteignant la fin de leur période d'incubation avant le début ou après la fin de la surveillance, n'étant pas détectés.

4.3.2. Détection de l'effet période

Un effet période a été détecté pour la plupart des périodes d'observation et avec les différents profils d'infection et ce, que la durée d'incubation ait varié ou non au cours du temps (tableau 4.17). Cependant, la proportion de modèles dans lesquels un effet période a été mis en évidence était très variable selon le profil d'infection et la période d'observation. Les résultats détaillés par profil d'infection et période d'observation sont disponibles en Annexe II.

Pour la réduction par la gauche de la période d'observation 1985-2014, lorsque les données étaient simulées avec une durée d'incubation croissante, l'effet période a été plus fréquemment détecté pour les profils 1 (71,7% vs 54,3%), 2 (51% vs 20,4%) et 5 (44,2% vs 34,8%). Pour le profil 4, on a observé l'effet inverse avec un effet période pratiquement plus détecté (0,6% vs 33%), tandis que pour le profil 2 peu de variations ont été notées (70,3% vs 70,9%) (tableau 4.17).

Lors de l'extension à droite de la période 1985-1991, avec allongement de la moyenne d'incubation, pour les profils 1 et 3, l'effet période était toujours détecté dans 100% des modèles ajustés pour toutes les périodes d'observation. Pour le profil 2, l'effet période a été deux fois plus souvent détecté (77,5% vs 30%), tandis que pour les profils 4 et 5, on a observé

une diminution, très importante pour le profil 4, du nombre de modèles dans lesquels un effet période était détecté, respectivement, 17,2% vs 83,9% et 75,7% vs 84,3% (tableau 4.17).

Tableau 4.17 - Proportion (%) de modèles AP et APC sélectionnés, avec et sans variation de la durée moyenne d'incubation.

Proportion établie par profil d'infection et modalité de variation de la période d'observation sur 2400 analyses effectuées pour chaque modalité de variation de la période d'observation.

Modalités de variation de la période d'observation	Profil 1		Profil 2		Profil 3		Profil 4		Profil 5	
	Durée d'incubation		Durée d'incubation		Durée d'incubation		Durée d'incubation		Durée d'incubation	
	stable	croissante	stable	croissante	stable	croissante	stable	croissante	stable	croissante
Réduction par la gauche de la période 1985-2014	54,3	71,7	70,9	70,3	20,4	51,0	33,0	0,9	34,8	44,2
Allongement par la droite de la période 1985-1991	100,0	100,0	30,0	77,5	100,0	100,0	83,9	17,2	84,3	75,7
Variations autour de la période 2001-2007*			Non testés**				36,0	6,5	39,6	45,7

Profil 1, stable ; profil 2, exponentiel décroissant ; profil 3, exponentiel croissant ; profil 4, exponentiel croissant, pic d'infection puis décroissant ; profil 5, exponentiel croissant, pic d'infection puis décroissance avec second pic d'infection.

* extension de la période 2001-2007 à gauche jusqu'à 1985-2007 et à droite jusqu'à 2001-2014.

** seuls les profils 4 et 5, les plus réalistes pour l'épizootie d'ESB ont été évalués sur la période 2001-2007 correspondant à celle dont nous disposons pour les analyses des données ESB réelles

Concernant les variations autour de la période d'observation 2001-2007, les différences dans la fréquence de détection de l'effet période, entre moyenne d'incubation stable ou croissante, ont été essentiellement observées pour l'extension à gauche (tableau 4.18). L'allongement de la moyenne d'incubation a entraîné une détection plus fréquente de l'effet période avec le profil 5 mais l'effet inverse a été observé avec le profil 4, pour lequel peu de modèles APC ont été sélectionnés, même pour les durées d'observation les plus longues. Pratiquement aucune différence n'a été notée lors de l'extension à droite de la période 2001-2007, variation au cours de laquelle l'effet période a été exceptionnellement détecté, que les données aient été simulées à partir d'une durée d'incubation variable ou non (13 modèles APC sélectionnés sur 2800 modèles ajustés).

Globalement, la sélection plus fréquente des modèles AP ou APC, lorsque la simulation avait été réalisée avec un allongement de la durée moyenne d'incubation, était liée à :

- un effet période plus souvent détecté pour une même période d'observation
- un effet période détecté plus souvent pour des périodes d'observation plus courtes (Annexe II).

4.3. Impact de l'augmentation de la durée moyenne d'incubation

Tableau 4.18 - Proportion d'analyses dans lesquelles un effet période (modèles AP ou APC) a été détecté avec et sans variation de la durée d'incubation de l'ESB. Extension à gauche et à droite de la période 2001-2007, profils 4 et 5.

Période d'observation		Profil 4										Profil 5									
		Durée d'incubation										Durée d'incubation									
		stable					croissante					stable					croissante				
bornes	durée	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP
1985-2007	23	0	0	1	0	99	0	0	84	0	16	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1986-2007	22	0	0	1	0	99	0	0	81	0	19	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1987-2007	21	0	0	1	0	99	0	0	78	0	22	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1988-2007	20	0	0	1	0	99	0	0	78	0	22	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1989-2007	19	0	0	1	0	99	0	0	80	0	20	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1990-2007	18	0	0	1	0	99	0	0	80	0	20	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1991-2007	17	0	0	1	0	99	0	0	84	0	16	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1992-2007	16	0	0	1	0	99	0	0	95	0	5	0	0	4	0	96	0	0	0	0	100
1993-2007	15	0	0	39	0	61	0	0	97	0	3	0	0	48	0	52	0	0	0	0	100
1994-2007	14	0	0	95	0	5	0	0	97	0	3	0	0	83	0	17	0	0	0	0	100
1995-2007	13	0	0	100	0	0	0	0	96	0	4	0	0	87	0	13	0	0	16	0	84
1996-2007	12	0	0	99	0	1	0	0	100	0	0	0	0	85	0	15	0	0	98	0	2
1997-2007	11	0	0	99	0	1	0	0	100	0	0	0	0	82	0	18	0	0	100	0	0
1998-2007	10	0	2	97	0	1	0	43	57	0	0	0	0	80	0	20	0	0	98	0	2
1999-2007	9	0	84	15	0	1	0	99	1	0	0	0	0	90	0	10	0	0	100	0	0
2000-2007	8	0	100	0	0	0	0	99	0	0	1	0	0	97	0	3	0	0	100	0	0
2001-2007	7	0	99	0	1	0	0	97	0	0	3	0	0	98	0	2	0	0	98	0	2
2001-2008	8	0	100	0	0	0	0	98	0	0	2	0	0	97	0	3	0	0	98	0	2
2001-2009	9	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	0	1	0	0	98	0	2
2001-2010	10	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1
2001-2011	11	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1
2001-2012	12	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1
2001-2013	13	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0
2001-2014	14	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0
Nombre de modèles		0	985	552	1	862	0	1036	1208	0	156	0	0	1450	0	950	0	0	1303	0	1097
% de modèles par profil		0	41	23	0,04	35,9	0	43,2	50,3	0	6,5	0	0	60,4	0	39,6	0	0	54,3	0	45,7

Enfin, que la durée moyenne d'incubation de l'ESB ait subi, ou non, un allongement au cours du temps, le modèle APC a été très rarement détecté pour la période d'observation 2001-2007 et le profil 5 (tableau 4.18).

4.3.3. Performance du modèle APC dans l'estimation de l'effet cohorte lors d'un allongement de la durée moyenne de la période d'incubation de l'ESB

Afin d'évaluer les performances du modèle à estimer l'effet cohorte, nous avons utilisé la même méthode que précédemment (cf. partie 4.2.), en calculant le biais standardisé entre la prévalence issue de la simulation et celle estimée par le modèle, pour les animaux âgés de 6 ans au moment du dépistage et appartenant aux cohortes 1983 à 2000, dans lesquelles les infections ont été réalisées. Nous avons calculé les biais standardisés pour chaque profil d'infection, cohorte et période d'observation, pour les modèles APC sélectionnés et les modèles AC leur correspondant (tableau 4.19). Pour les périodes d'observations issues de l'extension à gauche et à droite de la période 2001-2007, les biais standardisés n'ont été

calculés que pour les profils 4 et 5 et l'extension à gauche de la période 2001-2007, l'effet période ayant été exceptionnellement détecté lors de l'extension à droite de cette même période (tableau 4.19).

Globalement, les biais standardisés étaient très faibles et les quelques valeurs hautes ont été observées pour la cohorte 1983 et la période d'observation 2007-2014 commençant sept ans après la fin de la période d'infection. Les performances des modèles APC et AC étaient similaires, et semblaient bonnes, mais avec une tendance à sous-estimer la prévalence dans pratiquement toutes les cohortes, quelle que soit la période d'observation. Cette sous-estimation était moins systématique et moins importante lorsque les données avaient été simulées avec une durée d'incubation stable de 6,3 ans. Ceci est probablement dû au fait que l'on a estimé le biais dans le groupe d'âge 6 ans. Cet âge était très proche de l'âge moyen aux symptômes des cas simulés avec une durée d'incubation moyenne de 6,3 ans ; par contre, lorsque l'on simulait les données avec une durée moyenne d'incubation croissante au cours du temps, l'âge moyen aux symptômes a été abaissé, la durée moyenne d'incubation étant inférieure à 6,3 ans pour 15 des 18 cohortes infectées. Il est probable que ceci soit à l'origine de cette sous estimation de la prévalence pour la cohorte, 6 ans n'étant pas le groupe d'âge le plus adapté pour optimiser les estimations du modèle lorsque la durée moyenne d'incubation passe de 5 à 6,5 ans.

4.3. Impact de l'augmentation de la durée moyenne d'incubation

Tableau 4.19 - Distribution des biais standardisés entre la prévalence estimée par les modèles AC ou APC et la prévalence simulée, pour la cohorte de naissance.

Biais calculés pour les animaux âgés de 6 ans avec augmentation de la durée moyenne d'incubation de 5 à 6.5 ans. Les valeurs absolues inférieures à 40% correspondent à une performance correcte du modèle.

a) Réduction à gauche de la période 1985-2014

Profils	Périodes d'observation*	Modèle	Biais standardisé (%)				
			Minimum	1er Quartile	Médiane	3ème Quartile	Maximum
1	1985-2014 à 2005-2014	APC	-4,60	-2,79	-0,56	0,42	23,02
		AC	-4,52	-0,82	-0,22	0,27	10,37
2	1985-2014 à 2008-2014 sauf 2006-2014	APC	-4,99	-4,49	-4,09	-2,18	60,22
		AC	-4,95	-4,25	-3,82	-2,13	1,81
3	1985-2014 to 1999-2014 +2007-2014	APC	-4,87	-4,72	-4,20	-1,84	33,56
		AC	-5,01	-4,57	-4,01	-2,37	0,95
4	1987-2014 à 1990-2014	APC	-5,12	-4,85	-4,34	-3,30	-0,85
		AC	-5,12	-4,85	-4,50	-3,33	-0,52
5	1985-2014 à 1995-2014	APC	-4,86	-4,54	-4,20	-3,22	-0,52
		AC	-4,83	-4,52	-3,97	-3,21	-0,21

b) Extension à droite de la période 1985-1991

Profils	Périodes d'observation*	Modèle	Biais standardisé (%)				
			Minimum	1er Quartile	Médiane	3ème Quartile	Maximum
1	1985-1991 à 1985-2014	APC	-4,87	-3,77	-1,02	-0,19	0,63
		AC	-4,86	-0,87	-0,37	0,39	2,07
2	1985-1991 à 1985-2014	APC	-4,81	-4,49	-4,27	-2,64	0,07
		AC	-4,85	-4,25	-4,10	-2,75	-0,53
3	1985-1991 à 1985-2014	APC	-4,88	-4,78	-4,13	-1,31	0,23
		AC	-4,88	-4,54	-3,60	-0,99	0,67
4	1985-1993 + 1985-1995 à 1985-2012 + 1985-2014	APC	-5,20	-4,78	-4,12	-2,88	2,47
		AC	-5,20	-4,79	-4,20	-3,17	0,69
5	1985-1992 à 1985-2014	APC	-4,87	-4,42	-4,12	-2,36	3,30
		AC	-4,87	-4,39	-3,96	-2,51	0,68

c) Extension à gauche de la période 2001-2007

Profils	Périodes d'observation*	Modèle	Biais standardisé (%)				
			Minimum	1er Quartile	Médiane	3ème Quartile	Maximum
4	1985-2007 à 1995-2007 + 2001-2007	APC	-5,02	-4,78	-4,49	-2,98	38,51
		AC	-5,01	-4,78	-4,23	-3,02	7,55
5	1985-2007 à 1996-2007 + 1998-2007 + 2001-2007	APC	-4,89	-4,46	-4,06	-3,24	54,91
		AC	-4,89	-4,52	-3,97	-3,19	0,87

*Périodes d'observation pour lesquelles le calcul des biais standardisés est possible, *i.e.*, pour lesquels au moins deux modèles APC ou AC ont été sélectionnés.

Nous avons également cherché à évaluer si, même en présence d'un allongement, au cours du temps, de la durée moyenne d'incubation de l'ESB, le modèle AC restait performant dans l'estimation de l'effet cohorte. Nous avons comparé, sur les mêmes périodes d'observation et cohortes, les biais standardisés calculés entre les modèles AC et la prévalence simulée pour la

cohorte, avec et sans variation de la durée moyenne d'incubation (tableau 4.20). Lorsque les données étaient simulées avec une durée d'incubation stable, les biais standardisés étaient majoritairement plus petits que lors de la simulation avec une durée d'incubation variable au cours du temps. De plus, pour cette dernière, les modèles AC avaient tendance à sous estimer la prévalence (valeur médiane des biais systématiquement négative) (tableau 4.20).

Tableau 4.20 - Distribution des biais standardisés entre prévalence par cohorte issue des modèles AC et prévalence par cohorte issue de la simulation, avec et sans variation de la durée moyenne d'incubation de l'ESB.

Biais calculés pour les animaux âgés de 6 ans avec une moyenne d'incubation stable à 6,3 ans ou avec augmentation de la moyenne d'incubation de 5 à 6.5 ans. Les valeurs absolues inférieures à 40% correspondent à une performance correcte du modèle.

a) Réduction à gauche de la période 1985-2014

Profils	Périodes d'observation*	Moyenne d'incubation	Biais standardisé (%)				
			Minimum	1 ^{er} Quartile	Médiane	3 ^{ème} Quartile	Maximum
1	1985-2014 à 2008-2014	Stable	-4,49	0,00	0,03	0,33	24,08
		Croissante	-4,34	-0,98	-0,28	0,23	7,23
2	1985-2014 à 2008-2014	Stable	-4,12	0,01	0,05	0,29	28,96
		Croissante	-4,72	-4,25	-3,83	-2,13	0,14
3	1985-2014 à 2006-2014	Stable	-4,91	-0,02	0	0,06	7,55
		Croissante	-4,75	-4,54	-4,10	-2,64	1,54
4	1985-2014 à 1998-2014	Stable	-0,16	-0,03	0,00	0,13	5,73
		Croissante	-4,87	-4,80	-4,36	-3,28	-0,52
5	1985-2014 à 2003-2014	Stable	-0,71	-0,02	0,01	0,28	54,78
		Croissante	-4,83	-4,48	-3,94	-3,13	2,51

b) Extension à droite de la période 1985-1991

Profils	Périodes d'observation*	Moyenne d'incubation	Biais standardisé (%)				
			Minimum	1 ^{er} Quartile	Médiane	3 ^{ème} Quartile	Maximum
1	1985-1991 à 1985-2014	Stable	-2,85	-0,02	0,01	0,06	0,98
		Croissante	-4,86	-0,87	-0,37	0,39	2,07
2	1985-1992 à 1985-2014	Stable	-3,91	-0,01	0,01	0,04	1,24
		Croissante	-4,85	-4,25	-4,10	-2,77	-0,53
3	1985-1991 à 1985-2014	Stable	-0,64	-0,03	-0,01	0,05	3,73
		Croissante	-4,88	-4,54	-3,60	-0,99	0,67
4	1985-1992 à 1985-2014	Stable	-1,04	-0,03	0,01	0,10	19,26
		Croissante	-4,87	-4,79	-4,18	-2,85	0,60
5	1985-1993 à 1985-2014	Stable	-2,13	-0,03	0,01	0,09	11,03
		Croissante	-4,87	-4,41	-3,96	-2,85	0,59

*Périodes d'observation pour lesquelles le calcul des biais standardisés est possible, *i.e.*, pour lesquels au moins deux modèles AC ont été sélectionnés.

4.3. Impact de l'augmentation de la durée moyenne d'incubation

Cependant les valeurs maximales des biais, observées pour les cohortes 1983 et les périodes d'observation les plus courtes de la réduction à gauche de la période 1985-2014, étaient beaucoup plus importantes lorsque les données étaient simulées avec une durée d'incubation stable. Ceci est probablement dû au fait que, lors de l'allongement de la durée moyenne d'incubation, la cohorte 1983 infectés entre 2 et 3 ans d'âge s'est vu attribuer une moyenne d'incubation de 5 ans ; les animaux infectés de cette cohorte ont alors déclaré leur symptôme en moyenne à 6,7 ans. Avec la catégorisation des données en années entières, ces animaux ont été comptabilisés dans le groupe 6 ans. Lorsque l'on a simulé les données avec une durée d'incubation stable de 6,3 ans, les animaux de la cohorte 1983 ont déclaré leurs symptômes à 8,08 ans en moyenne, soit 8 ans en années entières. La prévalence dans le groupe 6 ans pour la cohorte 1983 était alors beaucoup plus faible dans la simulation utilisant une moyenne d'incubation stable de 6,3 et la précision du modèle s'en est trouvée affectée, notamment pour les périodes d'observation courtes et tardives dans lesquelles très peu d'animaux de cette cohorte étaient testés.

De même, pour l'extension à droite de la période 1985-1991, les valeurs maximales ont été observées pour les cohortes les plus jeunes lorsque la période d'observation considérée ne permettait d'observer ces cohortes qu'à l'âge de 2 ans, groupe d'âge dans lequel la prévalence est très faible.

En conclusion, une augmentation modérée et régulière de la période d'incubation de l'ESB ne semble pas affecter les performances des modèles APC ou AC. Dans ce contexte, que l'effet période soit purement un artéfact ou partiellement lié à l'augmentation progressive de la période d'incubation, son maintien dans le modèle n'altère, ni n'améliore les performances du modèle dans l'estimation de la prévalence de la cohorte.

Chapitre 5 – Discussion générale

Le travail de thèse a débuté en 2006, dans un contexte où la prévalence de l'ESB était de plus en plus faible dans la plupart des pays européens ayant appliqué les mesures de contrôle et de surveillance dictées par le règlement CE 999/2001. La feuille de route établie en 2005¹² par la Commission Européenne prévoyait la possibilité d'alléger certaines mesures de contrôle et de surveillance, ainsi que les conditions requises *a minima* pour effectuer ces allègements. Parmi les conditions à l'allègement de la surveillance figurait la maîtrise de l'épizootie et la démonstration de cette maîtrise, notamment par la mise en évidence d'une décroissance du risque ESB au cours du temps. Il était donc nécessaire, de (ré)évaluer la tendance de l'épizootie à la lumière des données de surveillance les plus récentes, travail qui n'avait pas encore été fait dans la plupart des pays européens, et était cependant nécessaire à leur candidature à l'allègement des mesures de surveillance.

La première partie de ce chapitre est consacrée à la discussion des données, hypothèses et méthodes utilisées pour modéliser l'épizootie d'ESB en France et en Europe ; nous serons alors à même de discuter les résultats obtenus, en regard des précédentes études et des principales mesures de contrôle adoptées au niveau national et européen. Dans la seconde partie de ce chapitre, nous discutons les résultats obtenus à partir de l'analyse des données simulées et de la pertinence et des limites du modèle APC dans le cadre de son application à l'épizootie d'ESB.

Chaque partie du travail ayant fait l'objet d'une discussion spécifique au sein des quatre articles publiés ou soumis, nous ne revenons pas en détail sur tous les éléments préalablement discutés mais abordons la discussion des méthodes et résultats d'une manière générale et synthétique.

5.1. Modélisation de l'épizootie d'ESB en France et en Europe

5.1.1. Matériel et méthode

5.1.1.2. Données et hypothèses

Afin d'estimer l'évolution de l'épizootie en France et dans les autres pays participant au projet « BSE trend » du réseau d'excellence NeuroPrion, nous avons utilisé uniquement les données enregistrées à partir de 2001 et issues de la surveillance systématique de bovins à l'abattoir et

¹² TSE road map 2005, http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/roadmap_en.pdf, consulté le 23 septembre 2009

à l'équarrissage, ainsi que les quelques cas détectés par la surveillance clinique de l'ESB. Ceci nous permettait de nous affranchir de la sous notification des cas ESB et de la variabilité de la pression de surveillance ayant eu cours dans les différents pays, avant l'harmonisation de la surveillance au niveau européen. Pour certains pays comme la France, l'Irlande et le Royaume-Uni, de nombreux cas ESB, détectés avant la mise en place du dépistage systématique, ont ainsi été exclus de l'analyse. L'évaluation du risque ESB pour les cohortes les plus anciennes a été, de ce fait, impossible ou peu précise. Cependant, les cas ESB détectés avant 2001 n'étaient pas issus d'une population comparable à celle dont ont été issus les cas détectés après 2001 (totalité des bovins de plus de 24 ou 30 mois morts ou abattus). En France, par exemple, les cas ESB détectés avant 2001 ont été issus pour une part, d'une très petite population d'animaux suspects clinique et pour l'autre part, d'une population bovine « à risque », dépistée via les programmes pilotes de surveillance menés en 2000 et non représentative de la population bovine française.

Les études menées sur les données de surveillance clinique [Donnelly 2000; Cohen-Sabas *et al.* 2004; Supervie and Costagliola 2004] ont montré la difficulté à évaluer le niveau de sous déclaration des cas ESB et l'influence de ce paramètre, ainsi que celui des données de population (taille et survie), sur l'estimation de l'incidence de la maladie. Afin de s'affranchir de ces paramètres, nous avons choisi : i) de modéliser la prévalence de l'ESB à la mort, i.e., la probabilité de détecter un animal au moment du dépistage, en utilisant comme dénominateur la population testée et comme numérateur le nombre de cas détectés à partir de cette population, ii) de n'utiliser que les données issues du dépistage systématique de l'ESB à l'abattoir et à l'équarrissage, exhaustif pour les bovins de plus de 30 mois, respectivement depuis janvier ou juin 2001, en France. La date de prise en compte des données a été adaptée à chaque pays de manière à n'inclure que les données enregistrées à partir du moment où le dépistage était réellement exhaustif. Cependant, les quelques cas dépistés par le système de surveillance clinique après janvier 2001 ont été conservés, dans l'idée que, à quelques semaines près, ces animaux auraient été détectés à l'équarrissage.

Afin de s'assurer de la comparabilité des résultats entre pays, nous avons cherché à exclure les bovins et les cas non natifs du pays considéré, ainsi que les animaux de moins de 30 mois, l'âge minimal des animaux au dépistage ayant été abaissé en août 2002 de 30 à 24 mois au niveau communautaire et modifié deux fois en France entre janvier 2001 et décembre 2007 (cf. partie 1.3.1). Cette exclusion n'a pas toujours été possible pour tous les pays du fait d'un manque de précision dans l'enregistrement des dates de naissance des animaux. Cependant, très peu de cas ESB ayant été détectés parmi les animaux âgés de 24 à 30 mois, le maintien de

cette catégorie d'âge dans les données analysées ne devait pas affecter les résultats du modèle. De même, il aurait été préférable d'exclure les cas d'ESB atypique, ceux-ci présentant des caractéristiques épidémiologiques, notamment un âge aux symptômes, différentes de celles de l'ESB classique. Lors de la mise en place du projet NeuroPrion, la définition des cas atypiques ne faisait pas consensus et peu de pays avait analysé de manière rétroactive les cas ESB pour distinguer les cas atypiques. Aussi, dans l'étude de l'épizootie au niveau européen, les cas d'ESB atypique ont été conservés dans les données analysées, au risque d'introduire un biais dans les résultats, notamment pour la Pologne, qui présentait une forte proportion de cas atypiques. Pour évaluer ce biais, nous avons ré-analysé les données de la Pologne en excluant les cas atypiques mais n'avons pas observé de changement majeur des résultats. De même, lors de l'analyse spécifique de l'épizootie française et de la comparaison entre les épizooties française et italienne pour lesquelles nous avons exclu les cas atypiques, les résultats ne différaient pas de ceux obtenus avec inclusion des cas atypiques. Il est ainsi fort probable que, du fait du très petit nombre de cas atypiques détectés entre 2001 et 2007 dans la plupart des pays, l'inclusion de ces cas dans les données analysées n'ait pas modifié l'estimation des effets de l'âge et de la cohorte de naissance sur la prévalence apparente de l'ESB.

Dans la totalité des analyses réalisées, nous avons regroupé les données issues des différents plans de surveillance -abattoir, équarrissage et détection clinique- en supposant que les durées des phases préclinique et clinique de la maladie étaient négligeables par rapport à la durée d'incubation de la maladie (quelques semaines *versus* quelques années). Nous avons jugé cette hypothèse acceptable dans la mesure où la détection de la maladie n'est possible, au mieux, que dans les derniers mois précédant l'apparition des symptômes ; de plus certaines études avaient montré que la majorité des cas ESB détectés à l'équarrissage, ainsi qu'une proportion non négligeable de ceux dépistés à l'abattoir, présentaient très probablement les signes cliniques de la maladie [Cazeau *et al.* 2004]. Au final, avec l'effet de vases communicants existant entre les différents programmes de surveillance, à quelques semaines près, tous les cas ESB auraient fini par être détectés à l'équarrissage. Ainsi, en France, l'âge des cas détectés à l'abattoir n'est pas statistiquement différent de celui des cas détectés à l'équarrissage (cf. note de bas de page 174).

Nous avons utilisé des intervalles de un an pour la catégorisation des données nécessaire à l'analyse APC. L'utilisation d'intervalles plus larges, qui aurait permis d'augmenter la puissance de l'analyse tout en diminuant la variabilité entre les cellules du diagramme, n'était pas compatible avec la faible longueur de la période d'observation dont nous disposions

(2001-2007). Quant à l'utilisation d'intervalles plus étroits (6 mois), elle n'a pas été envisagée du fait d'une saisonnalité, plus ou moins forte, de l'exposition des bovins à l'ESB dans certains pays (France, Irlande, Royaume-Uni...) et qui aurait entraîné un très fort déséquilibre entre les cellules du diagramme de Lexis, préjudiciable à la puissance de l'analyse. De plus, la précision des données disponibles dans la plupart des pays participant au projet « BSE trend », ne permettait pas une telle catégorisation, les mois de naissance et de dépistage des animaux étant rarement précisés. Seule l'année de naissance des animaux étant disponible pour tous les pays, la cohorte de naissance a été définie sur la base de l'année civile, une cohorte de naissance regroupant tous les animaux nés du 1^{er} janvier au 31 décembre d'une même année. Cependant, pour la modélisation spécifique de l'épizootie en France, afin de prendre en compte la spécificité de l'élevage français et les données individuelles étant disponibles, une autre définition de la cohorte de naissance a été utilisée. Nous avons ainsi inclus dans une même cohorte les animaux nés du 1^{er} juillet au 30 juin de l'année suivante. Ce découpage particulier a permis de réunir, au sein d'une même cohorte, les animaux nés au cours d'une même saison de vêlage, élevés de la même manière d'un point de vue zootechnique et de ce fait, soumis, en théorie, à la même pression d'infection vis-à-vis de l'ESB.

Enfin, malgré l'existence d'autres facteurs influençant la prévalence apparente de l'ESB (cf. partie 1.2.4.), tels le type de production ou la région d'élevage, nous n'avons pas introduit ces facteurs d'ajustement dans le modèle APC, l'objectif étant d'évaluer, dans sa globalité, l'évolution au cours du temps du risque ESB et d'estimer l'impact des mesures de contrôle sur cette évolution. Du fait des hypothèses sous-jacentes aux effets d'âge, de période et de cohorte, exposées en première partie du chapitre 3, nous avons estimé que ces trois variables devaient être suffisantes à l'atteinte de nos objectifs.

5.1.1.2. Méthodes

Quelle que soit la méthode utilisée pour prendre en compte la non-linéarité des effets des variables (analyse catégorielle ou fonctions splines), nous avons assuré l'identification du modèle complet en imposant une contrainte supplémentaire sur les paramètres de la période. Lors de l'analyse catégorielle, les paramètres de deux périodes successives ont ainsi été égalisés à 0, tandis que l'on a retiré le dernier nœud, nœud le moins influent, de la B-spline utilisée pour modéliser l'effet de la période lors de la modélisation en continu. Ces contraintes étaient les moins restrictives que l'on pouvait imposer au modèle au vu des hypothèses concernant l'effet période, à savoir pas ou peu d'effet. Nous avons en effet supposé que les

évolutions des tests diagnostiques et des plans de surveillance depuis 1990 étaient les principaux facteurs pouvant être à l'origine d'un effet période. En utilisant les données issues de la surveillance exhaustive de l'ESB, constante entre 2001 et 2007, nous n'attendions pas d'effet période, les tests de dépistage utilisés au cours de cette période n'ayant pas subi de changement majeur. Nous avons estimé que les contraintes appliquées à l'effet période seraient les moins influentes lors de l'ajustement du modèle complet. Malgré les hypothèses fortes que nous avons concernant l'effet période, nous avons choisi de le tester dans le modèle complet plutôt que de se contenter d'un modèle âge-cohorte. Nous ne pouvions, en effet, être sûrs de l'exhaustivité de la surveillance dans certains pays, notamment au début de la période étudiée, ni ne pouvions garantir d'avoir identifié tous les facteurs pouvant être à l'origine d'un effet période. La concordance des résultats obtenus avec les différentes méthodes, spline ou catégorielle, calcul des différences secondes et R_0 , semblent indiquer que nos hypothèses et manières de procéder étaient correctes.

L'utilisation de l'analyse catégorielle pour des variables continues, telles que l'âge, la période et la cohorte, a été vivement critiquée. Aussi, les données françaises ont été analysées au moyen de splines de régression, qui nécessitait de choisir des nœuds mais permettait de tester les inflexions de la courbe en relation avec les mesures de contrôle. Des fonctions B-splines cubiques ont ainsi été utilisées pour modéliser de manière continue les effets de l'âge, de la cohorte et de la période. Le nombre et la place des nœuds, nécessaires au bon ajustement de ces fonctions, ont été sélectionnés dans un panel de nœuds « probables » par rapport aux connaissances disponibles. Pour la cohorte de naissance, nous avons ainsi supposé que les nœuds optimaux devaient se situer à proximité des dates de mise en place des principales mesures de contrôle, là où l'on attendait une inflexion de la courbe, liée à la diminution de l'exposition des animaux nés l'année même de l'application de la mesure, ou, à défaut, l'année suivante. Afin de s'assurer que les modèles sélectionnés n'étaient pas sur-paramétrés, nous avons ajusté en parallèle un modèle catégoriel, ne requérant aucune hypothèse sur la forme des effets des variables du modèle. Le modèle utilisant les splines a permis d'améliorer l'ajustement du modèle et l'évaluation du risque ESB, notamment pour les cohortes les plus récentes pour lesquelles peu d'information était disponible.

Cependant, en dépit des limites de cette méthode, nous avons préféré l'analyse catégorielle pour comparer l'évolution de l'épizootie dans les différents pays, car cette méthode pouvait être facilement standardisée ; ce n'était pas le cas avec les fonctions splines, pour lesquelles les nœuds auraient dû être déterminés en fonction de l'historique de la maladie dans chaque pays. Les résultats obtenus ont été satisfaisants et concordants avec les estimations

antérieures menées dans certains pays [Anderson *et al.* 1996; Denny and Hueston 1997; Ru *et al.* 2007; Ducrot *et al.* 2008]. Cependant, une amélioration de la qualité d'ajustement du modèle aurait pu être apportée en pondérant les cellules du diagramme par l'inverse de leur variance. Cela aurait certainement amélioré l'estimation du risque ESB pour les catégories extrêmes d'âge et de cohorte, sans toutefois influencer de manière importante les résultats principaux montrant une épizootie en décroissance dans la majorité des pays européens.

5.1.2. Résultats

En utilisant le modèle APC pour évaluer l'évolution au cours de temps (tendance) de l'épizootie d'ESB, nous avons supposé que l'effet cohorte était le reflet du niveau d'exposition des bovins à l'ESB, niveau d'exposition ayant été modifié au cours du temps par l'application de différentes mesures de contrôle. Les modèles APC, tels que nous les avons ajustés, nous ont permis d'obtenir des résultats exprimés en OR. L'ESB étant une maladie étant rare, nous pouvons considérer que l'OR est une bonne approximation du RR, c'est à dire du risque pour un animal, d'âge a , appartenant à la cohorte de naissance c et dépisté l'année p , d'être détecté comme un cas ESB par rapport au même risque pour un animal appartenant au groupe de référence (âge, cohorte et période déterminés). C'est ce RR que nous dénommons ci-après « risque ESB ».

5.1.2.1. Tendances de l'épizootie en France

Concernant l'analyse des données françaises, nous avons obtenu des résultats similaires avec les différentes méthodes utilisées, analyse catégorielle ou utilisation des splines, les très légères différences observées étant dues à un découpage différent des cohortes de naissance. Nous avons mis en évidence une augmentation significative du risque ESB pour les animaux nés entre juillet 1990 et juin 1993 puis une diminution significative du risque ESB pour les animaux nés à partir de janvier 1995 ou juillet 1995 selon la définition de la cohorte (année civile vs découpage juillet-juin). Ce décalage de 6 mois est probablement dû d'une part, à l'exposition saisonnière des bovins à l'ESB et d'autre part, à la mesure de décembre 1994. Ainsi, les animaux nés entre juillet et décembre 1994 ont été plus exposés à l'ESB que les animaux nés entre janvier et juin 1995 faisant partie de la même cohorte du fait : i) de leur saison de naissance, ii) de la mise en place, en décembre 1994, de l'interdiction de l'utilisation des FVO dans l'alimentation de tous les ruminants. On peut ainsi raisonnablement penser que la diminution du risque ESB, suite au pic de 1993-1994, a réellement débuté à partir de

janvier 1995. Le calcul des différences secondes a permis de mettre en évidence une accélération de la tendance décroissante du risque ESB autour de l'année de naissance 1996. Ces résultats sont concordants avec ceux des précédentes études menées sur des données issues de la surveillance de l'ESB à l'abattoir et à l'équarrissage entre 2000 et 2001 [La Bonnardière *et al.* 2004; Morignat *et al.* 2004] et ceux plus récents, utilisant la méthode du rétrocalcul, basés sur les données de surveillance jusqu'en 2004 [Supervie and Costagliola 2007]. Ces études avaient montré une décroissance du nombre d'infections à partir de janvier 1995 [Supervie and Costagliola 2007] et une décroissance du risque entre les cohortes 94-95 (animaux nés de juillet 1994 à juin 1995) et 95-96 (animaux nés de juillet 1995 à juin 1996) avec une accélération de cette tendance autour de la cohorte 95-96 [Morignat *et al.* 2004]. L'analyse des données abattoir [La Bonnardière *et al.* 2004] avait mis en évidence une augmentation du risque entre les cohortes 93-94 et 94-95, alors que nos résultats indiquent un risque ESB similaire pour les animaux de ces cohortes. Cette différence peut être expliquée par le fait que nous avons utilisé des données plus complètes et avons comparé le risque ESB de ces cohortes à un âge légèrement inférieur (6 ans) à celui utilisé dans la comparaison effectuée par La Bonnardière (7,5 ans). Enfin, notre estimation d'une augmentation du risque ESB entre juillet 90 et juin 93 -les données utilisées ne permettant pas d'estimer la tendance antérieure- est concordante avec les estimations du nombre d'animaux infectés établies par Supervie *et al* [Supervie and Costagliola 2007]. Cette augmentation de l'exposition des bovins à l'ESB serait liée à l'association des contaminations croisées entre aliments pour bovins et aliments destinés aux animaux monogastriques et du recyclage dans les FVO de matériaux infectés provenant d'un premier pic d'infection par l'ESB ayant eu lieu vers 1989.

5.2.1.2. Tendances de l'épizootie dans les autres pays

Au niveau européen, l'analyse comparative des données ESB des différents pays a permis de confirmer une décroissance de l'épizootie, entre 1988 et 2002, dans tous les pays, excepté la Pologne. Pour celle-ci, à l'heure actuelle, l'exposition des cohortes ne semble pas avoir varié depuis 1994. Cependant, les données de surveillance de ce pays sont relativement récentes et les cas peu nombreux (56 cas au 31 décembre 2007) du fait d'une mise en place tardive des mesures de surveillance liée à une entrée récente au sein de l'Union Européenne. Pour la même raison, l'application des mesures de contrôle de l'ESB en Pologne a été plus tardive que dans les autres pays de l'Union et il est probablement encore trop tôt pour juger de leurs effets.

Cependant, si la maîtrise du risque ESB semble établie dans 6 des 7 pays étudiés, chaque pays semble avoir eu sa propre expérience de l'épizootie. L'épizootie est ainsi caractérisée, pour chaque pays, par sa tendance et la précocité de la décroissance du risque ESB (figure 3.30 page 166). Au Royaume-Uni, premier pays touché par l'ESB et le plus sérieusement atteint, la décroissance du risque ESB a débuté dès 1988 et s'est poursuivie de manière relativement régulière jusqu'en 1995, date à partir de laquelle on observe une accélération dans la décroissance du risque entre les cohortes 1995 et 1996 (figure 5.43).

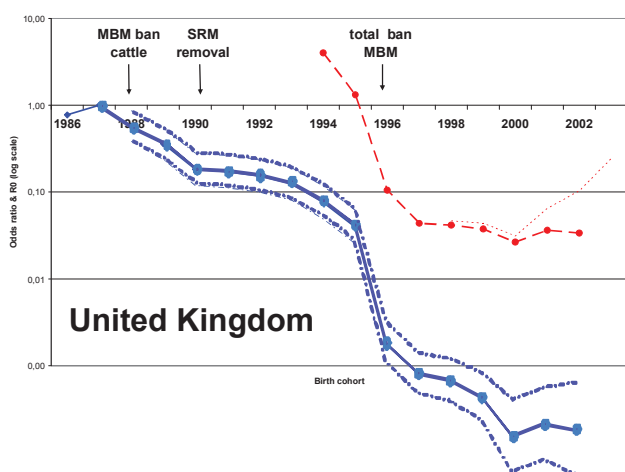


Figure 5.43 - Résultats du modèle AC pour le Royaume-Uni : effet cohorte (OR et IC à 95%) ajusté sur l'âge des animaux au diagnostic.

Complément à la figure 30 page 166.

Evolution du R_0 en parallèle. Echelle logarithmique.

- R_0 et IC supérieur à 95%
- OR et IC à 95 %

En Irlande, le risque ESB a commencé à décroître un an après la France, en 1996, mais cette décroissance semble y a été plus rapide par la suite. Pour l'Italie et l'Allemagne, il a fallu attendre l'année 1997 pour que le risque ESB commence à décroître. La diminution du risque ESB semblait plus marquée en Italie avec une accélération significative de la tendance mise en évidence autour de la cohorte 1998. Enfin, aux Pays-Bas, les résultats du modèle ont indiqué une diminution significative du risque ESB seulement à partir de 1998. Cependant, la précision des données hollandaises ne permettait pas de connaître l'année de naissance exacte des animaux testés, seuls l'âge au diagnostic et l'année de détection étant renseignés. La cohorte de naissance des animaux a ainsi été calculée à partir de ces deux variables. De ce fait, chaque cohorte de naissance regroupait des animaux nés au cours de 2 années successives. Cette méthode de regroupement a fait basculer 16 cas ESB nés en 1996 dans la cohorte 1997, celle-ci voyant passer son nombre de cas de 12 à 28. Il est très probable que ceci soit à l'origine de la mise en évidence assez tardive de la diminution du risque ESB aux Pays-Bas et que cette diminution ait en fait commencé dès 1997.

Il faut également noter que pour l'Italie, l'Allemagne et les Pays-Bas, nous ne disposons pas de données suffisamment précises pour évaluer le risque ESB pour les cohortes antérieures à 1990.

5.2.1.3. Mesures de contrôle

Il était intéressant de voir, en regard de nos résultats, si l'on pouvait évaluer l'effet des principales mesures de contrôle, notamment celle de novembre 2000¹³ sur l'évolution du risque ESB au cours du temps. L'efficacité des mesures de contrôle n'a jamais pu être quantifiée avec précision, du fait des très nombreuses incertitudes quant à la dose infectante, la réduction de cette dose par la modification des différents processus industriels et l'application correcte des restrictions à l'utilisation et au commerce de certains matériaux à risque. Aussi, l'évaluation de l'efficacité des mesures de contrôle relève essentiellement de la discussion.

Pour discuter de l'effet des mesures de contrôle en regard de l'évolution du risque ESB, nous avons supposé que la contamination de l'ESB était exclusivement alimentaire, que les animaux se contaminaient avant l'âge de un an et que les différentes mesures de contrôle mises en place au cours du temps étaient seules à l'origine de la décroissance de l'exposition des bovins à l'ESB. Le fait de disposer des données ESB de pays n'ayant pas tous appliqué les mesures de contrôle au même moment, et l'utilisation de différentes méthodes pour modéliser la tendance de l'épizootie, nous ont permis de mieux cerner l'impact potentiel des mesures de contrôle sur l'évolution du risque ESB en Europe. Nous avons ainsi mis en relation les dates d'application supposées des mesures de contrôle et l'aspect de la courbe de l'effet cohorte à proximité de ces dates. Pour la France et l'Italie, nous avons, de plus, cherché à mettre en évidence une variation particulière de la tendance de la courbe par un placement particulier des nœuds, lors de l'utilisation des fonctions splines, et par l'examen des différences secondes calculés à partir des OR de l'effet cohorte.

Deux types de mesures de contrôle ont été pris en compte :

- les mesures de restriction commerciales et d'utilisation, puis d'interdiction des FVO ; les interdictions d'utilisation des FVO en alimentation animale ont fait l'objet de deux ou trois mesures successives : interdiction pour tous les ruminants, interdiction seulement pour les bovins puis extension dans un second temps à tous ruminants (en France et aux Pays-Bas), et enfin interdiction étendue à tous les animaux destinés à la consommation humaine,

¹³ Interdiction d'utiliser les FVO dans l'alimentation de tous les animaux destinés à la consommation humaine.

- les mesures concernant les MRS, restriction et interdiction d'utilisation en alimentation animale et modification des processus de fabrication.

De manière générale, il semble que les premières mesures de contrôle, interdiction de l'utilisation des FVO dans l'alimentation des ruminants (bovins pour la France) et limite à l'importation des FVO britanniques, n'aient pas été suffisantes pour maîtriser complètement l'épizootie en Europe. Il est probable que les contaminations croisées entre aliments pour ruminants et aliments destinés aux animaux monogastriques, contaminations accidentelles ou liées à l'application peu rigoureuse des mesures, soient à l'origine de l'effet peu marqué de ces premières mesures et d'une augmentation significative du risque ESB pour certaines cohortes en France, Irlande, Allemagne et aux Pays-Bas (cf. figure 3.30 page 166).

La décroissance de l'épizootie n'a manifestement pas été déclenchée par les mêmes mesures dans les différents pays étudiés. En France, pour le deuxième pic de contamination (1993-1994) -le premier ayant été mis en évidence autour de 1988/1989-, la décroissance du risque ESB semble liée à la mise en place de l'extension de l'interdiction des FVO à tous les ruminants, mesure qui n'a probablement été effective qu'à partir de 1995. Dans les autres pays, excepté au Royaume-Uni, les mesures de retrait et de traitement des MRS semblent avoir joué ce rôle de « déclencheur », bien que, en Irlande par exemple, la décroissance du risque ait débuté dès 1996, un an avant la mise en place effective de ces mesures. En France, au Royaume-Uni et en Irlande, où la courbe du risque ESB était déjà décroissante, la mise en place de ces mesures semble avoir accéléré cette tendance (figures 3.27 page 146, figure 5.43 page 222 et figure 3.30 page 166). Les différences secondes calculées pour les données françaises confirment cette accélération de la tendance autour de la cohorte 1996.

Concernant la mesure de novembre 2000, nous n'avons pas été en mesure d'évaluer son effet à partir des données disponibles, et ce malgré le recul de 7 ans dont nous disposons depuis sa mise en place. En effet, cette mesure a été adoptée alors que la tendance de l'épizootie était déjà décroissante et que peu de cas ESB étaient détectés parmi les animaux nés en 2000. Il est, de ce fait probable, que l'on ne puisse jamais évaluer l'effet propre de cette dernière mesure de contrôle. En 2004, en se basant sur les caractéristiques de l'épizootie et de la population bovine françaises, il avait été estimé qu'il fallait attendre 2009 pour juger de l'effet de cette mesure [Calavas *et al.* 2004; Calavas *et al.* 2007]. A ce jour, un seul cas ESB, né le 1^{er} janvier 2001, a été détecté en France. Dans le reste de l'Europe, on dénombrait, au 31 décembre 2007, 25 cas ESB nés en 2001 -dont 8 détectés dans les pays récemment entrés dans l'Union-, 9 nés

en 2002 dont 5 détectés au Royaume-Uni et aucun cas né en 2003¹⁴. Il est possible que les cas détectés au Royaume-Uni aient été contaminés par des « fonds de silos » contenant de l'aliment fabriqué avant l'interdiction totale de l'utilisation des FVO en Europe [Burke 2009]. Au final il n'a pas été possible d'évaluer l'effet propre des différentes mesures de contrôle mises en place depuis le début de l'épizootie au Royaume-Uni, l'effet de chaque mesure s'ajoutant à celui des mesures précédentes et étant modulé par différents facteurs. Ainsi les décalages observés dans la décroissance du risque ESB entre les différents pays européens sont probablement multifactoriels, dus d'une part, aux variations dans la mise en place des différentes mesures de contrôle (date d'application effective, mesure partielle ou complète), d'autre part, à un effet de vases communicants entre pays, certains pays ayant ainsi un effet protecteur ou délétère sur ses partenaires commerciaux, et enfin, à un facteur difficilement quantifiable : une prise de conscience plus ou moins tardive et forte de la nécessité de prendre au sérieux une maladie comme l'ESB.

¹⁴ Report on the monitoring testing of ruminants for the presence of transmissible spongiform encephalopathies in the EU in 2007, http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/preliminary_annual_report_tse2007_en.pdf, consulté le 29 septembre 2009.

5.2. Evaluation du modèle APC dans le cadre de son application à l'ESB : une approche par simulation

Lors de l'analyse des données françaises et italiennes, nous avons mis en évidence un effet période inattendu et apparemment dépendant de la manière de catégoriser les données. Nous nous sommes demandé si cet effet période était seulement un artéfact, reflétant une sensibilité particulière du modèle APC aux données et à la manière de les regrouper, alors que nous disposions d'une période d'observation réduite et d'un faible nombre de cas, ou si cet effet correspondait à un réel effet période, dû à un facteur que nous n'avions pas identifié préalablement à notre analyse. Nous nous sommes également demandé si cet effet avait un impact sur les performances du modèle à estimer correctement l'effet cohorte, cet effet nous intéressant particulièrement dans l'étude de la tendance de l'ESB. L'analyse des données simulées a ainsi eu un double objectif :

- évaluer dans quelles conditions un effet période, non lié à des variations du système de surveillance, pouvait être mis en évidence,
- évaluer l'impact, sur l'estimation de l'effet cohorte, du maintien ou de l'exclusion du modèle APC d'un tel effet période.

5.2.1. Matériel et méthode

Nous souhaitons évaluer le modèle dans les conditions de l'épizootie d'ESB française. Les paramètres nécessaires à la simulation des données ont ainsi été définis à partir des caractéristiques de la population bovine française et de l'épizootie, telles que connues ou estimées en France. Pour des raisons de praticité, nous avons été amenés à faire un certain nombre d'approximations et de simplifications des paramètres afin de construire des données.

Concernant les caractéristiques de la population bovine, deux simplifications ont été utilisées. Nous avons tout d'abord fixé à 7 500 000 le nombre de naissances annuelles de 1940 à 2042 à partir de données observées entre 2003 et 2006. Il est bien évident que ceci ne reflète que grossièrement la réalité. Cependant, le nombre d'animaux infectés dans chaque cohorte de naissance étant faible en regard de la taille de la population bovine, nous avons estimé qu'une telle simplification ne devait pas affecter les résultats des analyses. La seconde simplification concernait la distribution de survie des bovins. Cette distribution a été estimée à partir des données de la BDNI, correspondant, en fait, au nombre de bovins présents en France au 1^{er}

janvier de chaque année, les bovins « perdus » au cours de chaque année étant soit morts, soit sortis du territoire. La distribution utilisée n'était ainsi pas tout à fait une distribution de survie, puisqu'un certain nombre de bovins de 7-9 mois sont vendus à l'étranger à des fins d'engraissement avant un abattage programmé autour de 18-20 mois d'âge. C'est la raison pour laquelle la courbe de survie présentait une partie linéaire très fortement décroissante entre 0 et 2 ans d'âge. Cependant, que ces animaux meurent en France ou ailleurs en Europe, vu l'âge auquel ils sont abattus, ils ne sont de toute manière pas dépistés. Cette approximation n'affectait donc pas l'estimation de la survie des bovins de 2 ans et plus, seuls animaux à être dépistés pour l'ESB. Nous avons ainsi estimé que la « perte » d'un certain nombre d'animaux âgés de moins de 2 ans n'était pas propre à influencer les résultats de notre étude, d'autant qu'aucun cas ESB de moins de 24 mois n'a été détecté en France.

Concernant les caractéristiques de l'ESB -période l'incubation et âge à l'infection-, nous avons utilisé les distributions et paramètres estimés par Supervie *et al* à partir des données françaises de surveillance exhaustive de la période 2001-2004 [Supervie and Costagliola 2004; Supervie and Costagliola 2007]. Ces estimations étaient légèrement différentes de celles estimés par Arnold, Ferguson ou Donnelly à partir des données anglaises [Anderson *et al.* 1996; Ferguson *et al.* 1997; Donnelly *et al.* 2002; Arnold and Wilesmith 2004]. Dans la mesure où nous nous plaçons dans les conditions de l'épizootie française, il nous a semblé plus adapté d'utiliser les résultats de la modélisation des données françaises. Nous avons cependant simplifié la distribution de l'âge à l'infection en ne gardant que quatre catégories : [0-1[, [1-2[, [2-3[et >3 sur les six utilisées par Supervie *et al* : [0-0,5[, [0,5-1[, [1-2[, [2-3[[3-5[et >5, la probabilité pour un animal de s'infecter entre 3 et 5 ans étant très faible. Nous avons estimé qu'une telle simplification ne devait pas modifier significativement la distribution de l'âge des animaux aux symptômes. Afin de prendre en compte l'augmentation, au cours du temps, de l'âge des cas, nous avons choisi, arbitrairement, de faire varier la durée moyenne d'incubation plutôt que de modifier la distribution de l'âge à l'infection. Les estimations les plus récentes de Supervie *et al* [Supervie and Costagliola 2007] étant en faveur d'une augmentation probable de la période d'incubation de 1,3 ans entre le début de l'épizootie et 2004, nous avons fait varier la durée moyenne d'incubation dans le même ordre de grandeur, avec une augmentation de 1,5 ans entre 1985 et 2000. Nous avons utilisé une augmentation linéaire de la moyenne d'incubation de 0.1 +/-0.02 an entre deux années d'infection successives. Cependant, si l'on considère que l'augmentation de la période d'incubation au cours du temps est liée à la réduction de l'exposition des bovins à l'ESB, et donc, à la mise en place des mesures de contrôle, l'augmentation de la durée d'incubation de la maladie n'est

probablement pas une fonction linéaire croissante du temps. L'utilisation d'une fonction en escalier, dont les intervalles pourraient être déterminés à partir des dates d'application des mesures de contrôle, serait certainement plus réaliste et mériterait d'être évaluée.

Un autre paramètre discutable dans notre simulation est la sensibilité des tests diagnostic que nous avons fixé à 100% dans les 6 mois précédant la fin de la période d'incubation. Pour fixer ce paramètre, nous nous sommes basés sur les évaluations menées en situation expérimentale, utilisant des doses infectantes probablement très supérieures à celles étant à l'origine de l'infection naturelle des animaux. En utilisant cette sensibilité, nous avons créé une situation beaucoup plus favorable à la détection des cas que celle correspondant à la situation réelle, la seule certitude étant une sensibilité des tests de 100% au moment de l'apparition des signes cliniques [Grassi *et al.* 2008].

Nous avons réalisé les infections sur la période 1985-2000, et par conséquent avons infecté uniquement les animaux nés entre janvier 1983 et décembre 2000, afin d'être cohérents avec l'épizootie française [Supervie and Costagliola 2004; Supervie and Costagliola 2006; Supervie and Costagliola 2007]. En effet, il est probable que l'épizootie ait débuté en France au début des années 80 pour « s'arrêter » au 1^{er} janvier 2001, aucun cas ESB né après cette date n'ayant été détecté à ce jour.

Enfin, aucun cas ESB n'ayant été détecté dans la tranche d'âge 2-2,5 ans en France et les données simulées étant regroupées en années entières pour l'âge, nous avons choisi, par simplicité, d'inclure dans le dépistage tous les animaux de 2 ans et plus, malgré le fait que la surveillance exhaustive en France ne concerne que les bovins de plus 2,5 ans.

Lors de l'ajustement des modèles APC, afin de pouvoir synthétiser les résultats obtenus pour l'effet cohorte, les modèles ont été ajustés de sorte à obtenir la prévalence pour la cohorte de naissance et les ORs pour l'âge et la période. La cohorte a ainsi dû être entrée en première variable dans le modèle, alors que dans nos précédentes analyses, l'âge était entré en premier. Cependant, cette inversion n'affecte pas les estimations des effets de l'âge et de la cohorte, et permet de moyenniser, sur les 100 analyses effectuées pour chaque profil d'infection et chaque période d'observation, les résultats obtenus pour l'effet cohorte. Enfin, nous avons fixé à 6 ans le groupe de référence pour l'âge, de manière à être cohérents avec les analyses réalisées sur les données françaises. Pour la période, il n'a pas été possible de fixer une période de référence et une contrainte additionnelle identiques pour toutes les analyses. En effet, du fait des modalités de variation de la période d'observation, aucune année d'observation n'était systématiquement présente dans tous les jeux de données analysés. De ce fait, si la prévalence par cohorte de naissance a été estimée dans le groupe d'âge 6 ans, elle n'a pas été évaluée

pour une année d'observation donnée, mais pour l'année, de la période d'observation considérée, présentant la prévalence brute la plus élevée.

Enfin, la sélection des modèles a été effectuée en se basant sur l'AIC. Ce critère permet de prendre en compte la complexité du modèle et est ainsi plus favorable aux modèles parcimonieux que le test du rapport de vraisemblance. Nous avons suivi les recommandations de Burnham et Anderson [Burnham and Anderson 1998] et, afin de favoriser les modèles les plus parcimonieux, avons utilisé une différence d'AIC de plus quatre, entre l'AIC minimal et l'AIC du modèle retenu. Lors de l'analyse des données françaises, nous avons utilisé une différence d'AIC de deux, moins parcimonieuse, afin de limiter le nombre de modèles sélectionnés lors de l'ajustement des splines. Cependant, en utilisant une différence d'AIC de quatre nous aurions également sélectionné le modèle APC catégoriel ajusté en parallèle des splines (cf. tableau 3.6 page 125).

5.2.2. Résultats

5.2.2.1. Efficacité de la surveillance : proportion d'animaux infectés détectés

Les résultats de la simulation ont permis d'estimer la proportion d'animaux infectés que l'on pouvait détecter selon la date de début de la surveillance exhaustive, de la durée de cette surveillance et de la forme de l'épizootie. Toutes cohortes infectées confondues, cette proportion a été, au mieux, de 19,4% avec une durée d'incubation stable et le profil 4 (pic d'infection) et de 25,5% lorsque la durée moyenne d'incubation était progressivement augmentée et avec le profil 3 (exponentiel croissant) (figure 4.42 page 207). Pour le profil d'infection 5 (avec pic d'infection et pic secondaire), proche de celui estimé pour l'épizootie française [Supervie and Costagliola 2004; Supervie and Costagliola 2007], ces valeurs étaient de 19,3% et 22,8% et ont été observées pour une surveillance débutant entre 1985 et 1990 et se terminant en 2014 ou 2007, ou débutant en 1985 et se terminant entre 2005 et 2014. Cependant, avec ce profil, pour la période d'observation 2001-2007, correspondant à celle dont nous disposons pour l'analyse des données de surveillance réelles, la proportion d'animaux infectés détectés était de moins de 3%, que la durée d'incubation ait varié ou non au cours du temps. Or cette proportion est certainement surévaluée du fait de la sensibilité des tests de dépistage que nous avons utilisée (cf. supra). Du fait de la distribution de survie des bovins en France, nous savions que, au mieux, 20% des animaux infectés pouvaient être détectés. Or, pour atteindre ce chiffre, les résultats de la simulation indiquent que, avec un profil d'infection proche de celui de l'épizootie française (profil 5), il aurait fallu avoir une

surveillance exhaustive au plus tard dès 1993, voire plus tôt, en raison de l'optimisme de nos estimations. Concernant la surveillance commencée en 2001, son prolongement au delà de 2007 n'améliore pas la proportion d'animaux infectés détectés et ce, quel que soit le profil d'infection. Avec le profil 5, moins de un cas en moyenne est détecté en 2008, 2009 et 2010 et plus aucun nouveau cas, en moyenne, pour les années de 2011 à 2014, et ce que la durée d'incubation ait variée ou non. Cependant, la variabilité sur les 100 simulations est de 0-6 cas (0-7 avec allongement de la durée d'incubation) en 2008 et 0-3 cas (0-4) en 2009, nombre du même ordre de grandeur que ce qui a été observé en France avec 3 et 5 cas d'ESB classique détectés en 2008 et 2009, à ce jour. En supposant que le profil 5 est assez représentatif de l'épizootie française passée, on pourrait s'attendre à la détection de 0 à 3 cas en 2010, 0 à 2 cas en 2011 puis un maximum de 1 cas annuel jusqu'en 2014, les estimations n'ayant pas été réalisées au delà de cette limite de temps et ce, que la durée d'incubation ait varié ou non au cours du temps.

5.2.2.2. Détection de l'effet période et performance du modèle à estimer l'effet cohorte

Lors de la première partie de la simulation, alors que nous n'avons pas introduit d'effet période ni de variation de la durée moyenne d'incubation de l'ESB, un effet période a été détecté dans près de la moitié des 38 400 analyses réalisées à partir des profils 1 à 4, et de la réduction et extension des périodes d'observation 1985-2014 et 1985-1991 (cf. partie 4.2.). Nous avons conclu que cet effet période était un artéfact lié à une augmentation rapide, sur une courte période, de la prévalence de l'ESB dans les cohortes de naissance. Dans ces conditions, il est probable que le modèle ait du mal à attribuer les effets respectifs de la cohorte et de la période en raison de la colinéarité des variables. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence d'effet délétère de cet effet période sur les capacités du modèle à estimer correctement l'effet cohorte.

Dans la deuxième partie, nous avons introduit une augmentation linéaire de la durée moyenne d'incubation de la maladie au cours du temps afin d'évaluer si la présence d'une interaction âge-cohorte pouvait être à l'origine de la détection d'un effet période (cf. partie 4.3.). Dans ces conditions, nous avons mis en évidence une détection en moyenne plus fréquente de l'effet période, hormis pour le profil 4 (pic d'infection) pour lequel l'effet période n'a plus été que rarement détecté. Nous n'avons pas encore d'explication à cette particularité. La présence d'une interaction âge-cohorte dans le modèle semble ainsi favoriser la détection de l'effet période. Cependant, là encore, dans le contexte de la simulation, cet effet période ne semble pas impacter les capacités du modèle à évaluer l'effet cohorte.

De manière plus générale, nous nous sommes posé la question de la validité du modèle APC en présence d'une interaction âge-cohorte, liée, dans notre cas, à une augmentation, au cours du temps, de la durée moyenne d'incubation de l'ESB. Le modèle APC, tel qu'utilisé dans nos études, suppose additifs les effets des variables. En présence d'une interaction, représentant un écart à l'additivité, cette hypothèse n'est plus vérifiée. Or, dans le modèle APC il est difficile, sinon impossible, de prendre en compte l'interaction entre deux des variables temporelles du modèle (cf. partie 2.2.4.). Afin d'évaluer l'impact de l'interaction âge-cohorte sur les performances du modèle à estimer l'effet cohorte, nous avons comparé les estimations des modèles AC à partir des données simulées avec et sans variation de la durée moyenne d'incubation de la maladie (partie 4.3.). Nos résultats indiquent que la présence de l'interaction ne semble pas affecter de manière significative les capacités du modèle AC à estimer correctement l'effet cohorte. On note, cependant, en présence de l'interaction âge-cohorte, une tendance du modèle AC à sous évaluer légèrement (0 à -4%) la prévalence dans les cohortes de naissance. Nous avons supposé que cette sous-estimation était due au choix non optimal du groupe de référence pour l'âge, pour les données simulées avec une augmentation de la durée moyenne d'incubation ; cette hypothèse devra cependant être évaluée.

Au final, les résultats obtenus avec la simulation ne nous ont pas permis de déterminer si l'effet période détecté lors de l'analyse des données françaises était un artéfact pur ou était dû à une augmentation, au cours du temps, de la durée moyenne d'incubation de la maladie. Cependant, les résultats de la simulation, ainsi que la comparaison des résultats des différentes analyses effectuées sur données réelles, indiquent que, dans notre cas, la prise en compte ou l'exclusion de l'effet période lors de l'ajustement du modèle APC ou AC n'affecte pas les estimations de l'effet cohorte. Le modèle APC semble donc, au final, bien adapté à l'étude de la tendance de l'épizootie d'ESB, les résultats ne semblant pas biaisés par le faible nombre de cas, une période d'observation relativement courte et une augmentation modérée de la durée moyenne d'incubation de la maladie au cours du temps. Tout au plus, ce modèle souffre d'un manque de puissance qui peut être amélioré par l'utilisation de fonctions continues pour modéliser les effets de l'âge, de la période et de la cohorte.

Conclusion

Le modèle APC s'est révélé être une méthode pertinente pour l'étude de la tendance de la prévalence de l'ESB dans le temps, du fait que l'âge des animaux, leur année de naissance et l'année de diagnostic sont parmi les principaux facteurs influençant la prévalence apparente de cette maladie. Les connaissances de la maladie et l'utilisation de jeux de données adaptés ont permis de sélectionner les contraintes nécessaires à l'identification du modèle complet. La méthode de simulation que nous avons développée en parallèle a permis de s'assurer de la pertinence de nos hypothèses et de l'utilisation adéquate du modèle APC dans un contexte épidémique pour lequel ce modèle est très peu utilisé. Aussi, mobilisant peu d'hypothèses, le modèle APC a fourni une approche intéressante de l'étude de l'évolution temporelle de l'épizootie en France et en Europe. Le modèle APC a ainsi été associé aux méthodes d'évaluation du risque ESB au niveau européen. Les résultats obtenus au cours de ce travail ont été intégrés aux dossiers d'évaluation de certains pays, en vue de leur candidature à l'allègement des mesures de surveillance. En France, ce travail, a, en outre, contribué à asseoir l'expertise du comité d'expert spécialisé de l'AFSSA (CES ESST) relativement à la question du relèvement de l'âge des animaux au dépistage [AFSSA 2007; Note de service DGAL/SDSPA/SDSSA/N2008-8321 2008].

En considérant que, dans le modèle APC, l'effet cohorte était le reflet de l'exposition des bovins à l'agent responsable de l'ESB, et que, appliquées et efficaces, les mesures de contrôle devaient avoir réduit cette exposition au cours du temps, nous avons mis en relation les variations de l'effet cohorte estimé par le modèle et les dates d'application supposées des principales mesures de contrôle. Par cette approche nous avons pu discuter l'effet probable des mesures de contrôle sur l'évolution du risque ESB depuis la fin des années 80. Cependant, à l'instar des précédentes études mobilisant d'autres méthodes, telles que le rétrocalcul, notre approche n'a pas permis de quantifier l'effet propre de chacune des mesures, ni de déterminer si la mesure de novembre 2000 a eu un rôle déterminant dans la maîtrise finale de l'épizootie.

Il est ainsi regrettable que, malgré les efforts de contrôle et de surveillance et les moyens financiers mis en place, il ne soit, au final, pas possible de quantifier plus précisément la contribution de chaque mesure à la maîtrise du risque ESB. L'ignorance du niveau exact des doses infectantes, la difficulté à déterminer l'efficacité des traitements industriels à réduire ces doses, le déficit d'évaluation du niveau d'application des mesures de réduction du risque

tout au long de la chaîne alimentaire et les effets de vases communicants entre les pays, sont en partie à l'origine de la difficulté à quantifier l'effet des mesures de contrôle. De plus, la longue période d'incubation de la maladie, associée à son diagnostic post-mortem uniquement possible en fin d'incubation, rendent impossible l'accès en temps réel à la population d'animaux infectés. L'évaluation de la situation épidémiologique de l'ESB nécessite ainsi un recours à la modélisation, avec tous les inconvénients et imprécisions que comportent les différentes méthodes utilisables.

L'expérience européenne de l'ESB a montré la difficulté à maîtriser l'épizootie et à évaluer en temps réel l'effet des mesures de contrôle. Aussi, en l'absence de moyens permettant d'assurer une « stérilisation » complète des matières vis-à-vis du prion et/ou de moyens permettant de vérifier l'absence d'éléments à risque dans l'alimentation des ruminants, il serait prématuré de procéder à un allègement des mesures de contrôle. L'identification des formes atypiques d'ESB, dont au moins une est potentiellement transmissible à l'homme, rend encore plus délicat l'allègement des mesures, alors qu'il nous faudra, très certainement, apprendre à vivre avec ces maladies zoonotiques dont certaines sont probablement d'origine naturelles.

Références bibliographiques

- Abrial, D., D. Calavas, et al. (2005). "Poultry pig and the risk of BSE following the feed ban in France - Spatial analysis." *Veterinary Research* **36**: 615-28.
- Abrial, D., D. Calavas, et al. (2005). "Spatial heterogeneity of the risk of BSE in France following the ban of meat and bone meal in cattle feed." *Preventive Veterinary Medicine* **67**(1): 69-82.
- Abrial, D., D. Calavas, et al. (2003). "Descriptive spatial analysis of BSE in western France." *Veterinary Research* **34**: 1-11.
- Adler, V., B. Zeiler, et al. (2003). "Small Highly Structured RNAs Participate in the Conversion of Human Recombinant PrPsen to PrPres *in vitro*." *Journal of Molecular Biology* **332**(1): 47-57.
- AFSSA (2002). Avis concernant un projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 3 décembre 1990 relatif à la police sanitaire de l'ESB. Saisine 2002-SA-228. AFSSA. Maisons-Alfort.
- AFSSA (2003). Avis concernant le relèvement de l'âge des animaux testés à l'abattoir et en équarrissage- Saisines 2003-SA-0302, 2003-SA-0178, 2003-SA-0207. AFSSA. Maisons-Alfort.
- AFSSA (2007). Avis relatif à l'évaluation de l'efficacité des mesures prises en novembre 2000 pour contrôler l'épizootie d'ESB. Saisine 2007-SA-0329. AFSSA. Maisons-Alfort.
- Allepuz, A., A. López-Quílez, et al. (2007). "Spatial analysis of bovine spongiform encephalopathy in Galicia, Spain (2000-2005)." *Preventive Veterinary Medicine* **79**(2-4): 174-85.
- Alper, T., W. A. Cramp, et al. (1967). "Does the Agent of Scrapie Replicate without Nucleic Acid?" *Nature* **214**: 764-6.
- Alper, T., D. A. Haig, et al. (1966). "The exceptionally small size of the scrapie agent." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **22**(3): 278-84.
- Altman, D. G. (1994). "Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors." *J Nat Cancer Inst* **86**(11): 829-35.
- Anderson, R. M., C. A. Donnelly, et al. (1996). "Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle." *Nature* **382**(6594): 779-88.
- Anonyme (2003). Opinion on the scientific steering committee on the field trial evaluation of two new rapid BSE post mortem tests. Brussels, European Commission.
- Armitage, P. and G. Berry (1987). *Statistical methods in medical research*. Oxford, Blackwell scientific publications.
- Arnold, M. E., J. B. Ryan, et al. (2007). "Estimating the temporal relationship between PrPSc detection and incubation period in experimental bovine spongiform encephalopathy of cattle." *Journal of General Virology* **88**(Pt 11): 3198-208.
- Arnold, M. E. and J. W. Wilesmith (2004). "Estimation of the age-dependent risk of infection to BSE of dairy cattle in Great Britain." *Preventive Veterinary Medicine* **66**(1-4): 35-47.
- Arsac, J.-N., A.-G. Biacabe, et al. (2007). "Biochemical identification of bovine spongiform encephalopathies in cattle." *Acta Neuropathologica* **114**(5): 509-16.
- Baron, T., A. Bencsik, et al. (2007). "Phenotypic similarity of transmissible mink encephalopathy in cattle and L-type bovine spongiform encephalopathy in a mouse model." *Emerging Infectious Diseases* **13**(12): 1887-94.
- Baron, T. and A. G. Biacabe (2006). "Origin of bovine spongiform encephalopathy." *Lancet* **367**(9507): 297-8.
- Baron, T., A. G. Biacabe, et al. (2007). "Atypical transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ruminants." *Vaccine* **25**(30): 5625-30.
- Baron, T. and D. Calavas (2005). "L'encéphalopathie spongiforme bovine - Bovine spongiform encephalopathy." *Pathologie Biologie* **53**(4): 229-36.
- Barrett, J. C. (1978). "The redundant factor method and bladder cancer mortality." *Journal of Epidemiology and Community Health* **32**(4): 314-6.

- Bastian, F. O. and C. D. Fermin (2005). "Slow virus disease: deciphering conflicting data on the transmissible spongiform encephalopathies (TSE) also called prion diseases." Microscopy Research and Technique **68**(3-4): 239-46.
- Belluau, L. and Y. Mathevon (2008). Etude du mode d'alimentation des génisses de renouvellement en élevage laitier/allaitant, en fonction du mois de naissance - Double approche qualitative et quantitative, INRA-AFSSA: 47 pp.
- Belot, A., P. Grosclaude, et al. (2008). "Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005." Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique **56**(3): 159-75.
- Béringue, V., O. Andréoletti, et al. (2007). "A bovine prion acquires an epidemic bovine spongiform encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission." Journal of Neuroscience **27**(26): 6965-71.
- Béringue, V., A. Bencsik, et al. (2006). "Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy." PLoS Pathogens **2**(10): e112.
- Béringue, V., J.-L. Vilotte, et al. (2008). "Prion agent diversity and species barrier." Veterinary Research **39**(4): 47.
- Berzuini, C. and D. Clayton (1994). "Bayesian analysis of survival on multiple time scales." Statistics in Medicine **13**(8): 823-38.
- Berzuini, C., D. Clayton, et al. (1993). "Bayesian inference on the Lexis diagram." Bulletin of the International Statistical Institute **50**: 149-64.
- Biacabe, A.-G., J. L. Laplanche, et al. (2004). "Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases." EMBO Reports **5**(1): 110-5.
- Biacabe, A.-G., E. Morignat, et al. (2008). "Atypical bovine spongiform encephalopathies, France, 2001-2007." Emerging Infectious Diseases **14**(2): 298-300.
- Bolton, D. C., M. P. McKinley, et al. (1982). "Identification of a Protein That Purifies with the Scrapie Prion." Science **218**: 1309-11.
- Boucher, K. M., M. L. Slattey, et al. (1998). "Statistical methods in epidemiology: a comparison of statistical methods to analyze dose-response and trend analysis in epidemiologic studies." Journal of Clinical Epidemiology **51**(12): 1223-33.
- Bousset, L. and R. Melki (2009). Structure, dynamique et fonction du prion. Biofutur. **302**: 31-4.
- Brown, P., L. M. McShane, et al. (2006). "On the question of sporadic or atypical bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob disease." Emerging Infectious Diseases **12**(12): 1816-21.
- Bruce, M., A. Chree, et al. (1994). "Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier." Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological sciences **343**: 405-11.
- Bruce, M. E., R. G. Will, et al. (1997). "Transmission to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent." Nature **389**: 498-501.
- Büeler, H., M. Fischer, et al. (1992). "Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein [see comments]." Nature **356**: 577-82.
- Burke, P. J. (2009). "Preliminary epidemiological analysis of BSE cases born after 2000 in Great Britain." Veterinary Record **164**(12): 370-1.
- Burnham, K. P. and D. R. Anderson (1998). Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach. New York, Springer.
- Burton, A., D. G. Altman, et al. (2006). "The design of simulation studies in medical statistics." Statistics in Medicine **25**(24): 4279-92.
- Buschmann, A., A. Gretschel, et al. (2006). "Atypical BSE in Germany-Proof of transmissibility and biochemical characterization." Veterinary Microbiology **117**(2-4): 103-16.
- Calavas, D., D. Costagliola, et al. (2004). Autosaisine AFSSA du 11 mars 2004 - Suivi de l'épizootie d'ESB en France, AFSSA.
- Calavas, D., G. Desjouis, et al. (2001). "Incidence et typologie des maladies des bovins adultes à expression nerveuse en France. Le réseau pilote NBA." Epidémiologie et Santé Animale **39**: 121-9.

- Calavas, D., C. Ducrot, et al. (2001). "Prevalence of BSE in western France by screening cattle at risk: preliminary results of a pilot study." *Veterinary Record* **149**(2): 55-6.
- Calavas, D., C. Ducrot, et al. (2004). "Past, present and future of bovine spongiform encephalopathy in France." *Current Topics in Microbiology and Immunology* **284**: 51-63.
- Calavas, D., E. Morignat, et al. (2002). Analyse du programme de recherche de l'ESB en équarrissage pour l'année 2001. Lyon, AFSSA-INRA.
- Calavas, D., V. Supervie, et al. (2007). "Complementary approach of data analysis and modelling to estimate the pattern of the BSE epidemic: the example of France." *Risk Analysis* **27**(5): 1141-50.
- Capobianco, R., C. Casalone, et al. (2007). "Conversion of the BASE Prion Strain into the BSE Strain: The Origin of BSE?" *PLoS Pathogens* **3**(3): 1-31.
- Carstensen, B. (2007). "Age-period-cohort models for the Lexis diagram." *Statistics in Medicine* **26**: 3018-45.
- Carstensen, B. and N. Keiding (2005). Age-Period-Cohort models: statistical inference in the Lexis diagram: unpublished manuscript at www.biostat.ku.dk/~bxc/APC.
- Casalone, C., G. Zanusso, et al. (2004). "Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 3065-70.
- Cazaubon, S., P. Viegas, et al. (2007). "Fonctions de la protéine prion PsPc." *Medecine Sciences* **23**(8-9): 741-5.
- Cazeau, G., C. Ducrot, et al. (2004). "Questionnaire analysis of BSE cases in France detected by active surveillance and the reasons for non-notification." *Veterinary Record* **154**(5): 133-6.
- Cazeau, G., C. Ducrot, et al. (2002). "Surveillance clinique de l'ESB en France Etude quantitative des caractéristiques des animaux et des signes cliniques observés en cas de suspicion." *Revue de Médecine Vétérinaire* **153**(12): 785-94.
- Chaplin, M. J., N. Barlow, et al. (2002). "Evaluation of the effects of controlled autolysis on the immunodetection of PrPSc by immunoblotting and immunohistochemistry from natural cases of scrapie and BSE." *Research in Veterinary Science* **72**(1): 37-43.
- Chen, H., P. Cohen, et al. (2007). "Biased odds ratios from dichotomization of age." *Statistics in Medicine* **26**(18): 3487-97.
- Clawson, M. L., J. A. Richt, et al. (2008). "Association of a bovine prion gene haplotype with atypical BSE." *PLoS ONE* **3**(3): e1830.
- Clayton, D. and E. Schifflers (1987). "Models for temporal variation in cancer rates. I: Age-period and age-cohort models." *Statistics in Medicine* **6**(4): 449-67.
- Clayton, D. and E. Schifflers (1987). "Models for temporal variation in cancer rates. II: Age-period-cohort models." *Statistics in Medicine* **6**(4): 469-81.
- Cockcroft, P. D. (1999). "Pattern-matching models for the differential diagnosis of bovine spongiform encephalopathy." *Veterinary Record* **144**: 607-10.
- Cockcroft, P. D. (2000). "Clinical sign profile likelihood ratios for bovine spongiform encephalopathy suspects." *Research in Veterinary Science* **68**(3): 285-90.
- Cockcroft, P. D. (2004). "The similarity of the physical sign frequencies of bovine spongiform encephalopathy and selected differential diagnoses." *Veterinary Journal* **167**(2): 175-80.
- Cohen-Sabas, C. H., D. Heim, et al. (2004). "Age-period-cohort analysis of the Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) epidemic in Switzerland." *Preventive Veterinary Medicine* **66**(1-4): 19-33.
- Colchester, A. C. and N. T. Colchester (2005). "The origin of bovine spongiform encephalopathy: the human prion disease hypothesis." *Lancet* **366**(9488): 856-61.
- Collinge, J. and A. R. Clarke (2007). "A general model of prion strains and their pathogenicity." *Science* **318**(5852): 930-6.
- Collinge, J., M. S. Palmer, et al. (1991). "Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease." *Lancet* **337**: 1441-2.
- Collinge, J. and M. Rossor (1996). "A new variant of prion disease." *Lancet* **347**: 916-7.

- Collinge, J., K. C. L. Sidle, et al. (1996). "Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD." *Nature* **383**: 685-90.
- Collins, S., C. A. McLean, et al. (2001). "Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies." *Journal of Clinical Neuroscience* **8**(5): 387-97.
- Collins, S. J., V. A. Lawson, et al. (2004). "Transmissible spongiform encephalopathies." *Lancet* **363**(9402): 51-61.
- Comoy, E. E., C. Casalone, et al. (2008). "Atypical BSE (BASE) transmitted from asymptomatic aging cattle to a primate." *PLoS ONE* **3**(8): e3017.
- Curnow, R., A. Hodge, et al. (1997). "Analysis of the BSE maternal cohort study: the discordant case-control pairs." *Applied Statistics* **46**: 345-9.
- DeArmond, S. J. and E. Bouzamondo (2002). "Fundamentals of prion biology and diseases." *Toxicology* **181**: 9-16.
- Decarli, A. and C. La Vecchia (1987). "Age, period and cohort models: a review of knowledge and implementation in GLIM." *Revisita di Statistica Applicata* **20**: 397-410.
- Deleault, N. R., B. T. Harris, et al. (2007). "Formation of native prions from minimal components in vitro." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(23): 9741-6.
- Denny, G. O. and W. D. Hueston (1997). "Epidemiology of Bovine spongiform encephalopathy in Northern Ireland 1988 to 1995." *Veterinary Record* **140**: 302-6.
- Deslys, J.-P. and J. Grassi (2005). "Test de dépistage des ESST animales : présent et futur." *Pathologie Biologie* **53**(4): 221-8.
- Deslys, J.-P., A. Jaegly, et al. (1998). "Genotype at codon 129 and susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease." *Lancet* **351**: 1251.
- Donnelly, C. A. (2000). "Likely size of the French BSE epidemic." *Nature* **408**: 787-8.
- Donnelly, C. A., N. M. Ferguson, et al. (2002). "Implications of BSE infection screening data for the scale of the British BSE epidemic and current European infection levels." *Proceedings Biological Sciences* **269**(1506): 2179-90.
- Donnelly, C. A., N. M. Ferguson, et al. (1997). "Analysis of dam-calf pairs of BSE cases: confirmation of a maternal risk enhancement." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **264**: 1647-56.
- Donnelly, C. A., N. M. Ferguson, et al. (1997). "The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. I. Epidemiological processes, demography of cattle and approaches to control by culling." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **352**(1355): 781-801.
- Drieskens, S., P. Quataert, et al. (1997). "Age-period-cohort model: trends in mortality from lung cancer in women, Belgium 1971-1990." *Archives of Public Health* **55**: 99-117.
- Ducrot, C., D. Abrial, et al. (2005). "A spatio-temporal analysis of BSE cases born before and after the reinforced feed ban in France." *Veterinary Research* **36**: 839-53.
- Ducrot, C., M. Arnold, et al. (2008). "Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemics." *Veterinary Research* **39**(4): 15.
- Ducrot, C., C. La Bonnardière, et al. (2006). "Production laitière et risque ESB en France analyse à l'échelle des exploitations laitières." *Epidémiologie et Santé Animale*(49): 131-8.
- Ducrot, C., I. Quadrio, et al. (2009). Maladies à prion déterminisme génétique, voies de transmission et prévention. *Biofutur*. **302**: 26-9.
- Ducrot, C., P. Roy, et al. (2003). "How the surveillance system may bias the results of analytical epidemiological studies on BSE: prevalence among dairy versus beef suckler cattle breeds in France." *Veterinary Research* **34**: 185-92.
- Durrleman, S. and R. Simon (1989). "Flexible regression models with cubic splines." *Statistics in Medicine* **8**: 551-61.
- EFSA (2008). Scientific Opinion of the panel on biological hazards on the further consideration of age-related parameters on the risk for human and animal health related to the revision of the

- BSE Monitoring regime in some Member States. Question No EFSA-Q-2008-266-Adopted on 10 July 2008. Brussels, European Food Safety Authority: 8.
- Enjalbert, F. (1996). "Les farines de viandes : intérêts dans l'alimentation des ruminants et réglementation." Point Vétérinaire **28**(179): 689-95.
- ESST, A.-G. é. d. (2003). Questions relatives à un relèvement de l'âge minim des animaux testés à l'abattoir et à l'équarrissage. Actualisation de l'avis du 13/10/2003. Maisons-Alfort, AFSSA.
- Ferguson, N. M., C. A. Donnelly, et al. (1997). "The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. II. Model construction and analysis of transmission dynamics." Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological sciences **352**: 803-38.
- Ferguson, N. M., C. A. Donnelly, et al. (1997). "A Genetic interpretation of heightened risk of BSE in offspring of affected dams." Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences **264**: 1445-55.
- Fienberg, S. and W. Mason (1979). "Identification and estimation of age-period-cohort models in the analysis of discrete archival data." Sociological Methodology **10**: 1-67.
- Frost, W. H. (1939). "The age selection of mortality from tuberculosis in successive decades." American Journal of Epidemiology **30-Section A**: 91-6.
- Fu, W. (2008). "A smoothing cohort model in age-period-cohort analysis with applications to homicide arrest rates and lung cancer mortality rates." Sociological Methods and Research **36**(3): 327-61.
- Goldmann, W. (2008). "PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies." Veterinary Research **39**(4): 30.
- Gore, S., W. Gilks, et al. (1997). "BSE maternal cohort study: exploratory analysis." Applied Statistics **46**: 305-20.
- Grassi, J., E. Comoy, et al. (2001). "Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue." Veterinary Record **149**(19): 577-82.
- Grassi, J., S. Mailliet, et al. (2008). "Progress and limits of TSE diagnostic tools." Veterinary Research **39**(4): 33.
- Green, P. J. and B. W. Silverman (2000). Nonparametric regression and generalized linear models - A roughness penalty approach. London, Chapman and Hall/Crc.
- Greenland, S. (1995). "Avoiding power loss associated with categorization and ordinal scores in dose-response and trend analysis." Epidemiology **6**(4): 450-4.
- Greenland, S. (1995). "Dose-response and trend analysis in epidemiology: alternatives to categorical analysis." Epidemiology **6**(4): 356-65.
- Griffin, J. M., J. D. Collins, et al. (1997). "Bovine spongiform encephalopathy in the Republic of Ireland: epidemiological observations 1989-1996." Irish Veterinary Journal **50**(10): 593-600.
- Griffith, J. S. (1967). "Self-replication and Scrapie." Nature **215**: 1043-4.
- Haase, B., M. G. Doherr, et al. (2007). "PRNP promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle." BMC Genetics **8**: 15.
- Harrel, F. (2008). "Problems caused by categorizing continuous variables." Retrieved 26/02/2009, from <http://biostat.mc.vanderbilt.edu/wiki/bin/view/Main/CatContinuous>.
- Hastie, T. and R. Tibshirani (1990). Generalized additive models. London, Chapman and Hall.
- Heres, L., D. J. Brus, et al. (2008). "Spatial analysis of BSE cases in the Netherlands." BMC Veterinary Research **4**: 21.
- Heres, L., A. R. Elbers, et al. (2007). "Identification of the characteristics and risk factors of the BSE epidemic in the Netherlands." Risk Analysis **27**(5): 1119-29.
- Heuer, C. (1997). "Modeling of time trends and interactions in vital rates using restricted regression splines." Biometrics **53**(1): 161-77.
- Hill, W. G. (2005). Review of the evidence for the occurrence of 'BARB' BSE cases in cattle, DEFRA: 32.
- Hoinville, L. (1993). "Clinical signs of reported cases of BSE and their analysis to aid in diagnosis." Cattle Practice **1**: 59-61.

- Hoinville, L. J. (1994). "Decline in the incidence of BSE in cattle born after the introduction of the "feed ban"." Veterinary Record **134**: 274-5.
- Hoinville, L. J., J. W. Wilesmith, et al. (1995). "An investigation of risk factors for cases of bovine spongiform encephalopathy born after the introduction of the feed ban." Veterinary Record **136**: 312-8.
- Holford, T. R. (1983). "The Estimation of Age, Period and Cohort Effects for Vital Rates." Biometrics **39**(2): 311-24.
- Holford, T. R. (1991). "Understanding the effects of age, period, and cohort on incidence and mortality rates." Annual Reviews of Public Health **12**: 425-57.
- Holford, T. R. (1992). "Analysing the temporal effects of age, period and cohort." Statistical Methods in Medical Research **1**(3): 317-37.
- Holford, T. R., K. A. Cronin, et al. (2006). "Changing Patterns in Breast Cancer Incidence Trends." Journal of the National Cancer Institute Monographs(36): 19-25.
- Hörnlimann, B. and U. Braun (1994). Bovine spongiform encephalopathy (BSE): clinical signs in Swiss BSE cases. Consultation on BSE with the scientific Committee of the European Communities, 14-15 september 1993, Bruxelles (Belgique).
- Jarrige, N., C. Ducrot, et al. (2007). "Case-control study on feed risk factors for BSE cases born after the feed ban in France." Veterinary Research **38**(3): 505-16.
- Juling, K., H. Schwarzenbacher, et al. (2006). "A major genetic component of BSE susceptibility." BMC Biology **4**: 33.
- Kupper, L. L., J. M. Janis, et al. (1985). "Statistical Age-Period-Cohort Analysis: A Review and Critique." Journal of Chronic Diseases **38**(10): 811-30.
- Kupper, L. L., J. M. Janis, et al. (1985). "Age-period-cohort analysis: an illustration of the problems in assessing interaction in one observation per cell data." Communications in Statistics. Theory and Methods **12**: 2779-807.
- La Bonnardière, C., B. Bonaiti, et al. (2007). "Milk yield, age at first calving, and the risk of BSE: An analysis at the farm level in France." Preventive Veterinary Medicine **78**: 67-78.
- La Bonnardière, C., D. Calavas, et al. (2004). "Estimating the trend of the French BSE epidemic over six birth cohorts through the analysis of the abattoir screening in 2001 and 2002." Veterinary Research **35**: 299-308.
- Lacroux, C. and O. Andréoletti (2009). Pathogénèse des maladies à prion. Biofutur. **302**: 40-3.
- Latarjet, R. and B. Muel (1970). "Inactivation of the Scrapie Agent by Near Monochromatic Ultraviolet Light." Nature **227**: 1341-3.
- Laude, H. and V. Beringue (2009). Diversité des prions et transmission interspèce. Biofutur. **302**: 35-9.
- Lee, W. C. and R. S. Lin (1996). "Autoregressive age-period-cohort models." Statistics in Medicine **15**(3): 273-81.
- Leitenstorfer, F. and G. Tutz (2007). "Knot selection by boosting techniques." Computational Statistics and Data Analysis **51**: 4605-21.
- Lombardi, G., C. Casalone, et al. (2008). "Intraspecies transmission of BASE induces clinical dullness and amyotrophic changes." PLoS Pathogens **4**(5): e1000075.
- Maltaverne, E. (2009). Exploration d'une hypothèse de différence de sensibilité des tests de diagnostic rapide de l'encéphalopathie spongiforme bovine en France. Lyon, AFSSA: 51.
- Manuelidis, L. (2004). "A virus behind the mask of prions?" Folia Neuropathologica **42 Suppl B**: 10-23.
- McCullagh, P. and J. A. Nelder (1999). Generalized linear models. London, Chapman and Hall/Crc.
- Molinari, N., J.-F. Durand, et al. (2004). "Bounded optimal knots for regression splines." Computational Statistics and Data Analysis **45**: 159-78.
- Morignat, E. and D. Calavas (2007). Analyse des facteurs associés aux résultats faux positifs dans le cadre de la surveillance de l'ESB. Rapport d'analyse statistique. Demande d'AST n° 2007/SA0225. Lyon, AFSSA: 24.

- Morignat, E., C. Ducrot, et al. (2004). "Prevalence of BSE in cattle found dead euthanased or emergency slaughtered on farms in western France in 2000 - 2001 and 2002." Veterinary Record **155**: 481-6.
- Moynagh, J. and H. Schimmel (1999). "Tests for BSE evaluated." Nature **400**: 105.
- Moynagh, J., H. Schimmel, et al. (2002). The evaluation of five rapid tests for the diagnostic of transmissible spongiform encephalopathy in bovines (2nd study). Brussels, European Commission.
- Moynagh, J., H. Schimmel, et al. (1999). The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. Brussels, European Commission.
- Note de service DGAL/SDSPA/SDSSA/N2008-8321 (2008). Surveillance des encéphalopathies spongiformes, Direction Générale de l'Alimentation.
- Oesch, B., D. Westaway, et al. (1985). "A Cellular Gene Encodes Scrapie PrP 27-30 Protein." Cell **40**(4): 735-46.
- Ohtaki, M., D.-K. Kim, et al. (1990). "A nonparametric method for estimating interaction effect of age and period on mortality." Environmental Health Perspectives **87**: 115-21.
- Oppenheim Mason, K., W. M. Mason, et al. (1973). "Some methodological issues in cohort analysis of archival data." American Sociological Review **38**: 242-58.
- Osborne, M., B. Presnell, et al. (1998). "Knot selection for regression splines via the LASSO." Computing Science and Statistics **30**: 44-9.
- Osmond, C. and M. J. Gardner (1982). "Age, period and cohort models applied to cancer mortality rates." Statistics in Medicine **1**(3): 245-59.
- Osmond, C. and M. J. Gardner (1989). "Age, period, and cohort models. Non-overlapping cohorts don't resolve the identification problem." American Journal of Epidemiology **129**(1): 31-5.
- Partanen, J. (2003). "Genetic susceptibility to variant Creutzfeldt-Jakob disease." Lancet **361**(9356): 447-8.
- Paul, M., D. Abrial, et al. (2007). "Bovine Spongiform Encephalopathy and Spatial Analysis of the Feed Industry." Emerging Infectious Diseases: 1-20.
- Perez-Farinos, N., G. Lopez-Abente, et al. (2006). "Time trend and age-period-cohort effect on kidney cancer mortality in Europe, 1981-2000." BMC Public Health **6**: 119.
- Prusiner, S. B. (1982). "Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie." Science **216**: 136-44.
- Prusiner, S. B. (1993). "Genetic and Infectious Prion Diseases." Archives of Neurology **50**(11): 1129-53.
- Prusiner, S. B. (1999). Development of the prion concept. Prion Biology and Diseases. S. B. Prusiner. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 67-112.
- Prusiner, S. B., D. C. Bolton, et al. (1982). "Further Purification and Characterization of Scrapie Prions." Biochemistry **21**(26): 6942-50.
- Prusiner, S. B., D. F. Groth, et al. (1984). "Purification and structural studies of a major scrapie prion protein." Cell **38**: 127-34.
- Robertson, C. and P. Boyle (1986). "Age, period and cohort models: the use of individual records." Statistics in Medicine **5**: 527-38.
- Robertson, C. and P. Boyle (1998). "Age-period-cohort models of chronic disease rates. II: Graphical approaches." Statistics in Medicine **17**(12): 1325-39.
- Rodgers, W. L. (1982). "Estimable functions of age, period, and cohort effects." American Sociological Review **47**: 774-87.
- Royston, P. (2000). "Choice of scale for cubic smoothing spline models in medical applications." Statistics in Medicine **19**: 1191-205.
- Royston, P. (2000). "A strategy for modelling the effect of a continuous covariate in medicine and epidemiology." Statistics in Medicine **19**: 1831-47.
- Royston, P. and D. Altman (1994). "Regression using fractionnal polynomials of continuous covariates: parsimonious parametric modelling." Applied Statistics **43**(3): 429-67.

- Royston, P., D. G. Altman, et al. (2006). "Dichotomizing continuous predictors in multiple regression: a bad idea." Statistics in Medicine **25**(1): 127-41.
- Royston, P., G. Ambler, et al. (1999). "The use of fractional polynomials to models continuous risk variables in epidemiology." International Journal of Epidemiology **28**: 964-74.
- Royston, P. and W. Sauerbrei (2007). "Improving the robustness of fractional polynomial models by preliminary covariate transformation: a pragmatic approach." Computational Statistics and Data Analysis **51**: 4240-53.
- Ru, G., C. Maurella, et al. (2007). "Epidemiological study of the decline of BSE in Italy." Veterinary Record **161**(15): 511-4.
- Saa, P., J. Castilla, et al. (2006). "Presymptomatic Detection of Prions in Blood." Science **313**(5783): 92-4.
- Saa, P., J. Castilla, et al. (2006). "Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification." Journal of Biological Chemistry **281**(46): 35245-52.
- Saegerman, C., L. Claes, et al. (2003). "Differential diagnosis of neurologically expressed disorders in Western European cattle." Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties **22**(1): 83-102.
- Saegerman, C., N. Speybroeck, et al. (2006). "Trends in age at detection in cases of bovine spongiform encephalopathy in Belgium: an indicator of the epidemic curve." Veterinary Record **159**(18): 583-7.
- Sala, C., E. Morignat, et al. (2006). Seasonality of exposure of cattle to BSE in France. Prion 2006, Strategies, advances and trends towards protection of society, Torino, Italy. 3-6 october.
- Sauerbrei, W., C. Meier-Hirmer, et al. (2006). "Multivariable regression model building by using fractional polynomials: description of SAS, STATA and R programs." Computational Statistics and Data Analysis **50**(12): 3464-85.
- Savey, M., P. Belli, et al. (1991). "Le réseau d'épidémiologie de la BSE en France : principes — premiers résultats." Epidémiologie et Santé Animale **19**: 49-61.
- Schmid, V. J. and L. Held (2007). "Bayesian age-period-cohort modeling and prediction-BAMP." Journal of Statistical Software **21**(8).
- Schwermer, H., M. Doherr, et al. (2003). Space-time clustering of Swiss Bovine Spongiform Encephalopathy. Xème ISVEE Viva del Mar Chile le 17-21 novembre 2003.
- Schwermer, H., K. Forster, et al. (2007). "BSE, feed and cattle in Switzerland: is there a spatial relation?" Veterinary Research **38**(3): 409-18.
- Schwermer, H. and D. Heim (2007). "Cases of bovine spongiform encephalopathy born in Switzerland before and after the ban on the use of bovine specified risk material in feed." Veterinary Record **160**(3): 73-7.
- Sheridan, H. A., G. McGrath, et al. (2005). "A temporal-spatial analysis of bovine spongiform encephalopathy in Irish cattle herds, from 1996 to 2000." Canadian Journal of Veterinary Research **69**(1): 19-25.
- St Rose, S. G., N. Hunter, et al. (2006). "Comparative evidence for a link between Peyer's patch development and susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies." BMC Infectious Diseases **6**: 5.
- Supervie, V. and D. Costagliola (2004). "The unrecognised French BSE epidemic." Veterinary Research **35**(3): 349-62.
- Supervie, V. and D. Costagliola (2006). "How was the French BSE epidemic underestimated?" Comptes Rendus Biologies **329**(2): 106-16.
- Supervie, V. and D. Costagliola (2007). "BSE risk assessment as a basis for updating French screening policy." Risk Analysis **27**(5): 1131-40.
- Supervie, V. and D. Costagliola (2007). "Estimating incidence of the French BSE infection using a joint analysis of both asymptomatic and clinical BSE surveillance data." Mathematical Biosciences **209**(1): 90-107.
- Vandeschrick, C. (2001). "The Lexis diagram, a misnomer." Demographic Research **4**: 97-124.

- Vandeschrick, C. (2003). Diagrammes de Lexis et cohortes : la taille ou le poids en remplacement du temps. Louvain-la-Neuve, Université catholique de Louvain Département des Sciences de la Population et du Développement: 52.
- Venables, W. N. and B. D. Ripley (2002). Modern Applied Statistics with S. New York, Springer.
- Wahba, G. (1990). Spline models for observational data. Philadelphia, US, Society for Industrial and applied mathematics.
- Weissmann, C. (1991). "A "unified theory" of prion propagation." Nature **352**: 679-83.
- Weissmann, C. and E. Flechsig (2003). "PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research." British Medical Bulletin **66**: 43-60.
- Wells, G. A., S. A. Hawkins, et al. (1998). "Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update." Veterinary Record **142**(5): 103-6.
- Wells, G. A. H., T. Konold, et al. (2007). "Bovine spongiform encephalopathy: the effect of oral exposure dose on attack rate and incubation period in cattle." Journal of General Virology **88**(Pt 4): 1363-73.
- Wells, G. A. H., A. C. Scott, et al. (1987). "A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle." Veterinary Record **121**: 419-20.
- Wells, G. A. H. and M. M. Simmons (1996). The essential lesion profile of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle is unaffected by breed or route of infection, Blackwell Science Ltd.
- Wells, G. A. H., J. Spiropoulos, et al. (2005). "Pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy: preclinical infectivity in tonsil and observations on the distribution of lingual tonsil in slaughtered cattle." Veterinary Record **156**(13): 401-7.
- Wijeratne, W. V. S. and R. N. Curnow (1990). "A study of the inheritance of susceptibility to bovine spongiform encephalopathy." Veterinary Record **126**: 5-8.
- Wilesmith, J.-W. (1991). "The epidemiology of bovine spongiform encephalopathy." Seminars in Virology **2**: 239-45.
- Wilesmith, J. W., J. B. M. Ryan, et al. (1991). "Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin." Veterinary Record **128**: 199-203.
- Wilesmith, J. W., J. B. M. Ryan, et al. (1992). "Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates." Research in Veterinary Science **52**: 325-31.
- Wilesmith, J. W., J. B. M. Ryan, et al. (2000). "Temporal aspects of the epidemic of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain: holding-associated risk factors for the disease." Veterinary Record **147**: 319-25.
- Wilesmith, J. W., A. H. Wells, et al. (1997). "A cohort study to examine maternally-associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy." Veterinary Record **141**(10): 239-43.
- Wilesmith, J. W., G. A. H. Wells, et al. (1988). "Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies." Veterinary Record **123**: 638-44.
- Will, R. G., J. W. Ironside, et al. (1996). "A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK." Lancet **347**(9006): 921-5.
- Winship, C. and D. J. Harding (2004). A General Strategy for the Identification of Age, Period, Cohort Models: A Mechanism Based Approach, Harvard Université: 40.
- Yang, Y. (2006). "Age/period/cohort distinctions." Encyclopedia of Health and Aging. from <http://t-shirtness.com/people/yang/Yang1.pdf>.
- Yang, Y. (2006). "Bayesian inference for hierarchical age-period-cohort models of repeated cross-section survey data." Sociological Methodology **36**: 39-74.
- Yang, Y., J. Fu, et al. (2004). "A methodological comparison of age-period-cohort models: the intrinsic estimator and conventional generalized linear models." Sociological Methodology **34**: 75-110.

Yang, Y., S. Schulhofer-Wohl, et al. (2007). "The intrinsic estimator for age-period-cohort analysis: what it is and how to use it." *American Journal of Sociology*. from http://www.princeton.edu/~sschulho/files/YSFL_apcie.pdf.

Annexes

Annexe I - Script de la simulation sous R

Définition des constantes

Eléments des fonctions

```
AGEMAX <- 30
LARGEURCLASSES <- 0.5
BORNESCLASSES <- seq(0, AGEMAX, by = LARGEURCLASSES)
NCLASSES <- AGEMAX / LARGEURCLASSES
MILIEUCLASSES <- (BORNESCLASSES[1:NCLASSES] + BORNESCLASSES[2:(NCLASSES + 1)]) / 2
AGEINF <- c(0.856, 0.093, 0.051)
TAILLECOHORTE <- 7500000
Y0 <- 1985
```

Profils d'infections

```
Ninf1 <- rep(12000, 16)
Ninf4 <- c(281, 361, 464, 595, 765, 982, 1262, 1620, 2081, 2673, 3433, 4410, 5664, 7274, 9343, 12001)
Ninf5 <- c(12000, 9343, 7274, 5663, 4409, 3433, 2673, 2081, 1620, 1261, 982, 765, 595, 464, 361, 281)
Ninf6 <- c(281, 719, 1893, 4802, 12000, 4111, 1740, 736, 311, 132, 56, 24, 10, 3, 2, 1)
Ninf8 <- c(281, 719, 1893, 4802, 12000, 4111, 1740, 941, 1692, 3987, 3600, 1200, 230, 104, 65, 15)
```

Valeurs des graines

```
seedn1 <- 1:100
seedn4 <- 301:400
seedn5 <- 401:500
seedn6 <- 501:600
seedn6bis <- c(501:568, 570:600)
seedn8 <- 701:800

GAMMA <- c(22.5, 25, 27, 29.5, 32, 34.5, 37.5, 40.5, 44, 47.5, 51, 55, 60, 65, 70, 76)
```


Définition des fonctions

Période d'incubation

```
distrib.incubation <- fonction(u, g1 = 0.8, g2 = 65, g3 = 0.845) {
  K <- g1 / gamma(g3)
  L <- (g2 * exp(-g1 * u))**g3
  M <- exp(-g2 * exp(-g1 * u))
  return(K * L * M)
}
INCUBATION <- sapply(MILIEUCLASSES, distrib.incubation) * LARGEURCLASSES
```

Survie conditionnelle (animaux infectés)

```
survie <- fonction(age)
{
  res <- rep(0, length(age))
  res[age < 2] <- -0.2733 * age[age < 2] + 1
  res[age >= 2] <- 0.7961 * exp(-0.2815 * age[age >= 2])
  return(res)
}
SURVIE <- 1 - survie(1:AGEMAX)
SURVIE <- SURVIE - c(0, SURVIE[1:(AGEMAX - 1)])
SURVIE <- SURVIE / sum(SURVIE)

survie.conditionnelle <- fonction(ageinf)
{
  res <- rep(0, length(ageinf))
  res[ageinf >= 2] <- ageinf[ageinf >= 2] + rexp(sum(ageinf >= 2), 0.2815)
  a <- ageinf[ageinf < 2]
  r <- res[ageinf < 2]
  p1 <- survie(a) - survie(2)
  p2 <- 1 - survie(2)
  p1 <- p1 / (p1 + p2)
  p2 <- p2 / (p1 + p2)
  q <- runif(length(p1)) <= p1
  r[!q] <- 2 + rexp(sum(!q), 0.2815)
  r[q] <- a[q]
  res[ageinf < 2] <- r
  res[res > 30] <- 30
  return(res)
}
```

Survie de la population

```
survie.pop <- fonction(n)
{
  res <- NULL
  for (i in 1:length(SURVIE)) {
    x <- rbinom(1, n, SURVIE[i] / sum(SURVIE[i:length(SURVIE)]))
    res <- c(res, x)
    n <- n - x
  }
  return(res)
}
```

Simulation des données sans variation de la durée d'incubation

```

sim.pop <- function(Ninf, seed )
{
  set.seed(seed)
  animaux <- NULL
  for (i in 1:length(Ninf))
  {
    y <- Y0 + i - 1
    n <- Ninf[i]
    ageinf <- sample(0:2, n, prob = AGEINF, replace = T)
    cohorte <- y - ageinf
    incubation <- sample(MILIEUCLASSES, n, replace = T, prob=INCUBATION)
    ageinf[ageinf == 0] <- 0.75
    ageinf[ageinf == 1] <- sample(c(1.25, 1.75), sum(ageinf == 1), replace = T)
    ageinf[ageinf == 2] <- sample(c(2.25, 2.75), sum(ageinf == 2), replace = T)
    agecli <- ageinf + incubation
    surviecond <- survie.conditionnelle(ageinf)
    agedetection <- rep(0, length(agecli))
    i <- surviecond > agecli
    agedetection[i] <- agecli[i]
    i <- (surviecond > agecli - 0.5) & (surviecond <= agecli)
    agedetection[i] <- surviecond[i]
    agedetection[surviecond < 2] <- -1
    anneeest <- rep(NA, length(ageinf))
    i <- agedetection == 0
    anneeest[i] <- cohorte[i] + floor(surviecond[i])
    i <- agedetection > 0
    anneeest[i] <- cohorte[i] + floor(agedetection[i])
    animaux <-
      rbind(animaux, cbind(anneeinf = rep(y, length(ageinf)),
                          cohorte = cohorte, ageinf = ageinf,
                          surviecond = surviecond,
                          agedetection = agedetection,
                          anneeest = anneeest))
  }
  detectes <- animaux[animaux[, 'agedetection'] > 0,]
  data <-
    aggregate(1:dim(detectes)[1],
              by = list(cohorte = detectes[, 'cohorte'],
                        age = floor(detectes[, 'agedetection']),
                        periode = detectes[, 'anneest']),
              FUN = length)
  pop <- NULL
  for (y in (Y0 - AGEMAX):(Y0 + AGEMAX))
  pop <- rbind(pop,
               cbind(rep(y, AGEMAX), 1:AGEMAX - 1, survie.pop(TAILLECOHORTE)))
  pop <- cbind(pop, pop[, 1] + pop[, 2])
  colnames(pop) <- c('cohorte', 'age', 'testes', 'periode')
  pop <- pop[pop[, 'periode'] %in% c(Y0 :(Y0 + AGEMAX-1)),]
  pop <- pop[pop[, 'age'] > 1,]
  pop <- as.data.frame(pop)
  rownames(pop) <- paste(pop$cohorte, pop$age, pop$periode)
  rownames(data) <- paste(data$cohorte, data$age, data$periode)
  pop <- cbind(pop, cas = data[rownames(pop), 'x'])
  pop[is.na(pop$cas), 'cas'] <- 0
  rownames(pop) <- NULL
  return (pop)
}

```

Simulation des données avec variation de la durée d'incubation

```

VPIsim.pop <- fonction(Ninf, seed )
{
  set.seed(seed)
  animaux <- NULL
  for (i in 1:length(Ninf))
  {
    y <- Y0 + i - 1
    n <- Ninf[i]
    g2 <- GAMMA[i]
    ageinf <- sample(0:2, n, prob = AGEINF, replace = T)
    cohorte <- y - ageinf
    distr.incubation <- fonction(u,g2=GAMMA[i])
    {
      K <- 0.8 / gamma(0.845)
      L <- (g2 * exp(-0.8 * u))**0.845
      M <- exp(-g2 * exp(-0.8 * u))
      return(K * L * M)
    }
    INCUBATION <- sapply(MILIEUCLASSES, distr.incubation) * LARGEURCLASSES
    incubation <- sample(MILIEUCLASSES, n, replace = T, prob=INCUBATION)
    ageinf[ageinf == 0] <- 0.75
    ageinf[ageinf == 1] <- sample(c(1.25, 1.75), sum(ageinf == 1), replace = T)
    ageinf[ageinf == 2] <- sample(c(2.25, 2.75), sum(ageinf == 2), replace = T)
    agecli <- ageinf + incubation
    surviecond <- survie.conditionnelle(ageinf)
    agedetection <- rep(0, length(agecli))
    i <- surviecond > agecli
    agedetection[i] <- agecli[i]
    i <- (surviecond > agecli - 0.5) & (surviecond <= agecli)
    agedetection[i] <- surviecond[i]
    agedetection[surviecond < 2] <- -1
    anneeest <- rep(NA, length(ageinf))
    i <- agedetection == 0
    anneeest[i] <- cohorte[i] + floor(surviecond[i])
    i <- agedetection > 0
    anneeest[i] <- cohorte[i] + floor(agedetection[i])
    animaux <-
      rbind(animaux, cbind(anneeinf = rep(y, length(ageinf)),
        cohorte = cohorte, ageinf = ageinf,
        surviecond = surviecond,
        agedetection = agedetection,
        anneeest = anneeest))
  }
  detectes <- animaux[animaux[, 'agedetection'] > 0,]
  data <-
    aggregate(1:dim(detectes)[1],
      by = list(cohorte = detectes[, 'cohorte'],
        age = floor(detectes[, 'agedetection']),
        periode = detectes[, 'anneetest']),
      FUN = length)
  pop <- NULL
  for (y in (Y0 - AGEMAX):(Y0 + AGEMAX))
  pop <- rbind(pop,
    cbind(rep(y, AGEMAX), 1:AGEMAX - 1, survie.pop(TAILLECOHORTE)))
  pop <- cbind(pop, pop[, 1] + pop[, 2])
  colnames(pop) <- c('cohorte', 'age', 'testes', 'periode')
  pop <- pop[pop[, 'periode'] %in% c(Y0 :(Y0 + AGEMAX-1)),]
  pop <- pop[pop[, 'age'] > 1,]
  pop <- as.data.frame(pop)

```

```
rownames(pop) <- paste(pop$cohort, pop$age, pop$periode)
rownames(data) <- paste(data$cohort, data$age, data$periode)
```

```
pop <- cbind(pop, cas = data[rownames(pop), 'x'])
pop[is.na(pop$cas), 'cas'] <- 0
rownames(pop) <- NULL
```

```
return (pop)
```

```
}
```

Annexe II - Proportion d'analyses dans lesquelles un effet période (modèles AP ou APC) a été détecté avec et sans variation de la durée d'incubation de l'ESB. Résultats détaillés

a.1) Réduction à gauche de la période 1985-2014, profils 1,2 et 3

Période d'observation	bornes	durée	Profil 1 (constant)										Profil 2 (exponentiel décroissant)										Profil 3 (exponentiel croissant)													
			Durée d'incubation					Durée d'incubation					Durée d'incubation					Durée d'incubation					Durée d'incubation													
			stable					croissante					stable					croissante					stable					croissante								
A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP							
1985-2014	30	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	28	0	72	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1986-2014	29	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	21	0	79	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1987-2014	28	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	18	0	82	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1988-2014	27	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	17	0	83	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1989-2014	26	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	18	0	82	0	0	0	0	100	0	0	16	0	84	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1990-2014	25	0	0	24	0	76	0	0	0	0	100	0	0	18	0	82	0	0	0	0	100	0	0	97	0	3	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1991-2014	24	0	0	45	0	55	0	0	0	0	100	0	0	17	0	83	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1992-2014	23	0	0	51	0	49	0	0	0	0	100	0	0	15	0	85	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1993-2014	22	0	0	49	0	51	0	0	0	0	100	0	0	14	0	86	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1994-2014	21	0	0	52	0	48	0	0	0	0	100	0	0	10	0	90	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1995-2014	20	0	0	49	0	51	0	0	0	0	100	0	0	10	0	90	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	5	0	95	
1996-2014	19	0	0	45	0	55	0	0	0	0	100	0	0	7	0	93	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	32	0	68	
1997-2014	18	0	0	46	0	54	0	0	0	0	100	0	0	7	0	93	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	69	0	31	
1998-2014	17	0	0	44	0	56	0	0	0	0	100	0	0	6	0	94	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	88	0	12	
1999-2014	16	0	0	41	0	59	0	0	0	0	100	0	0	7	0	93	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	93	0	7	
2000-2014	15	0	0	40	0	60	0	0	1	0	99	0	0	6	0	94	0	0	11	0	89	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	99	0	1	
2001-2014	14	0	0	42	0	58	0	0	21	0	79	0	0	6	0	94	0	0	57	0	43	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	
2002-2014	13	0	0	48	0	52	0	0	80	0	20	0	0	9	0	91	0	0	83	0	17	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	
2003-2014	12	0	0	57	0	43	0	0	93	0	7	0	0	21	0	79	0	0	87	0	13	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	
2004-2014	11	0	0	74	0	26	0	0	93	0	7	0	0	55	0	45	0	0	89	0	11	0	1	99	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	
2005-2014	10	0	0	91	0	9	0	0	94	0	6	0	0	92	0	8	0	0	91	0	9	0	33	66	0	1	0	22	77	1	1	0	0	0	0	
2006-2014	9	0	0	99	0	1	0	0	99	0	1	0	0	99	0	1	0	0	99	0	1	0	98	2	0	0	0	92	6	1	1	1	0	0	0	0
2007-2014	8	0	0	100	0	0	0	0	99	0	1	0	0	99	0	1	0	0	98	0	2	0	99	0	1	0	0	97	0	1	2	0	0	0	0	0
2008-2014	7	0	0	99	0	1	0	0	99	0	1	0	0	98	0	2	0	0	98	0	2	0	99	0	1	0	1	96	0	3	0	0	0	0	0	0
Nombre de modèles		0	0	1096	0	1304	0	0	679	0	1721	0	0	698	0	1702	0	0	713	0	1687	0	330	1580	2	488	1	307	869	6	1217	0	0	0	0	0
% de modèle par profil		0	0	45,7	0	54,3	0	0	28,3	0	71,7	0	0	29,1	0	70,9	0	0	29,7	0	70,3	0	13,8	65,8	0,08	20,3	0,04	12,8	36,2	0,25	50,7	0	0	0	0	0

a.2) Réduction à gauche de la période 1985-2014, profils 4 et 5

Période d'observation	bornes	durée	Profil 4 (unimodal) Durée d'incubation										Profil 5 (bimodal) Durée d'incubation									
			stable					croissante					stable					croissante				
			A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP
1985-2014	30	0	0	2	0	98	0	0	98	0	2	0	0	2	0	98	0	0	0	0	100	
1986-2014	29	0	0	1	0	99	0	0	98	0	2	0	0	1	0	99	0	0	0	0	100	
1987-2014	28	0	0	1	0	99	0	0	97	0	3	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1988-2014	27	0	0	1	0	99	0	0	96	0	4	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1989-2014	26	0	0	1	0	99	0	0	96	0	4	0	0	1	0	99	0	0	0	0	100	
1990-2014	25	0	0	1	0	99	0	0	96	0	4	0	0	2	0	98	0	0	0	0	100	
1991-2014	24	0	0	1	0	99	0	0	98	0	2	0	0	2	0	98	0	0	0	0	100	
1992-2014	23	0	0	12	0	88	0	0	99	0	1	0	0	12	0	88	0	0	0	0	100	
1993-2014	22	0	0	87	0	13	0	0	100	0	0	0	0	65	0	35	0	0	0	0	100	
1994-2014	21	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	94	0	6	0	0	0	0	100	
1995-2014	20	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	97	0	3	0	0	41	0	59	
1996-2014	19	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	96	0	4	0	0	99	0	1	
1997-2014	18	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	97	0	3	0	0	100	0	0	
1998-2014	17	0	4	96	0	0	0	74	26	0	0	0	0	97	0	3	0	0	100	0	0	
1999-2014	16	0	94	6	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	0	1	0	0	100	0	0	
2000-2014	15	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	
2001-2014	14	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	
2002-2014	13	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	
2003-2014	12	0	100	0	0	0	1	99	0	0	0	0	22	78	0	0	0	54	46	0	0	
2004-2014	11	12	88	0	0	0	25	75	0	0	0	0	97	3	0	0	0	100	0	0	0	
2005-2014	10	60	40	0	0	0	70	30	0	0	0	0	100	0	0	0	0	99	0	0	1	
2006-2014	9	91	9	0	0	0	92	8	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	
2007-2014	8	99	1	0	0	0	100	0	0	0	0	3	97	0	0	0	3	97	0	0	0	
2008-2014	7	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	40	60	0	0	0	44	56	0	0	0	
Nombre de modèles		362	636	609	0	793	388	686	1304	0	22	43	476	1046	0	835	47	506	786	0	1061	
% de modèle par profil		15,1	26,5	25,4	0	33	16,2	28,6	54,3	0	0,9	1,79	19,8	43,6	0	34,8	1,96	21,1	32,8	0	44,2	

b.1) Extension à droite de la période 1985-1991, profils 1, 2 et 3

Période d'observation	bornes	durée	Profil 1 (constant)										Profil 2 (exponentiel décroissant)										Profil 3 (exponentiel croissant)									
			Durée d'incubation stable					Durée d'incubation croissante					Durée d'incubation stable					Durée d'incubation croissante					Durée d'incubation stable					Durée d'incubation croissante				
			A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP
1985-1991	7	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	88	0	12	0	0	1	79	18	2	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-1992	8	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	28	3	67	2	0	0	97	0	3	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-1993	9	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	4	30	62	4	0	0	98	0	2	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-1994	10	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	72	24	4	0	0	93	0	7	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-1995	11	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	96	1	3	0	0	81	0	19	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-1996	12	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	97	0	3	0	0	58	0	42	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-1997	13	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	98	0	2	0	0	29	0	71	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-1998	14	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	98	0	2	0	0	2	0	98	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-1999	15	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	98	0	2	0	0	1	0	99	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2000	16	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	99	0	1	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2001	17	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	99	0	1	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2002	18	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	99	0	1	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2003	19	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	99	0	1	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2004	20	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	99	0	1	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2005	21	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	99	0	1	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2006	22	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	96	0	4	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2007	23	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	76	0	24	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2008	24	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	43	0	57	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2009	25	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	30	0	70	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2010	26	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	26	0	74	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2011	27	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	26	0	74	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2012	28	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	22	0	78	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2013	29	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	27	0	73	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
1985-2014	30	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	28	0	72	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	
Nombre de modèles		0	0	0	0	2400	0	0	0	0	2400	0	120	1560	166	554	0	1	538	18	1843	0	0	0	0	2400	0	0	0	0	2400	
% de modèle par profil		0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	5	65	6,92	23,1	0	0,04	22,4	0,75	76,8	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	

b.2) Extension à droite de la période 1985-1991, profils 4 et 5

Période d'observation		Profil 4 (unimodal) Durée d'incubation										Profil 5 (bimodal) Durée d'incubation									
		stable					croissante					stable					croissante				
bornes	durée	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP	A	AD	AC	AP	ACP
1985- 1991	7	0	96	0	4	0	0	29	6	65	0	0	97	0	3	0	0	22	9	68	1
1985- 1992	8	0	79	0	20	1	0	0	98	1	1	0	79	0	20	1	0	0	95	1	4
1985- 1993	9	0	27	12	60	1	0	0	97	0	3	0	19	12	68	1	0	0	96	0	4
1985- 1994	10	0	0	98	0	2	0	0	99	0	1	0	0	96	0	4	0	0	96	0	4
1985- 1995	11	0	0	57	0	43	0	0	90	0	10	0	0	64	0	36	0	0	92	0	8
1985- 1996	12	0	0	4	0	96	0	0	75	0	25	0	0	6	0	94	0	0	76	0	24
1985- 1997	13	0	0	1	0	99	0	0	69	0	31	0	0	0	0	100	0	0	75	0	25
1985- 1998	14	0	0	1	0	99	0	0	66	0	34	0	0	0	0	100	0	0	22	0	78
1985- 1999	15	0	0	0	0	100	0	0	69	0	31	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2000	16	0	0	0	0	100	0	0	71	0	29	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2001	17	0	0	0	0	100	0	0	78	0	22	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2002	18	0	0	0	0	100	0	0	75	0	25	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2003	19	0	0	0	0	100	0	0	78	0	22	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2004	20	0	0	1	0	99	0	0	80	0	20	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2005	21	0	0	1	0	99	0	0	79	0	21	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2006	22	0	0	1	0	99	0	0	81	0	19	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2007	23	0	0	1	0	99	0	0	84	0	16	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2008	24	0	0	1	0	99	0	0	87	0	13	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2009	25	0	0	1	0	99	0	0	91	0	9	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2010	26	0	0	1	0	99	0	0	95	0	5	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2011	27	0	0	1	0	99	0	0	96	0	4	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2012	28	0	0	1	0	99	0	0	97	0	3	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100
1985- 2013	29	0	0	1	0	99	0	0	99	0	1	0	0	1	0	99	0	0	0	0	100
1985- 2014	30	0	0	2	0	98	0	0	98	0	2	0	0	2	0	98	0	0	0	0	100
Nombre de modèles		0	202	185	84	1929	0	29	1958	66	347	0	195	181	91	1933	0	22	561	69	1748
% de modèle par profil		0	8,42	7,71	3,5	80,4	0	1,21	81,6	2,75	14,5	0	8,13	7,54	3,79	80,5	0	0,92	23,4	2,88	72,8

Annexe III - Texte de la présentation orale de l'AEEMA

**CONTRIBUTION DU MODELE AGE-PERIODE-COHORTE A L'ETUDE
DE L'ENCEPHALOPATHIE SPONGIFORME BOVINE EN FRANCE :
EVOLUTION DE LA PREVALENCE AU COURS
DE LA PERIODE 2001-2007 ***

Carole Sala ¹, Eric Morignat ¹ et Didier Calavas ¹

RESUME

L'objectif du modèle Age-Période-Cohorte (APC) est d'attribuer à l'âge des individus, la cohorte de naissance et la période d'observation, leurs effets respectifs sur l'évolution temporelle d'une mesure ou d'un phénomène. Cependant, du fait de la relation linéaire qui lie la période, l'âge et la cohorte, l'ajustement du modèle pose problème dès lors que les trois variables sont présentes simultanément dans le modèle. En l'absence d'hypothèses quant aux effets spécifiques des variables, le modèle s'avère incapable de distinguer les effets propres de chaque facteur.

Dans le cadre de notre étude, l'utilisation des données issues de la surveillance exhaustive de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) permet de formuler les contraintes nécessaires à l'identification du modèle APC. L'approche Age-Période-Cohorte se révèle alors une méthode pertinente pour étudier l'évolution de la prévalence de l'ESB en France. De plus, elle permet d'aborder l'évolution de la maladie dans son contexte réglementaire et est une ouverture à l'étude d'autres variables après ajustement sur les trois principaux facteurs affectant la prévalence de l'ESB, que sont l'âge des animaux au moment du dépistage, leur cohorte de naissance et la période d'observation dans laquelle on se place.

Mots-Clés : ESB, épidémiologie, diagramme de Lexis, modèle Age-Période-Cohorte, régression logistique.

SUMMARY

The aim of the Age-Period-Cohort (APC) model is to identify the specific effect of age, birth cohort and period on the temporal trend of a measure or phenomenon. However, due to the linear relationship linking the three variables, the model does not fit when the age, the cohort and the period are included simultaneously in the model. Without supplementary hypotheses on the specific effect of the variables the model cannot attribute to each factor its respective effect.

In our study, when using the data of the exhaustive surveillance of the BSE, we can formulate hypotheses to constrain certain parameters and identify the model. Then, the APC model is a pertinent method to study the trend of the BSE prevalence and to address the evolution of the disease in relation with the successive control measures adopted in France. Moreover, the model allows to study other variables after adjusting on the main risk factors of the BSE that are the age at diagnosis, the birth cohort of the animals and the observation period.

Keywords : BSE, epidemiology, Lexis diagram, Age-Period-Cohort model, logistic regression.

* Texte de la conférence orale présentée lors des Journées AEEMA, 22-23 mai 2008

¹ AFSSA-Lyon, Unité Epidémiologie, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon Cedex 07, France

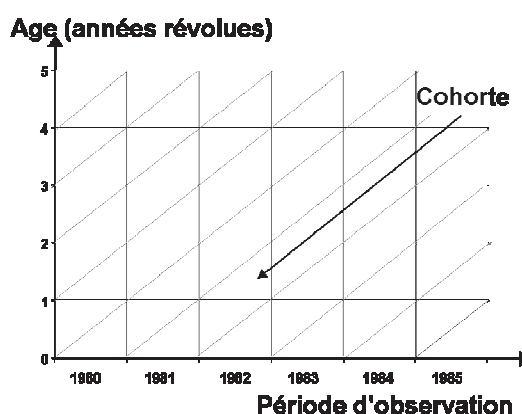
I - INTRODUCTION

Le modèle Age-Période-Cohorte permet d'étudier l'évolution au cours du temps d'un phénomène ou d'une mesure à travers les effets temporels de la cohorte (effet de génération) et de la période d'observation, ajustés sur l'âge des individus au moment de l'évènement d'intérêt.

Le modèle Age-Période-Cohorte a été initialement développé comme outil d'interprétation du diagramme dit « de Lexis ». Ce diagramme, créé à la fin du 19^{ème} siècle par des démographes soucieux de présenter de manière synthétique les

données de population, permet de visualiser selon deux axes, trois dimensions interdépendantes du temps que sont l'âge des individus, leur cohorte de naissance et la période d'observation [Vandeschrick, 2001; Carstensen *et al.*, 2005]. Dans le diagramme de Lexis « classique », la présentation des données se fait selon deux axes, l'âge des individus étant porté en ordonnées et la période d'observation en abscisses. La cohorte est alors déduite des deux variables précédentes à partir de la relation : période = âge + cohorte et est retrouvée dans la diagonale (Figure 1).

Figure 1
Diagramme de Lexis « âge-période »



Ce diagramme initialement créé pour un usage démographique est devenu, dès le début du 20^{ème} siècle, un outil courant de présentation des données épidémiologiques, notamment en cancérologie où l'âge des individus, leur cohorte de naissance et le moment d'observation sont des facteurs importants à prendre en compte dans les études de prévalence et d'incidence. Les données, nombre d'évènements et population de référence, y sont présentées regroupées par classe d'âge, cohorte et période d'observation de même pas de temps, classiquement 1 ou 5 ans, parfois 10 ans, en fonction des données disponibles. Le modèle Age-Période-Cohorte permet alors, à partir de ces données groupées, d'attribuer aux variables âge, période et cohorte, leurs effets respectifs sur l'occurrence de l'évènement.

Cependant, du fait de la colinéarité des variables ($\text{Période} = \text{Age} + \text{Cohorte}$), l'ajustement du modèle pose problème lorsque les trois variables sont présentes simultanément dans le modèle : il y a trop de paramètres à estimer dans

le modèle par rapport à l'information disponible et le modèle n'est, de ce fait, pas identifiable. On peut tenter de réduire le nombre de paramètres à estimer en choisissant un niveau de référence (paramètre égalisé à 0) pour chaque variable, mais cette méthode classique ne suffit pas à résoudre le problème de sur-paramétrisation du modèle. Il est nécessaire de contraindre un paramètre de plus à une valeur définie, généralement 0. Cependant, on obtient autant de jeux de paramètres différents qui ajustent bien les données que de contraintes différentes et le problème du choix du bon modèle se pose alors [Kupper *et al.*, 1985]. Une autre solution consiste à s'intéresser à la partie du modèle qui n'est pas influencée par les contraintes imposées aux paramètres mais qui dépend seulement du jeu de données et est, de ce fait, estimable sans biais [Holford, 1983; 1985; Clayton *et al.*, 1987]. En décomposant l'effet de chaque variable en une partie linéaire (drift) et une partie non-linéaire (courbure), on montre que la somme des pentes de deux des variables ainsi que la partie non-

linéaire de chaque variable sont constantes pour un même jeu de données. Cependant, la partie non-linéaire est difficilement interprétable et la somme des pentes (effet global de deux des variables) ne permet pas d'accéder à l'effet propre de chacune des variables.

Malgré les nombreux travaux menés sur le sujet, le problème de la non-identification du modèle Age-Période-Cohorte demeure non encore résolu. Cependant, avec des connaissances *a priori* sur le sujet, il est possible de faire un choix raisonné

des contraintes à appliquer au modèle pour le rendre identifiable et de sélectionner un « bon » modèle, en minimisant les biais induits par les contraintes. Nous verrons ainsi comment, en utilisant les données de surveillance de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) disponibles depuis juillet 2001, le modèle Age-Période-Cohorte peut être adapté à l'étude de l'évolution de la prévalence de l'ESB en France.

II - MATERIEL ET METHODE

1. LE SYSTEME DE SURVEILLANCE FRANÇAIS DE L'ESB

En France, l'ESB a fait l'objet, dès 1990, d'une surveillance de type passif, fondée sur la suspicion clinique des animaux sur le terrain [Savey *et al.*, 1991]. A partir de 1999, le développement et la mise sur le marché de tests de dépistage dits rapides, utilisables à grande échelle, ont permis d'accroître considérablement l'effort de surveillance [Grassi *et al.*, 2001]. A la suite des résultats des programmes pilotes mis en place dans des populations de bovins identifiés comme « à risque » [Morignat *et al.*, 2004], la surveillance de l'ESB a été renforcée et à partir de janvier 2001 un dépistage systématique des bovins de plus de 30 mois a été mis en place à l'abattoir. Cette surveillance a été étendue à l'équarrissage en juillet 2001 et l'âge du dépistage a été abaissé à 24 mois en juillet 2001 avant d'être à nouveau modifié en juillet 2004 à 30 mois, de sorte qu'à partir de juillet 2001 on peut considérer que tous les bovins de plus de 30 mois morts en ferme ou abattus pour la consommation humaine ont été soumis à un dépistage pour l'ESB.

Ainsi, depuis 1990, environ 20 millions d'animaux ont été testés et un millier de cas a été détecté.

2. DONNEES ET HYPOTHESES

Les données de l'étude sont issues des trois programmes de surveillance en place depuis le 1^{er} juillet 2001, date à partir de laquelle la surveillance de l'ESB peut être considérée comme exhaustive en France.

La prévalence de l'ESB en fonction de l'âge des animaux étant comparable dans les différents plans de surveillance [Supervie *et al.*, 2005], les

données de la surveillance clinique, du programme abattoir et du programme équarrissage ont été regroupées. En effet, la plupart des cas détectés à l'équarrissage étaient probablement en phase clinique de la maladie [Cazeau *et al.*, 2004] et la sensibilité des tests de dépistage ne permettant pas de détecter des animaux plus de trois mois avant l'apparition des symptômes, on peut raisonnablement estimer que les cas d'ESB détectés à l'abattoir étaient en fin de période d'incubation de la maladie [Grassi *et al.*, 2001; Grassi *et al.*, 2008].

Seuls les animaux dépistés entre le 1^{er} juillet 2001 et le 31 décembre 2007 ont été inclus dans l'analyse. Les animaux dont la date de naissance et/ou la date de prélèvement étaient manquantes ou erronées, les animaux de moins de 30 mois (2,5 ans) ainsi que les bovins importés ont été exclus de l'analyse.

Les cas d'ESB atypique ont également été exclus de l'étude. Il est en effet très probable que l'ESB atypique a une épidémiologie différente de celle de l'ESB classique [Biacabe *et al.*, 2004; Beringue *et al.*, 2006; Biacabe *et al.*, 2007; Capobianco *et al.*, 2007].

Ainsi, 17 247 651 animaux négatifs et 633 cas d'ESB ont été inclus dans l'étude.

En vue de l'analyse, les animaux ont été regroupés en classes d'âge de 1 an, l'âge étant pris en compte en années révolues. Cet âge est l'âge des animaux au moment du diagnostic et correspond, dans le cas de l'ESB, à l'âge des animaux à la contamination auquel s'ajoute la durée d'incubation de la maladie. Du fait d'une période d'incubation stable, autour de 6 ans [Supervie *et al.*, 2004; Supervie *et al.*, 2006; Supervie *et al.*, 2007] et d'un âge à la contamination probablement très précoce (moins

de 12 mois pour la majorité des cas) [Arnold *et al.*, 2004; Supervie *et al.*, 2004; Supervie *et al.*, 2006], la prévalence de l'ESB est fortement liée à l'âge des animaux testés et cette variable est donc impérativement présente dans le modèle où elle doit être entrée en premier.

La cohorte de naissance est également une variable importante à prendre en compte dans l'étude de la prévalence de l'ESB. Dans le modèle Age-Période-Cohorte, l'effet de la cohorte traduit tous les événements qui affectent de la même manière tous les individus d'une même cohorte, indépendamment de leur âge et de la période d'observation, dans l'idée que les individus d'une même cohorte sont globalement exposés de la même manière, mais que toutes les cohortes ne sont pas exposées au même risque. Dans le cas de l'ESB, du fait d'une contamination alimentaire des animaux et des différentes mesures réglementaires prises à son encontre dans le but de diminuer l'exposition des animaux à la maladie, les cohortes de naissance n'ont pas été exposées de la même manière à l'ESB [Ferguson *et al.*, 2003; Mornat *et al.*, 2004; Supervie *et al.*, 2007]. Afin de prendre en compte cette variable, les animaux ont été regroupés en cohortes de naissance, définies en fonction de la saison de vêlage qui s'étend, en France, de juillet à juin. Ainsi, une cohorte de naissance regroupe les animaux nés du 1^{er} juillet de l'année x au 30 juin de l'année $x+1$. 34 cohortes de naissances ont été créées de 1970 (juillet 1970-juin 1971) à 2004 (juillet 2004-juin 2005).

Enfin, les animaux ont été regroupés en huit périodes d'observation, de 1999 à 2007, obtenues à partir de la relation linéaire Période = Age + Cohorte. Ces périodes sont en fait chevauchantes et correspondent à des pas de temps du double de ceux de l'âge et de la cohorte et sont donc peu précises. Dans le cas de l'ESB, la période d'observation traduit essentiellement les évolutions des méthodes diagnostiques et des plans de surveillance de l'ESB en France depuis 1990, variations qui affectent de la même manière toutes les cohortes de naissances concernées au temps d'observation t . Or, dans le cadre de notre étude, nous nous sommes placés au début du dépistage exhaustif des animaux de plus de 30 mois et depuis juillet 2001 le système de surveillance de l'ESB n'a pas varié en France. De plus, la sensibilité des tests de diagnostic rapide a probablement peu évolué depuis 2001. On attend donc un effet peu marqué, si ce n'est nul, de la

période d'observation sur l'évolution de prévalence de l'ESB entre juillet 2001 et décembre 2007. Les contraintes nécessaires à l'identification du modèle seront ainsi appliquées sur les paramètres de la période d'observation.

3. ANALYSE

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel R-2.6.2 [R Development Core Team, 2008] et en ajustant le modèle de régression logistique ci-dessous :

$$\log\left(\frac{p_{apc}}{1-p_{apc}}\right) = p_0 + \alpha_a(\text{âge}) + \beta_p(\text{période}) + \gamma_c(\text{cohorte}) + \varepsilon_{apc}$$

où p_{apc} est la prévalence attendue dans le groupe d'âge a , de cohorte c et de période p , ε_{apc} est l'erreur aléatoire et p_0 correspond au log de l'odds du groupe de référence.

Les groupes de référence ont été choisis comme ceux ayant la prévalence brute la plus élevée : le groupe « 6 ans » pour l'âge, la cohorte de naissance 1994 (juillet 1994-juin 1995) et la période d'observation 2001 (juillet 2001- juin 2002).

Suivant les recommandations de la littérature [Clayton *et al.*, 1987], cinq modèles ont été ajustés (modèle âge, modèle âge-drift, modèle âge-période, modèle âge-cohorte et modèle âge-cohorte-période). Du fait que l'on attend un effet période beaucoup moins important que l'effet cohorte de naissance, la période d'observation a été la dernière variable entrée dans le modèle complet (modèle âge-cohorte-période).

Les paramètres des modèles ont été estimés par la méthode du maximum de vraisemblance.

La sélection des modèles a été faite selon une procédure ascendante sur la base du test du rapport de vraisemblance. L'adéquation des modèles a été testée par l'examen des déviations résiduelles des modèles, lesquelles suivent une loi du chi-deux à x degrés de liberté (ddl), x correspondant au nombre de ddl du modèle considéré [McCullagh *et al.*, 1999].

Le modèle complet a été ajusté en imposant une contrainte supplémentaire à la variable période d'observation par égalisation de l'effet des périodes 2001 et 2002 à 0.

III - RESULTATS

La comparaison de l'ajustement des modèles est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1
Comparaison de l'ajustement des modèles

n°	Modèle	Déviante résiduelle	Nb ddl	p ¹	Comparaison avec le modèle n°	Différence de déviance	Différence de ddl	p ²
0	Nul	1925,3	241					
1	Age	958,36	210	0,000	0	966,94	31	0,000
2	Age-Drift	372,19	209	0,000	1	586,17	1	0,000
3a	Age-Période	341,88	202	0,000	2	30,31	7	0,000
3b	Age-Cohorte	96,94	176	1	2	275,25	33	0,000
4	Age-Cohorte-Période	73,60	169	1	3a	23,34	7	0,002

¹ test d'adéquation du modèle

² test du rapport de vraisemblance – pour chaque ligne, p est le résultat du test comparant le modèle décrit sur cette ligne avec le modèle dont le numéro est précisé dans la colonne 6 du tableau.

Sur la base du test d'adéquation, le modèle âge-cohorte ajuste déjà correctement les données, mais la variable période permet une amélioration significative du modèle ($p=0,002$). Nous retiendrons donc finalement le modèle âge-cohorte-période.

Les Odds Ratios (OR) ainsi que leurs intervalles de confiance (IC) à 95% ont été calculés à partir des résultats du modèle complet.

L'examen des OR ajustés (tirets noirs) et de leurs IC (tirets gris) de la figure 2 montre que les animaux âgés de 5 et 6 ans présentent le risque d'être détectés positifs vis-à-vis de l'ESB (dénommé risque ESB ci-après) le plus élevé tandis que les animaux de 4 ans, ainsi que ceux de 7 ans à 14 ans ont un risque significativement inférieur. Il n'est pas possible de conclure pour les animaux de 2 et 3 ans ni pour les animaux de 15 ans et plus, du fait du faible nombre d'animaux

testés et/ou du peu, voir de l'absence de cas ESB dans ces catégories d'âge.

Les animaux nés de juillet 1993 à juin 1995 sont les animaux les plus exposés au risque ESB, risque qui diminue pour les animaux nés à partir de juillet 1995 (Figure 3). Les animaux nés de juillet 1990 à juin 1993 ont également un risque inférieur et il n'est pas possible de conclure pour les animaux nés avant juillet 1990 et au-delà de juin 2000, trop peu d'animaux ayant été testés dans ces cohortes.

Concernant la période d'observation, si celle-ci améliore l'ajustement du modèle aux données, les OR ne sont pas significativement différents de 1 (Figure 4), hormis pour la période 2000 (juillet 2000-juin 2001).

Figure 2
Evolution du risque ESB en fonction de l'âge des animaux au dépistage.

Age de référence : 6 ans.
 Les valeurs nulles ainsi que les IC très larges ne sont pas représentés.

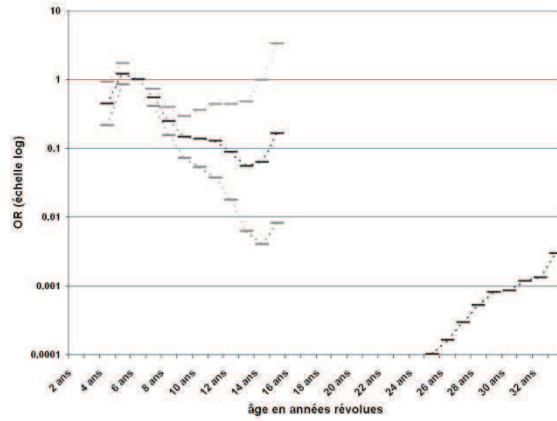


Figure 3
Evolution du risque ESB en fonction de la cohorte de naissance des animaux.

Cohorte de référence : cohorte 1993.
 Les valeurs nulles ainsi que les IC très larges ne sont pas représentés.

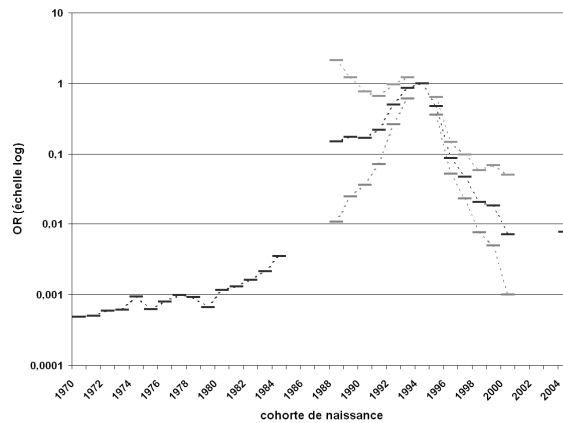
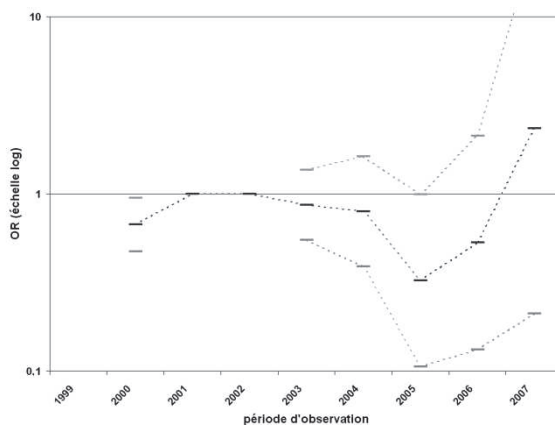


Figure 4
Evolution du risque ESB en fonction de la période d'observation.
 Période de référence : 2002.



IV - DISCUSSION

1. ORGANISATION DES DONNEES ET CONTRAINTES IMPOSEES AUX PARAMETRES DU MODELE

Dans le cadre de notre étude, nous ne disposons que des données de la population testée et non des données de la population générale. De ce fait, la prévalence de l'ESB et son incidence dans la population bovine française n'étaient pas accessibles par la méthode utilisée. Le modèle Age-Période-Cohorte a donc permis ici, d'étudier l'évolution de la prévalence de l'ESB à la mort à travers les effets propres de chaque facteur d'ajustement : âge des animaux, cohorte de naissance et période d'observation.

Dans le diagramme de Lexis et dans l'analyse Age-Période-Cohorte, il est important de conserver la relation linéaire entre les variables (période = âge + cohorte) et la cohorte de naissance est traditionnellement calculée à partir de la période et de l'âge. Or, lorsqu'une variable est ainsi calculée, la largeur de ses classes est du double de celles qui ont servi à son calcul et ses classes se chevauchent. Ceci est un phénomène inévitable lié à la méthode de regroupement des données. Le chevauchement des classes de la variable calculée entraîne une imprécision quant à son effet exact sur la variable d'intérêt. Dans le cadre de notre étude et au regard de l'épidémiologie de l'ESB, il est nécessaire d'avoir une bonne précision sur la cohorte de naissance, dont on veut estimer l'effet en tant qu'indicateur de l'exposition de la population bovine, et de manière corollaire en tant qu'indicateur de l'efficacité des mesures de contrôle de cette exposition. Il a donc été choisi de calculer la période d'observation.

Les contraintes appliquées aux paramètres pour rendre le modèle identifiable ont été définies afin de minimiser leur influence sur les résultats. Les groupes de référence (groupes avec la prévalence brute la plus forte) ont été choisis de sorte à avoir des intervalles de confiance les plus petits possibles. Le choix d'appliquer une contrainte supplémentaire sur un paramètre de la période a été guidé par les hypothèses que l'on avait sur la période d'observation. La méthode employée pour rendre le modèle identifiable, en fixant l'effet de la période à 0 sur deux pas de temps consécutifs, est l'une de celles qui permettent d'imposer au modèle les contraintes les plus faibles [Carstensen *et al.*, 2005], et ainsi

de minimiser les biais induits sur les paramètres du modèle.

2. EFFET DE L'AGE

Les résultats du modèle montrent un risque ESB plus important chez les animaux âgés de 5 à presque 7 ans (groupes 5 et 6 ans en années révolues). Ces résultats sont en accord avec les précédentes études [Supervie *et al.*, 2006; Supervie *et al.*, 2007], qui estimaient la moyenne de la période d'incubation à 6 ans et l'âge à l'infection inférieur à 1 an [Arnold *et al.*, 2004; Supervie *et al.*, 2004; Supervie *et al.*, 2006]. Le modèle n'utilisant que l'information disponible, il n'est pas possible de conclure pour les groupes d'âge où trop peu de cas d'ESB ont été détectés.

3. EFFET DE LA COHORTE DE NAISSANCE

Le risque ESB varie en fonction des différentes cohortes de naissance. Les animaux nés de juillet 1993 à juin 1995 apparaissent les plus exposés au risque ESB, risque qui est inférieur pour les animaux nés de juillet 1990 à juin 1993 et qui diminue pour les animaux nés à partir de juillet 1995. Tout comme pour l'âge, il n'est pas possible de conclure pour les cohortes où aucun ou peu de cas ont été détectés ou pour lesquelles trop peu d'animaux ont été testés. Les résultats du modèle sont en accord avec les études précédentes qui concluent à une augmentation du risque ESB pour les animaux nés de juillet 1992 à juin 1995 et une décroissance du risque au-delà [La Bonnardière *et al.*, 2004; Mornat *et al.*, 2004; Supervie *et al.*, 2004; Supervie *et al.*, 2006].

Le modèle APC permet d'accéder à l'évolution du risque ESB dans les différentes cohortes de naissance tout en prenant en compte l'âge auquel les individus de ces cohortes ont été testés, point essentiel dans l'interprétation de l'évolution de la prévalence de l'ESB au cours du temps. La voie alimentaire est depuis longtemps admise comme la voie essentielle, si ce n'est unique, de contamination des animaux *via* la consommation de farine de viande et d'os (FVO). Afin de réduire l'exposition des animaux à l'agent de l'ESB, et donc la prévalence de la maladie, un certain nombre de mesures réglementaires ont été adoptées entre 1989 et 2000 aboutissant à une diminution de l'exposition des animaux à l'ESB.

Une étude plus fine de l'évolution du risque ESB des différentes cohortes de naissance des animaux pourrait permettre de mettre en relation les différentes mesures adoptées et leur impact sur l'évolution de la prévalence de l'ESB au cours du temps.

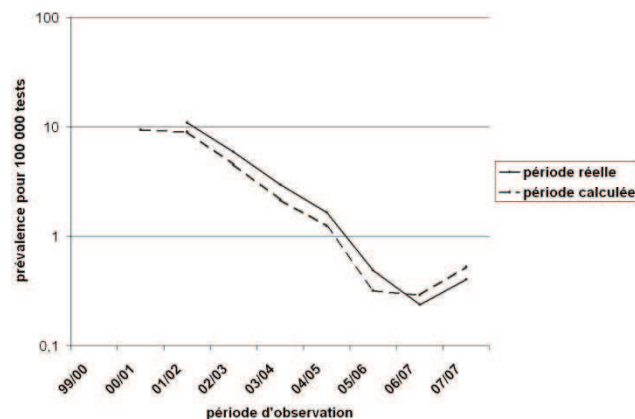
4. EFFET DE LA PERIODE D'OBSERVATION

En plaçant notre étude dans une période de temps où la surveillance de l'ESB en France a été exhaustive et au cours de laquelle aucune variation n'a pu être notée dans les plans de surveillance, nous n'attendions pas ou peu d'effet de la période d'observation sur l'évolution de la prévalence de l'ESB. Or, l'ajout de la période d'observation après ajustement sur l'âge des

animaux et la cohorte de naissance, améliore significativement le modèle, avec la période 2000 qui présente un OR significativement inférieur à la période de référence alors qu'aucune tendance linéaire n'est observable.

La période d'observation réelle, correspondant aux données incluses dans le modèle, s'étend de juillet 2001 à décembre 2007, mais la période calculée à partir de l'âge et de la cohorte, du fait du chevauchement de ses classes s'étend de 1999 à 2007. Il s'ensuit alors une répartition différente des cas d'ESB et des animaux testés selon que l'on considère la période réelle ou la période calculée. De ce fait, l'évolution de la prévalence de l'ESB est différente entre la période réelle et la période calculée, comme illustré sur la figure 5.

Figure 5
Comparaison de la prévalence de l'ESB en fonction de la période d'observation réelle versus la période d'observation calculée (échelle log)



L'effet période observé dans le modèle peut être simplement dû au fait que le calcul de la période perturbe la décroissance de la prévalence au cours du temps, créant artificiellement un effet non-linéaire dans le modèle, plus marqué que l'effet réel. Cependant, les tests de dépistage utilisés depuis juillet 2001 ont évolué [Grassi *et al.*, 2008] et les différents tests ont été utilisés de

manière variable dans le temps et selon les différents canaux de surveillance. En l'absence d'étude comparative sur la sensibilité de ces tests au regard de l'ESB, on ne peut exclure que les modalités d'utilisation des différents tests au cours de la période juillet 2001-décembre 2007 ne soient à l'origine de l'effet période observé.

V - CONCLUSION

Du fait de ses caractéristiques épidémiologiques - longue période d'incubation, diagnostic

uniquement post-mortem-, et d'une survie moyenne des bovins inférieure à l'âge à la

détection de la maladie, la prévalence de l'ESB et son évolution sont difficiles à évaluer et il est important de prendre en compte dans un même modèle l'âge des animaux au dépistage, leur cohorte de naissance et la période d'observation.

Quand même les données disponibles ne permettent d'accéder qu'à la prévalence à la mort de l'ESB, le modèle Age-Période-Cohorte se révèle un bon outil d'estimation des effets respectifs et ajustés de l'âge, la cohorte de naissance et la période d'observation. En estimant l'évolution du risque ESB en fonction de la cohorte de naissance des animaux, il devient possible de mettre en relation l'évolution de la prévalence de l'ESB, directement liée à l'évolution du risque ESB, et les mesures réglementaires mise en place au cours du temps.

Cependant, le modèle Age-Période-Cohorte peut, et doit être, également abordé comme une première étape vers l'exploration d'autres facteurs potentiels de variation de la prévalence de l'ESB. Le modèle Age-Période-Cohorte a permis ainsi de mettre en évidence une variation de l'exposition des animaux à l'ESB en fonction de leur période de naissance, en relation avec les pratiques alimentaires des éleveurs en France [Sala *et al.*, 2006].

Remerciements particuliers à Jean-Luc Vinard pour son aide précieuse à la gestion des bases de données.

BIBLIOGRAPHIE

- Arnold M.E., Wilesmith J.W. - Estimation of the age-dependent risk of infection to BSE of dairy cattle in Great Britain. *Prev. Vet. Med.*, 2004, **66**(1-4), 35-47.
- Beringue V., Bencsik A., Le Dur A., Reine F., Lai T.L., Chenais N., Tilly G., Biacabe A.G., Baron T., Vilotte J.L., Laude H. - Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy. *PLoS Path.*, 2006, **2**(10), e112.
- Biacabe A.G., Laplanche J.L., Ryder S., Baron T. - Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Reports*, 2004, **5**(1), 110-5.
- Biacabe A.G., Morignat E., Vulin J., Calavas D., Baron T. - Prevalence of H-type and L-type bovine spongiform encephalopathies in France, 2001-2007. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, **accepted**.
- Capobianco R., Casalone C., Suardi S., Mangieri M., Miccolo C., Limido L., Catania M., Rossi G., Di Fede G., Giaccone G., Bruzzone M.G., Minati L., Corona C., Acutis P., Gelmetti D., Lombardi G., Groschup M.H., Buschmann A., Zanusso G., Monaco S., Caramelli M., Tagliavini F. - Conversion of the BASE Prion Strain into the BSE Strain: The Origin of BSE? *PLoS Path.*, 2007, **3**(3), 1-31.
- Carstensen B., Keiding N. - Age-Period-Cohort models: statistical inference in the Lexis diagram. Copenhagen, 2005.
- Cazeau G., Ducrot C., Collin E., Desjouis G., Calavas D. - Questionnaire analysis of BSE cases in France detected by active surveillance and the reasons for non-notification. *Vet. Rec.*, 2004, **154**(5), 133-136.
- Clayton D., Schifflers E. - Models for temporal variation in cancer rates. II: Age-period-cohort models. *Stat. Med.*, 1987, **6**(4), 469-481.
- Ferguson N.M., Donnelly C.A. - Assessment of the risk posed by bovine spongiform encephalopathy in cattle in Great Britain and the impact of potential changes to current control measures. *Proceedings of the Royal Society of London Biological*, 2003, **270**, 1579-1584.
- Grassi J., Comoy E., Simon S., Créminon C., Frobert Y., Trapman S., Schimmel H., Hawkins S.A.C., Moynagh J., Deslys J.P., Wells G.A.H. - Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. *Vet. Rec.*, 2001, **149**(19), 577-582.
- Grassi J., Maillet S., Simon S., Morel N. - Progress and limits of TSE diagnostic tools. *Vet. Res.*, 2008, **39**(4), 33.

- Holford T.R. - The Estimation of Age, Period and Cohort Effects for Vital Rates. *Biometrics*, 1983, **39**(2), 311-324.
- Holford T.R. - An alternative approach to statistical age-period-cohort analysis. *J. Chronic Dis.*, 1985, **38**(10), 831-40.
- Kupper L.L., Janis J.M., Karmous A., Greenberg B.G. - Statistical Age-Period-Cohort Analysis: A Review and Critique. *J. Chronic Dis.*, 1985, **38**(10), 811-830.
- La Bonnardière C., Calavas D., Abrial D., Morignat E., Ducrot C. - Estimating the trend of the French BSE epidemic over six birth cohorts through the analysis of the abattoir screening in 2001 and 2002. *Vet. Res.*, 2004, **35**, 299-308.
- McCullagh P., Nelder J.-A. - Generalized linear models. 511 pages, Ed. Chapman and Hall/Crc, 1999.
- Morignat E., Ducrot C., Roy P., Cohen C., Calavas D. - Prevalence of BSE in cattle found dead euthanased or emergency slaughtered on farms in western France in 2000 - 2001 and 2002. *Vet. Rec.*, 2004, **155**, 481-486.
- R Development Core Team - R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R. Found Stat. Comput*, 2008.
- Sala C., Morignat E., Roy P., Ducrot C., Calavas D. - Seasonality of exposure of cattle to BSE in France. Prion 2006, Strategies, advances and trends towards protection of society, Torino, Italy, 2006.
- Savey M., Belli P., Coudert M. - Le réseau d'épidémiosurveillance de la BSE en France : principes — premiers résultats. *Epidemiol. et Santé Anim.*, 1991, **19**, 49-61.
- Supervie V., Costaglia D. - Modelling of the French BSE epidemic: use the screening test data. In 20th International workshop on Statistical Modelling Statistical Solutions to Modern Problems, Sydney-Australia, 2005.
- Supervie V., Costagliola D. - The unrecognised French BSE epidemic. *Vet Res*, 2004, **35**: 349-362.
- Supervie V., Costagliola D. - How was the French BSE epidemic underestimated? *Comptes Rendus Biologies*, 2006, **329**(2), 106-116.
- Supervie V., Costagliola D. - Estimating incidence of the French BSE infection using a joint analysis of both asymptomatic and clinical BSE surveillance data. *Math. Biosci*, 2007, **209**(1), 90-107.
- Vandeschrick C. - The Lexis diagram, a misnomer. *Demographic Res.*, 2001, **4**, 97-124.

RESUME

L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) est une maladie neuro-dégénérative fatale affectant les bovins ; elle est également une zoonose à l'origine du variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Identifiée pour la première fois au Royaume-Uni en 1986, cette maladie s'est rapidement étendue en Europe, malgré la mise en place de mesures de contrôle. En raison des particularités épidémiologiques de l'ESB (longue période d'incubation, âge précoce à l'infection et diagnostic post-mortem-possible uniquement en fin d'incubation), l'évolution temporelle de l'exposition des bovins à l'ESB ne peut être appréhendée qu'à partir de la modélisation. Nous avons utilisé le modèle Age-Période-Cohorte afin de (re)évaluer, en relation avec les principales mesures de contrôle, l'évolution de l'épizootie d'ESB à la lumière des données de surveillance les plus récentes, en France, et dans six autres pays européens : Allemagne, Irlande, Italie, Pays-Bas, Pologne et Royaume-Uni.

TITLE

Contribution of Age-Period-Cohort model to the study of Bovine spongiform encephalopathy in France and Europe

ABSTRACT

Bovine spongiform encephalopathy is a fatal neurodegenerative disease affecting cattle and transmissible to humans as the cause of variant Creutzfeldt-Jakob disease. BSE was first identified in 1986 in United Kingdom, before spreading to European countries despite the implementation of control measures. Due to BSE epidemiological characteristics (long incubation period, early age at infection and post-mortem diagnostic at end stage of incubation period), time trend of BSE cattle exposure can only be estimated by modeling. We used age-period-cohort model in order to (re)evaluate, in relation to the main control measures, the trend of BSE epidemic, using the most recent surveillance data in France and six other European countries: Germany, Ireland, Italy, the Netherlands, Poland and United Kingdom.

DISCIPLINE

Modélisation en épidémiologie

MOTS-CLES

Modélisation, épidémiologie, Encéphalopathie spongiforme bovine, modèle âge-période-cohorte, EST, zoonose, mesures de contrôle

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

AFSSA
Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
31 avenue Tony Garnier
69 364 Lyon cedex 07