

AVIS

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

relatif à la saisine sous-produits animaux concernant la mise en œuvre du retour au sol des résidus de digestion résultant de la conversion en biogaz de la glycérine dérivée de matières de catégorie 1 transformées conformément à la méthode de transformation 1 (stérilisation sous-pression)

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

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

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

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

Ses avis sont rendus publics.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a été saisie le 3 mars 2014 par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) pour la réalisation de l'expertise suivante : mise en œuvre du retour au sol des résidus de digestion résultant de la conversion en biogaz de la glycérine dérivée de matières de catégorie 1 transformées conformément à la méthode de transformation 1 (stérilisation sous-pression).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La demande du ministère s'inscrit dans le cadre réglementaire européen qui prévoit que les résidus de digestion issus de la conversion de la glycérine de catégorie 1 en biogaz puissent retourner au sol sur autorisation sanitaire. Ainsi, conformément au Règlement (UE) n° 294/2013, point 2) b) iii) de son annexe, l'application au sol du résidu de digestion résultant de la conversion en biogaz de cette glycérine requiert une autorisation de l'autorité compétente.

Le dossier soumis à la Direction générale de l'alimentation (DGAL) présente une analyse des dangers biologiques et chimiques du retour au sol du résidu de digestion issu de la production de biogaz à partir de la glycérine.

La glycérine considérée est un dérivé lipidique issu de la transformation de graisses fondues, conformément au procédé de production de biodiesel. Les graisses fondues sont issues de la transformation de sous-produits animaux de catégorie 1. Ces sous-produits animaux de catégorie 1 sont transformés conformément à la méthode de transformation 1 (stérilisation sous pression).

Le ministère demande à l'Anses d'évaluer le risque que pourrait représenter le retour au sol de ce résidu de digestion dérivé de sous-produits animaux de catégorie 1. Cette évaluation pourra être assortie, si nécessaire, de recommandations permettant de définir des éventuelles restrictions d'usage sur certains sols. Le ministère précise que le résidu de digestion concerné dans le cadre de cette saisine ne peut être considéré comme un engrais organique ou comme un amendement au titre de la réglementation relative aux sous-produits animaux. Seul son retour au sol selon un plan d'épandage pourra être autorisé et cet usage sera limité au territoire national.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

Par ailleurs, cette saisine s'inscrit dans le cadre réglementaire européen :

- Règlement (CE) n° 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le règlement (CE) n° 1774/2002 (règlement relatif aux sous-produits animaux) ;
- Règlement (UE) n° 142/2011 portant application du Règlement (CE) n° 1069/2009 ;
- Règlement (UE) n° 294/2013.

L'expertise a été conduite collectivement par les unités d'évaluation de la Direction des produits réglementés concernées, avec la collaboration d'experts du Comité d'Experts Spécialisé « Matières Fertilisantes et Supports de Culture » (CES MFSC).

Au regard de l'utilisation de sous-produits animaux de catégorie 1, un expert du groupe de travail EST¹ (GT-EST) a également été nommé, en lien avec le risque de transmission d'agents infectieux d'EST.

Les questions relatives aux effets potentiels sur la santé des hommes, des animaux et sur l'environnement du retour au sol des résidus de digestion issus de la conversion de la glycérine de catégorie 1 en biogaz ont été instruites sur la base des éléments communiqués dans le dossier technique.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Aucun conflit d'intérêts n'a été identifié par l'Agence dans le cadre de la présente saisine.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Matières fertilisantes et supports de culture", réuni le 6 novembre 2014, en présence de l'expert du GT-EST, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet l'avis suivant.

3. ANALYSE DU DOSSIER TECHNIQUE ET CONCLUSIONS

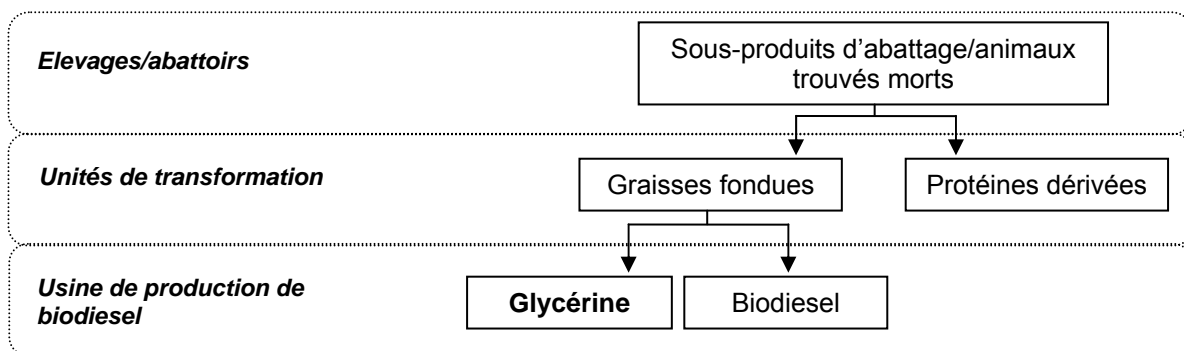
Le dossier technique présente les caractéristiques relatives aux teneurs en contaminants environnementaux (ETM², HAP³ et PCB⁴) des matières premières (graisses fondues à l'origine de la glycérine), des produits entrant (notamment la glycérine) et sortant (le résidu de digestion appelé

¹ EST = Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles

digestat), le procédé de fabrication du biodiesel, ainsi que des éléments techniques relatifs à l'identification des dangers biologiques et techniques liés au retour au sol du digestat.

■ Description du procédé de fabrication de la glycérine

Une description générale de la chaîne industrielle d'obtention de la glycérine, co-produit de la production de biodiesel à partir de graisses fondues issues de sous-produits animaux de catégorie 1, est présentée (voir schéma ci-dessous).



Les matières premières pour l'obtention de la glycérine sont décrites et sont composées de graisses fondues issues de sous produit d'animaux, d'huiles de cuisson usagées, de méthanol, d'acides et de potasse.

La glycérine est produite exclusivement dans une usine de production de biocarburant (biodiesel) localisée au Havre (9000 tonnes produites par an). La glycérine brute est composée à 70% de glycérine et contient 0,5% de méthanol, 20% d'eau, 5% de sels, 5% de matières organiques non identifiées ainsi que des impuretés issues des matières premières.

Des recherches de contaminants dans la glycérine et les graisses fondues ont été réalisées conformément à la directive 2002/32/CE (ETM, HAP, PCB, pesticides). Les résultats de ces analyses ne montrent pas de contamination.

■ Description du procédé de fabrication du digestat

La glycérine produite est transportée (camions citernes dédiés) dans quatre sites de transformation situés en Loire-Atlantique, Vendée et Essonne, chargés de convertir la glycérine en biogaz. Elle ne représente qu'une partie de l'ensemble des effluents et déchets traités sur les sites de méthanisation concernés (sous-produits animaux de catégorie 2 et 3). Le taux maximum d'incorporation de la glycérine envisagé est de 10% des intrants des unités de méthanisation portant à 16800 tonnes par an la capacité de traitement des 4 sites envisagés. Ce taux est cohérent avec les résultats scientifiques répertoriés dans la littérature scientifique concernant les limites de faisabilité en termes de co-digestion.

Les matières premières pour l'obtention du digestat et du biogaz ne sont pas complètement décrites. En effet, il est précisé que la glycérine est mélangée avec d'autres sous-produits d'animaux et de déchets de table. La composition et l'origine de ces derniers ne sont pas précisées.

Il n'est pas prévu de traitement préalable d'hygiénisation de la glycérine issue de sous-produits de catégorie 1 avant méthanisation.

Par ailleurs, il est précisé que la glycérine est transportée dans les mêmes camions que ceux utilisés pour transporter les sous-produits d'animaux pour l'obtention du biodiesel. Aussi, une contamination de la glycérine ne peut être exclue.

² ETM = Eléments Traces Métalliques
³ HAP = Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
⁴ PCB = PolyChloroBiphényles

Les étapes du procédé mis en œuvre pour l'obtention du digestat ne sont pas détaillées. Notamment, aucune information relative au couple temps/température de digestion anaérobie n'est indiquée.

■ **Matières premières, chaîne industrielle et risque prion**

Effet du procédé de production de biodiesel

Dans son avis du 2 juin 2004 sur le procédé de production de biodiesel, évalué ici en tant que méthode de transformation de dérivés lipidiques de sous-produits animaux de catégorie 1, transformés au préalable conformément à la méthode n° 1, l'EFSA⁵ a conclu à l'innocuité, au regard du risque d'EST, de la glycérine obtenue après production de biodiesel à partir de graisses transformées selon la méthode n° 1 visée à l'annexe IV, chapitre III, du règlement (CE) n° 142/2011. Une revue de la bibliographie, postérieure à la date de cet avis de l'EFSA, a été réalisée afin de prendre en compte d'éventuelles données nouvelles.

La méthode n° 1 visée à l'annexe IV, chapitre III, du règlement (CE) n° 142/2011 est un traitement (non stérilisant) permettant, selon l'EFSA, un abattement du titre infectieux de 2 à 7 log selon la souche d'ATNC⁶ considérée et, en moyenne, de l'ordre de 3 log. Dans son rapport de 2004, l'EFSA considère que chaque étape du processus de production de biodiesel (trans-estérification et hydrolyses) apporte également une réduction du titre infectieux d'au moins trois logs. L'EFSA considère par conséquent que le biodiesel, ainsi que les produits dérivés (donc la glycérine) obtenus au terme de ce procédé ne présentent pas de risque lié aux prions. Cependant, l'EFSA précise que « les cinétiques de réduction des prions ne sont pas maîtrisées à l'heure actuelle et il est par conséquent nécessaire de se demander si ces réductions observées à chaque étape du procédé peuvent être additionnées ».

Par ailleurs, compte tenu de la toxicité du biodiesel, les bio-essais permettant d'évaluer l'efficacité sur l'infectiosité prion n'avaient pas pu être réalisés et l'évaluation s'était basée uniquement sur des données biochimiques portant sur la mise en évidence de la protéine prion pathologique (PrP). L'infectiosité des agents des EST a été associée historiquement à la fraction de la PrP insoluble et résistante à la dégradation par les protéases (dénommée PrPres, Bolton *et al.*, 1982). Cependant, de nombreuses évidences expérimentales suggèrent aujourd'hui qu'une fraction substantielle des particules infectieuses n'est pas associée à la PrPres détectable (Lasmézas *et al.*, 1997 ; Barron *et al.*, 2007 ; Tixador *et al.*, 2010). Ainsi, la disparition des signaux associés à la PrPres ne permet pas de conclure à une diminution corrélée et systématique du pouvoir infectieux. Une publication postérieure à l'avis de l'EFSA sur l'efficacité de ce procédé de production de biodiesel met ainsi en évidence la génération d'agrégats de PrPres dans la glycérine obtenue après estérification (Seidel *et al.*, 2006), dont les conséquences en termes d'infectiosité sont inconnues.

Dans le cadre de la présente saisine, la méthode n° 1 peut être appliquée sur les sous-produits animaux de catégorie 1, mais également sur les graisses obtenues après dégraissage de ces sous-produits animaux de catégorie 1. Des travaux, postérieurs au règlement (CE) n° 1774/2002, démontrent une efficacité moindre de l'inactivation thermique des prions dans un milieu comportant majoritairement (90 à 100%) des graisses, et plus particulièrement lorsqu'il s'agit de glycérine (Müller *et al.*, 2007). Aussi, une valeur basse de l'inactivation apportée par ce traitement doit être retenue si elle est appliquée directement sur les graisses, à l'instar des 3 log retenus par le comité scientifique directeur européen (2003) et par l'EFSA (2004) dans leurs rapports consacrés à l'évaluation de l'inactivation des ATNC apportée par cette méthode de production du biodiesel.

En 2008, une nouvelle étude des procédés de fabrication de biodiesel présente des bio-essais qui n'ont pas mis en évidence d'infectiosité au niveau du biodiesel et de la glycérine obtenus (Bruederle *et al.*, 2008). Cependant, il convient de noter que ces études, réalisées dans le modèle d'infection expérimentale du hamster par la souche 263K, ont été arrêtées au bout de 200 jours d'incubation, alors que plusieurs publications décrivent, dans ce modèle mais également dans d'autres, des durées d'incubation supérieures lorsque des phénomènes d'agrégation sont générés

⁵ EFSA = Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

⁶ ATNC = Agents Transmissibles Non Conventionnels

par des procédés physiques ou chimiques, vraisemblablement en liaison avec une modification de la biodisponibilité de la charge infectieuse résiduelle (Fichet et al., 2004 ; Fernie et al., 2007).

En revanche, cette étude met en évidence une infectiosité résiduelle (6 log de réduction par rapport à la charge infectieuse initiale) au niveau des résidus de matières premières non convertis en biodiesel. Ces travaux ne peuvent pas être directement transposés à la situation analysée ici, puisque le procédé présente, d'une part, des paramètres de temps et de température différents et, d'autre part, qu'il est appliqué sur des sous-produits animaux bruts et non sur de la graisse extraite. Néanmoins, ils posent la question de l'innocuité des matières organiques résiduelles non transformées qui représentent 5% de la glycérine obtenue après application du procédé objet de la présente évaluation.

Effet de la méthanisation

Il pourrait être envisagé que la méthanisation de la glycérine contribue à la réduction d'un éventuel titre infectieux résiduel. Néanmoins, les rares travaux publiés à ce jour concernant une matrice différente (effluents d'abattoirs ou équarrissages) (Kirchmayr *et al.*, 2006, Hinckley *et al.*, 2008) ne permettent pas, en l'état, de considérer la méthanisation comme un procédé efficace de réduction de l'infectiosité liée au prion. Dans l'appréciation du risque, la situation épidémiologique actuelle favorable de la France vis-à-vis de l'ESB⁷ et de la tremblante peut aussi être prise en considération, mais le rapport laisse présumer une double origine (France et Europe) des graisses fondues utilisées.

Les autres agents pathogènes, quels qu'ils soient, initialement présents dans les sous-produits animaux de catégorie 1, sont détruits par le traitement destiné à éliminer les ATNC. Cependant, d'éventuelles contaminations de la glycérine brute lors des étapes (stockage, transport⁸, etc.) précédant la phase de méthanisation peuvent avoir lieu. Aucune analyse microbiologique n'a été présentée afin de vérifier ce point.

En conséquence, au regard des différentes réserves/incertitudes, basées sur des travaux scientifiques postérieurs à l'avis de l'EFSA de 2004, relatives :

- à l'efficacité du traitement thermique de la méthode 1 appliqué à des graisses déjà séparées,
- au cumul des facteurs de réduction estimés de l'infectiosité à chaque étape du procédé,
- à l'infectiosité potentielle des résidus de matière non transformés en biodiesel,
- aux possibilités de contamination croisée de la glycérine lors des étapes de stockage et de transport,

l'innocuité complète de ces sous-produits notamment vis-à-vis du risque prion n'est pas garantie, et un risque résiduel doit être considéré par principe de précaution.

■ Informations relatives aux propriétés toxicologiques et à l'exposition de l'opérateur

L'analyse de dangers, telle que présentée dans le rapport, porte sur les dangers biologiques et les dangers chimiques de la glycérine. Toutefois, il convient de noter que la présente saisine concerne les résidus de digestion résultant de la conversion de la glycérine (après mélange avec les autres effluents et déchets traités sur les sites de méthanisation) en biogaz.

Dangers chimiques

Des rapports d'analyses chimiques ont été fournis sur les graisses animales (10 analyses) et sur la glycérine (2 analyses). Les substances chimiques analysées tiennent compte de la nature des sous-produits utilisés (il faut rappeler que les sous-produits animaux de catégorie 1 peuvent contenir des matières incluant des substances interdites ou réglementées, ou des contaminants de l'environnement, des matières recueillies lors du traitement des eaux résiduaires des usines de

⁷ ESB = Encéphalopathie Spongiforme Bovine

⁸ Noter, entre autre, que la glycérine brute est transportée dans les mêmes camions citernes que les graisses fondues et huiles de cuisson usagées.

transformation de C1...), du processus chimique nécessaire à la transformation des graisses fondues en biodiesel, et des caractéristiques de la glycérine brute produite. Ainsi, des composés tels que le glycérol, le méthanol, divers éléments traces et contaminants environnementaux (éléments traces métalliques, hydrocarbures aromatiques polycycliques, composés organochlorés, pesticides, halogènes, mycotoxines) ont été analysés.

Les résultats d'analyses des éléments traces et contaminants environnementaux dans des échantillons de graisses et de glycérine brute sont satisfaisants et laissent présumer un impact très faible de l'adjonction de la glycérine (10% maximum) aux autres produits introduits pour la phase de méthanisation en termes de dangerosité sur le résidu final. Les mesures de maîtrise face au risque lié à l'abattage d'animaux d'élevage suite à une contamination chimique accidentelle sont en outre évoquées.

La question des résidus médicamenteux est abordée, à défaut de données, d'un point de vue théorique. Le pétitionnaire déclare que le traitement par la méthode n°1 (133°C, 3 bars, 20 min) permet de prévenir et de limiter le risque de rejets de résidus de médicaments dans l'environnement et que l'impact des concentrations d'éventuels résidus médicamenteux devrait être réduit suite aux dilutions successives qui interviennent tout au long du cycle de vie des sous-produits animaux.

Par ailleurs, dans le cadre de cette demande, les digestats de méthanisation résultent de la transformation d'un mélange de glycérine et de matières organiques issues de sous-produits d'animaux et de déchets de table. L'ensemble des substances contenues dans ces intrants n'est pas connu de manière exhaustive. Il n'est donc pas possible d'identifier l'intégralité des dangers au sens du Règlement (CE) n° 1272/2008.

Compte tenu du caractère résiduaire du produit destiné à être utilisé, gants, vêtements, lunettes et masque de protection appropriés devront être portés par les opérateurs au cours de sa manipulation et/ou de son application.

Dangers biologiques

Au regard des informations relatives aux propriétés toxicologiques et à l'exposition de l'opérateur, le risque résiduel EST n'est pas significatif, et les moyens de protection proposés vis-à-vis du risque chimique sont de nature à protéger l'opérateur.

■ Informations relatives aux résidus et à l'exposition du consommateur

Dangers chimiques

Selon le dossier technique, il est attendu que la glycérine et le méthanol soient dégradés au cours du processus de méthanisation. De ce fait, une exposition du consommateur à ces composés du fait de l'épandage du digestat n'est pas attendue. La glycérine est également utilisée en tant qu'additif alimentaire (E422)⁹. Un éventuel reliquat de glycérine dans le digestat n'est donc pas susceptible de modifier l'exposition du consommateur à ce composé.

Par ailleurs, au vu des teneurs observées en éléments traces et contaminants environnementaux dans les analyses d'échantillons de graisses et de glycérine brute, l'utilisation de la glycérine dérivée de matières de catégorie 1 en entrée de digesteur n'est pas susceptible d'accroître le risque pour le consommateur, en comparaison avec le risque lié à l'épandage d'un digestat de méthanisation qui ne serait pas issu de ce type de matières premières.

Dangers biologiques

Le risque résiduel EST ne représente pas un risque significatif direct pour le consommateur de produits agricoles cultivés dans un champ recevant les résidus de digestion sous forme d'épandage. En revanche, il pourrait représenter un risque de contamination des animaux, plus sensibles aux souches de prion considérées, en cas d'exposition directe de ceux-ci aux produits épandus.

⁹ Directive 95/2/CE du Parlement européen et du Conseil du 20 février 1995 concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants (JO L 61 du 18.3.1995, p. 1).

En conséquence, il est préconisé de limiter l'épandage des résidus de digestion résultant de la conversion en biogaz de la glycérine dérivée de matières de catégorie 1 transformées, à des grandes cultures ou à l'arboriculture, en excluant leur épandage sur les prairies pâturées.

■ **Informations relatives au devenir et au comportement dans l'environnement et à l'écotoxicité**

Selon le dossier technique et l'opinion de l'EFSA sur les risques abiotiques de la glycérine pour la santé publique et animale (2010)¹⁰, la glycérine (ou glycérol) n'est pas considérée toxique pour les organismes aquatiques (CE50-24h¹¹ sur *Daphnia magna* et CE3-8j¹² sur l'algue *Scenedesmus quadricauda* après 8 jours supérieures à 10000 mg.L⁻¹).

L'une des impuretés de la glycérine est le méthanol (0,5%). Ce composé n'est pas considéré toxique pour les organismes aquatiques (CE50-96h¹³ de *Daphnia magna* supérieure à 100 mg.L⁻¹ et CL50-48/96h¹⁴ chez les poissons comprises entre 100 et 15000 mg.L⁻¹). Les autres impuretés ne sont pas considérées dangereuses pour l'environnement.

Une analyse de l'activité bactérienne a permis de suivre dans le temps les capacités de digestion anaérobie d'une installation de méthanisation.

Cette analyse indique que l'inoculum issu de l'un des quatre sites de méthanisation présentés dans le dossier technique, correspondant à une boue de co-digesteur, présente une « biodégradabilité » précoce avant 5h et s'étalant jusqu'à 25h. Le détail des protocoles n'est pas disponible.

Il est fait état d'une dégradation importante et rapide du méthanol et du glycérol au cours de la méthanisation. Les résultats fournis pour corroborer cette affirmation ne sont pas pertinents (potentiel méthanogène déterminé par une méthode « incertaine », exprimé par rapport à la matière brute dont on ne connaît pas les caractéristiques). Toutefois, cette affirmation est cohérente avec la littérature scientifique existante.

Au regard des éléments communiqués dans le dossier technique et compte tenu de la nature de la molécule, du caractère non préoccupant de la glycérine et de ses impuretés, et du procédé de digestion anaérobie, il n'est pas attendu d'effets néfastes sur l'environnement suite au retour au sol des résidus de digestion dérivé de sous-produits animaux de catégorie 1.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

En se fondant sur les éléments communiqués dans le cadre de la présente saisine, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail estime que **l'innocuité totale des graisses fondues issues de sous-produits animaux de catégorie 1, notamment vis-à-vis du risque prion, ne peut pas être garantie.**

Néanmoins, **dans le cadre d'un plan d'épandage limité au territoire national, le retour au sol des résidus de digestion résultant de la conversion en biogaz de la glycérine**, co-produit de la production de biodiesel à partir de graisses fondues issues de sous-produits animaux de catégorie 1 et transformées conformément à la méthode n° 1 (stérilisation sous pression) visée à l'annexe IV, chapitre III, du règlement (CE) n° 142/2011, **présente un risque acceptable, sous réserve que celui-ci soit restreint aux grandes cultures ou à l'arboriculture, en excluant les prairies pâturées.**

Marc Mortureux

¹⁰ EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on the abiotic risks for public and animal health of glycerine as co-product from the biodiesel production from Category 1 animal by-products (ABP) and vegetable oils. EFSA Journal 2010;8(12):1934. [22 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2010.1934. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm

¹¹ CE₅₀-24h = concentration produisant 50% d'effet après 24h d'exposition

¹² CE₃-8j = concentration produisant 3% d'effet (inhibition du taux de croissance) après 8 jours d'exposition

¹³ CE₅₀-96h = concentration produisant 50% d'effet après 96h d'exposition

¹⁴ CL₅₀-48/96h = concentration produisant 50% de mortalité après 48 à 96h d'exposition

MOTS-CLES

SPAN catégorie 1, graisses animales, ESB, prion, glycérine, biodiesel, méthanisation, digestat, plan d'épandage

BIBLIOGRAPHIE

- Barron RM, Campbell SL, King D, Bellon A, Chapman KE, Williamson RA, Manson JC.(2007) High titers of transmissible spongiform encephalopathy infectivity associated with extremely low levels of PrPSc in vivo. *J Biol Chem.* 2007 Dec 7; 282(49):35878-86. Epub 2007 Oct
- Bolton D., McKinley M. & Prusiner S. (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218: 1309-1311.
- Bruederle C., Hnasko R., Kraemer T., Garcia R., Haas M., Marmer W. & Carter J. (2008) Prion infected meat-and-bone meal is still infectious after biodiesel production. *Plos One* 3 : e2969.
- EFSA Journal (2004), 23, 1-3 Biodiesel Process as a method for safe disposal of category 1 Animal by-Products.
- Fernie K., Steele P., Taylor D. & Somerville R. (2007) Comparative studies on the thermostability of five strains of transmissible-spongiform-encephalopathy agent. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 47: 175-183.
- Fichet G, Comoy E, Duval C, Antloga K, Dehen C, Charbonnier A, McDonnell G, Brown P, Lasmézas CI, Deslys JP (2004) Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet.* 2004 Aug 7-13; 364(9433):521-6.
- Hinckley, G.T., Johnson, C.J., Jacobson, K.H., Bartholomay, C., McMahon, K.D., McKenzie, D., Aiken, J.M., Pedersen, J.A., (2008). Persistence of pathogenic prion protein during simulated wastewater treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5254–5259.
- Kirchmayr, R., Reichl, H.E., Schildorfer, H., Braun, R., and Somerville, R.A. (2006). Prion protein: detection in "spiked" anaerobic sludge and degradation experiments under anaerobic conditions. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 53, 91–98.
- Lasmézas CI, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Beringue V, Peyrin JM, Fournier JG, Hauw JJ, Rossier J, Dormont D (1997) Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science.* 1997 Jan 17; 275(5298):402-5.
- Müller H., Stitz L., Wille H., Prusiner S. & Riesner D. (2007) Influence of water, fat, and glycerol on the mechanism of thermal prion inactivation. *J. Biol. Chem.* 282 : 35855-35867.
- Scientific Steering Committee, European Commission, Heath & consumer protection directorate general (10-11 APRIL 2003). Opinion on six alternative methods for safe disposal of animals by-products.
- Seidel B., Alm M., Peters R., Kördel W & Schäffer A (2006) Safety evaluation for a biodiesel process using prion-contaminated animal fat as source. *Environ Sci Pollut Res* 13 : 125-130.
- Tixador P, Herzog L, Reine F, Jaumain E, Chapuis J, Le Dur A, Laude H, Béringue (2010) VPLoS Pathog. 2010 Apr 15; 6(4):e1000859. doi: 10.1371/journal.ppat.1000859. The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent.