

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE, AGRO-ALIMENTAIRE  
ET DE L'ALIMENTATION NANTES ATLANTIQUE - ONIRIS

ANNEE 2011

**ETUDE DE L'IMPLICATION DE *SARCOCYSTIS* SPP.  
DANS LE DEVELOPPEMENT DES MYOSITES  
EOSINOPHILIQUES CHEZ LES BOVINS**

THESE  
pour le  
diplôme d'Etat  
de  
DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement  
le 14 décembre 2011  
devant  
la Faculté de Médecine de Nantes  
par

**Audrey HONORE**

Née le 22 février 1986 à Rennes (35)

JURY

Président : Monsieur Michel MARJOLET  
Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

Membres : Rapporteur : Monsieur Jean-Michel CAPPELIER  
Maître de Conférences à ONIRIS-Nantes

Assesseur : Madame Nathalie RUVOEN  
Maître de Conférences à ONIRIS-Nantes







## ENSEIGNANTS-CHERCHEURS DE ONIRIS

**Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique**

Directeur Général : Pierre SAI (Pr)

### DEPARTEMENT DE BIOLOGIE, PATHOLOGIE ET SCIENCES DE L'ALIMENT

NUTRITION et ENDOCRINOLOGIE	Patrick NGUYEN (Pr) Henri DUMON (Pr)	Brigitte SILIART (Pr) Lucile MARTIN (MC)
PHARMACOLOGIE et TOXICOLOGIE	Marc GOGNY (Pr) Martine KAMMERER (Pr) Jean-Dominique PUYT (Pr)	Hervé POULIQUEN (Pr) Jean-Claude DESFONTIS (Pr)
PHYSIOLOGIE FONCTIONNELLE, CELLULAIRE et MOLECULAIRE	Lionel MARTIGNAT (MC) Jean-Marie BACH (MC)	Philippe BLANCOU (MC) Julie HERVE (MCC)
HISTOLOGIE ET ANATOMIE PATHOLOGIQUE	Yan CHEREL (Pr) Jérôme ABADIE (MC)	Frédérique NGUYEN (MC) Marie-Anne COLLE (MC)
PATHOLOGIE GENERALE, MICROBIOLOGIE et IMMUNOLOGIE	Jean-Marc PERSON (Pr) Jean-Louis PELLERIN (Pr)	Hervé SEBBAG (MC) Emmanuelle MOREAU (MC)
BIOCHIMIE ALIMENTAIRE INDUSTRIELLE	Gaëlle ARVISENET (MC) Xavier DOUSSET (Pr) Djamel DRIDER (MC) Joëlle GRUA (MC)	Laurent LE THUAUT (MC) Carole PROST (Pr) Thierry SEROT (Pr) Florence TEXIER (MC)
MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE INDUSTRIELLE	Xavier DOUSSET (Pr) Djamel DRIDER (MC) travaux) Bernard ONNO (MC)	Hervé PREVOST (Pr) Bénédicte SORIN (Chef de

### DEPARTEMENT DE SANTE DES ANIMAUX D'ELEVAGE ET SANTE PUBLIQUE

HYGIENE ET QUALITE DES ALIMENTS	Michel FEDERIGHI (Pr) Bruno LE BIZEC (Pr) Catherine MAGRAS-RESCH (Pr)	Eric DROMIGNY (MC) Marie-France PILET (MC) Jean-Michel CAPPELIER (MC)
MEDECINE DES ANIMAUX D'ELEVAGE	Arlette LAVAL (Pr) Catherine BELLOC (MC) Isabelle BREYTON (MC) Christophe CHARTIER (Pr)	Alain DOUART (MC) Sébastien ASSIE (MC) Raphaël GUATTEO (MC)
PARASITOLOGIE GENERALE, PARASITOLOGIE DES ANIMAUX DE RENTE, FAUNE SAUVAGE et PATHOLOGIE AQUACOLE	Monique L'HOSTIS (Pr) Alain CHAUVIN (Pr) Albert AGOULON (MC)	Guillaume BLANC (MC) Ségolène CALVEZ (MC)
MALADIE REGLEMENTEE, ZONOSSES et REGLEMENTATION SANITAIRE	Jean-Pierre GANIERE (Pr) (MC) Suzanne BASTIAN-ORANGE (MC)	Nathalie RUVOEN-CLOUET  Carole PEROZ (MC)
ZOOTECNIE, ECONOMIE	Henri SEEGER (Pr) Xavier MALHER (Pr) François BEAUDEAU (Pr)	Christine FOURICHON (MC) Nathalie BAREILLE (MC)

## DEPARTEMENT DE SCIENCES CLINIQUES

ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES	Patrick COSTIOU (Pr) Eric BETTI (MC)	Claire DOUART (MC) Claude GUINTARD (MC)
PATHOLOGIE CHIRURGICALE et ANESTHÉSIOLOGIE	Olivier GAUTHIER (Pr) Béatrice LIJOUR (MC) Eric AGUADO (MC)	Delphine HOLOPHERNE (MC) Olivier GEFFROY (Pr) Eric GOYENVALLE (MC)
DERMATOLOGIE, PARASITOLOGIE DES CARNIVORES ET DES EQUIDES, MYCOLOGIE	Patrick BOURDEAU (Pr)	Vincent BRUET (MCC)
MEDECINE INTERNE, IMAGERIE MÉDICALE et LEGISLATION PROFESSIONNELLE VÉTÉRINAIRE	Yves LEGEAY (Pr) Dominique FANUEL (Pr) Anne COUROUCE-MALBLANC (MC) Catherine IBISCH (MC)	Marion FUSELLIER (MC) Jack-Yves DESCHAMPS (MC) Odile SENECAAT (MC)
BIOTECHNOLOGIES et PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION	Daniel TAINURIER (Pr) Francis FIENI (Pr) Jean-François BRUYAS (Pr)	Lamia BRIAND (MC) Djemil BENCHARIF (MC)

## DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCÉDES ALIMENTAIRES

Lionel BOILLEREAUX (Pr) Dominique COLIN (MC) Sébastien CURET PLOQUIN (MC) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Dominique DELLA VALLE (MC) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Vanessa JURY (MC) Alain LEBAIL (Pr) Catherine LOISEL (MC) Jean-Yves MONTEAU (MC) Denis PONCELET (Pr) Olivier ROUAUD (MC) Hélène SIMONIN (MC)
--	--

## DEPARTEMENT DE MANAGEMENT, STATISTIQUE ET COMMUNICATION

SENSOMÉTRIE - CHIMIOMÉTRIE	Véronique CARIOU (MC) Philippe COURCOUX (MC) El Mostafa QANNARI (Pr)	Michel SEMENOU (MC) Chantal THORIN (PCEA) Evelyne VIGNEAU (Pr)
ECONOMIE – GESTION - COMMUNICATION	Pascal BARILLOT (MC) Yvan DUFEU (MC) Marie-Josée LORRAIN (MC)	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Samia ROUSSELIÈRE (MC) Vincent HOVLAQUE (Pr)
LANGUES	Franck INSIGNARES (PCEA) Linda MORRIS (PCEA)	Marc BRIDOU (PCEA) Fabiola ASENCIO (PCEA)

**Pr** : Professeur, **Pr A** : Professeur Associé, **Pr I** : Professeur Invité, **MC** : Maître de Conférences, **MCC** : Maître de Conférences Contractuel, **AERC** : Assistant d'enseignement et de recherches, **PLEA** : Professeur Lycée Enseignement Agricole, **PCEA** : Professeur certifié enseignement agricole



**La reproduction d'extraits est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée comme suit :**

HONORE, A. (2011). Etude de l'implication de *Sarcocystis* spp. dans le développement des myosites éosinophiliques chez les bovins. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Nantes. Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de L'alimentation Nantes Atlantique, 105 p.

*Le défaut de citation est considéré comme du plagiat. Ce dernier est puni par la loi française et passible de sanctions allant jusqu'à 3 ans d'emprisonnement et 300 000 € d'amende.*





## REMERCIEMENTS

A Monsieur Michel MARJOLET, Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

*Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,  
Hommages respectueux.*

A Monsieur Jean-Michel CAPPELIER, Maître de conférences à ONIRIS

*Pour avoir accepté d'encadrer cette étude et nous avoir fait l'honneur de participer à  
notre jury, pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses précieux conseils,  
Sincères remerciements.*

A Madame Nathalie RUVOEN, Maître de conférences à ONIRIS

*Pour nous avoir fait l'honneur de participer à notre jury et pour ses conseils avisés,  
Sincères remerciements.*

A Monsieur Philippe TESSERAU, Président de BOVI-LOIRE

*Pour nous avoir fait l'honneur de participer à notre jury et pour avoir été  
l'investigateur de cette étude,  
Remerciements respectueux.*

A Monsieur Nicolas OUDOT, Vétérinaire conseil à BOVI-LOIRE

*Pour nous avoir fait l'honneur de participer à notre jury et pour ses conseils avisés,  
Remerciements respectueux.*

A Monsieur Albert ROSSERO, Ingénieur d'étude à ONIRIS

*Pour sa précieuse aide pour la partie expérimentale, pour sa gentillesse et sa  
disponibilité,  
Sincères remerciements.*

A Madame Catherine MAGRAS, Professeur à ONIRIS

*Pour ses conseils avisés et sa gentillesse,  
Sincères remerciements.*

A l'équipe de l'UMR INRA 1014 – SECALIM,

*Pour leur accueil chaleureux, leur gentillesse et les bons moments partagés ensemble,*

*Sincères remerciements.*

A mon père Arnaud,

*Pour ta présence, ton amour et ton soutien inconditionnel malgré mon caractère, pour avoir donné vie à mon rêve avec maman.*

*Pour m'avoir transmis mes valeurs, cette volonté de réussir et de donner le meilleur de moi-même...*

A ma mère Béatrice,

*Pour ta présence, ton amour et ton soutien inconditionnel quelque soit les circonstances et m'aider à retrouver confiance, pour m'avoir transmis cet amour de la vie et des animaux...*

A ma sœur Mélanie,

*Pour m'avoir soutenu dans les moments les plus difficiles, et m'avoir supporté toutes ces longues années et c'est loin d'être fini !*

A mon frère Jérémy,

*Pour ta bonne humeur et ton entrain, attention à ne plus trop martyriser Marly maintenant !*

A ma tante Nathalie & co.

*Pour ta présence et ton soutien dans les moments difficiles et ta bonne humeur !*

A mon grand-père Michel et à Monique

*Pour votre présence, votre soutien et tous les bons moments passés ensemble !*

A ma grand-mère Jeannine,

*Pour ton soutien, ta présence malgré la distance et les bons moments passés ensemble !*

A ma tante Virginie & co.

*Pour ton soutien et m'avoir hébergé pendant les concours, tu as toujours été un modèle pour moi !*

A ma grand-mère Michèle

*Tu es partie trop vite mais tu aurais été fière et tu seras toujours dans mon cœur !*

A la famille Etoré

*Pour leur bonne humeur, leur présence et leur soutien !*

A Gilbert, Jeannine, Henri, Jocelyne & co

*Pour leur bonne humeur, leur présence et leur soutien !*

A Marion,

*Pour ton amitié, pour tous ces bons moments passés ensemble à partager nos passions, une amitié pour la vie !*

A Emilie,

*Pour ton amitié, pour tous les bons moments passés ensemble durant ces cinq années et pour tes précieux conseils.*

A Virginie,

*Pour ton amitié, ton soutien, et tous les bons moments que nous avons partagés durant nos études et les soirées gastronomiques !*

A Sophie,

*Pour ton amitié, ton soutien malgré la distance et toutes ces supers soirées passés ensemble !*

A Laure,

*Pour ton amitié, ton soutien, et tous les bons moments que nous avons partagés durant nos longues études !*

A Laurianne,

*Pour ton soutien lors de notre quatrième année clinique!*

A Marie,

*Pour ton amitié, ton soutien, et tous les bons moments que nous avons partagés durant toutes ces années !*

Et enfin à Xavier,

*Pour ta présence pendant toutes ces années d'étude et tout ce que nous avons vécu ensemble.*

Que ce travail vous témoigne de tout mon amour et de ma gratitude !

Sans vous tous, je ne serais pas là aujourd'hui...

Merci !

Une petite pensée à tous mes amis à quatre pattes qui m'apporte ou m'ont apporté du bonheur chaque jour : Geisha, Livingstone, Dicky, Marly, Poussy, Tipó, Bobby, Choupita, Anaka, Rozene, Negrita, Quinta, Tafolepas, Ingrid, et Vertigo...



# TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux .....	17
Liste des figures .....	19
Introduction .....	21
<b>1<sup>ère</sup> partie : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>25</b>
A) <u>Etiologie de la sarcosporidiose bovine</u> .....	27
1. Etapes du cycle parasitaire chez l'hôte intermédiaire : les bovins .....	28
2. Etapes du cycle parasitaire chez l'hôte définitif .....	29
B) <u>Etude clinique</u> .....	30
1. Chez les bovins .....	30
2. Chez l'hôte définitif .....	31
a. Les carnivores et les félins .....	31
b. Les hommes .....	31
C) <u>Pathogénicité</u> .....	33
D) <u>Epidémiologie</u> .....	36
1. Facteurs de prédisposition .....	36
2. Facteurs de risque .....	37
E) <u>Diagnostic</u> .....	38
1. Chez les bovins .....	38
a. Du vivant de l'animal .....	39
b. Lorsque l'animal est mort .....	40
i. Diagnostic morphologique .....	40
ii. Diagnostic moléculaire .....	42
2. Chez l'hôte définitif .....	42
F) <u>Prophylaxie</u> .....	43

G) <u>Importance de la sarcosporidiose bovine</u> .....	44
1. Prévalence .....	44
2. Importance médicale .....	45
3. Importance économique .....	45
4. Importance en santé publique .....	47
<b>2<sup>ème</sup> partie : ETUDE EXPERIMENTALE</b> .....	<b>50</b>
A) <u>Matériels et méthodes</u> .....	51
1. Echantillonnage .....	51
2. Digestion enzymatique .....	52
3. Extraction de l'ADN .....	53
4. PCR et détection de l'ADN de <i>Sarcocystis</i> spp. ....	54
5. Séquençage .....	55
B) <u>Résultats</u> .....	57
1. Population d'étude .....	57
2. Résultats de l'étude expérimentale .....	59
• Etude des échantillons présentant des lésions de myosite éosinophilique .....	62
• Etude par animal .....	66
3. Etude des espèces impliquées grâce au séquençage.....	68
C) <u>Discussion</u> .....	71
Conclusion .....	79
Annexe 1 : Protocole de digestion enzymatique .....	81
Annexe 2 : Protocole d'extraction de l'ADN .....	83
Annexe 3 : Protocole de la PCR .....	85
Annexe 4 : Images des gels d'électrophorèse observés aux UV .....	87
Bibliographie .....	101



## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I : Caractéristiques de la sarcosporidiose humaine en tant qu'hôte définitif et hôte intermédiaire (Fayer <i>et al.</i> , 2004) .....	33
Tableau II : Répartition des différents échantillons de l'étude .....	52
Tableau III : Localisation des amorces et caractéristiques des séquences de l'ARNr 18 S amplifié (Vangeel <i>et al.</i> , 2006) .....	55
Tableau IV : Synthèse des résultats obtenus à la PCR en fonction des échantillons .....	61
Tableau V : Synthèse des résultats du séquençage en fonction des échantillons .....	68



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle épidémiologique des espèces de sarcocystes impliquées chez les bovins et leurs hôtes définitifs .....	27
Figure 2 : Cycle évolutif de <i>Sarcocystis cruzi</i> (Dubey et Lindsay, 2006) .....	29
Figure 3 : Lésion de myosite éosinophilique étendue au sein d'un muscle de vache (Photographie de Cappelier, 2011) .....	34
Figure 4 : Lésions de myosite éosinophilique au sein des muscles de la cuisse d'une vache de 8 ans (Wouda et al., 2006) .....	35
Figure 5 : Sarcocyste à paroi mince observé au microscope (x200), (Mary, 2005) .....	40
Figure 6 : Parois de sarcocystes de <i>S. cruzi</i> (A), <i>S. hirsuta</i> (B), et <i>S. hominis</i> (C) observées au microscope photonique (Dubey <i>et al.</i> , 1989b) .....	41
Figure 7 : Nombre de saisies à l'abattoir par an et motifs (Bovi-Loire, 2011) .....	46
Figure 8 : Pourcentage des races présentes dans notre population d'étude .....	58
Figure 9 : Classification des carcasses dans notre population d'étude .....	58
Figure 10 : Age des bovins saisis dans notre population d'étude .....	59
Figure 11 : Gel d'électrophorèse observé sous UV après migration des amplifiats de la PCR .....	60
Figure 12 : Relation entre la race et la présence d'ADN de <i>Sarcocystis</i> spp. dans des muscles à lésions .....	62

Figure 13 : Relation entre la catégorie de la carcasse et la présence d'ADN de <i>Sarcocystis</i> spp. dans des muscles à lésions .....	64
Figure 14 : Age des bovins saisis pour lésions de myosite éosinophilique .....	65
Figure 15 : Résultats de l'analyse de la lésion et du diaphragme par animal .....	66
Figure 16 : Exemple de lésion de cysticerose provoquée par <i>Cysticercus bovis</i> (Photographie de Cappelier, 2011) .....	75

## **INTRODUCTION**

La myosite éosinophilique est une atteinte musculaire très rare chez les bovins, cliniquement asymptomatique mais caractérisée par la présence de ponctuations verdâtres dans le muscle entraînant la saisie partielle ou totale de la carcasse lors de l'inspection post-mortem à l'abattoir (Wouda *et al.*, 2006). L'étiologie et la pathogénie de cette atteinte musculaire sont encore inconnues mais la présence fréquente de kystes dégénérés de sarcocystes au centre de ces lésions permet de suspecter l'implication de ce parasite (Vangeel *et al.*, 2011).

Le rôle des sarcocystes dans le développement des lésions de myosite éosinophilique n'est pas encore élucidé d'autant plus que ce parasite semble être très bien supporté par les bovins. En effet, la prévalence de ce parasite dans les muscles des bovins est estimée à 100 % dans le monde alors que la prévalence de la myosite éosinophilique bovine est très faible (Vangeel *et al.*, 2007).

Les trois espèces de sarcocystes qui parasitent les bovins sont : *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis hirsuta* et *Sarcocystis hominis*. Ils ont respectivement pour hôtes définitifs : le chien, le chat et l'homme mais le même hôte intermédiaire : les bovins. Une des espèces en cause, *Sarcocystis hominis*, a la particularité d'infecter l'homme et est responsable d'une zoonose caractérisée par une atteinte gastro-intestinale. La sévérité de l'infection est corrélée à la quantité de sarcocystes ingérés mais cela reste une zoonose mineure car elle est de faible gravité. L'importance de la sarcosporidiose bovine résulte donc des pertes économiques considérables qu'elle occasionne. En effet, lorsque la sarcosporidiose provoque une myosite éosinophilique, les carcasses sont saisies lors du contrôle sanitaire des viandes à l'abattoir. Actuellement, la myosite éosinophilique est considérée comme indicatrice de la présence du parasite, à tel point que l'amalgame est fait fréquemment entre la myosite éosinophilique et la sarcosporidiose. Ces saisies pour « sarcosporidiose bovine » représentent une perte économique conséquente pour l'éleveur qui peut toutefois être indemnisé par des groupements de défense sanitaire ou d'autres groupements professionnels en France.

Bovi-Loire est un de ces groupements professionnels et représente Interbev (Association Nationale Interprofessionnelle du Bétail et des Viandes) dans la région des Pays de la Loire. Cette association est garante de la qualité des produits commercialisés et gère le Fond d'Assainissement Régional (F.A.R.) qui prend en charge l'indemnisation de l'éleveur suite à une saisie partielle ou totale de la carcasse pour différents motifs de saisie. Dans le cas de la sarcosporidiose, la prise en charge représente 80 % de la valeur de l'animal ce qui limite les pertes pour l'éleveur mais pose un réel enjeu économique pour Bovi-Loire avec l'augmentation du nombre de saisies pour sarcosporidiose ces cinq dernières années.

Afin de comprendre les relations entre la sarcosporidiose bovine et la présence de lésions de myosite éosinophilique, Bovi-Loire a financé plusieurs études. La première, réalisée en 2005, consistait à étudier le rôle des *Sarcocystis* spp. dans les lésions de myosite éosinophilique et de connaître les espèces impliquées grâce à trois techniques : l'histologie, la digestion enzymatique et la PCR mais cette dernière technique n'était pas encore au point. Cette étude a permis de mettre en évidence par l'histologie la présence de sarcocystes dans 35 % des lésions et plus particulièrement *Sarcocystis cruzi*. La seconde, réalisée en 2009, étudiait les facteurs de risque de saisie en abattoir pour myosite éosinophilique grâce à un questionnaire envoyé aux éleveurs cotisants au F.A.R. Cette étude a montré l'influence des pratiques favorables au maintien des cycles évolutifs des parasites dans la saisie des animaux. De plus, elle a pu souligner l'existence de facteurs de prédisposition comme la race : la Blonde d'Aquitaine étant la plus concernée ainsi que l'influence du sexe : les femelles sembleraient les plus atteintes. Afin d'accroître les connaissances épidémiologiques, une étude a été financée en 2011 pour comparer les facteurs de risque entre des élevages témoins et des élevages cas où il y a eu des saisies. Les prédispositions des femelles et de la race Blonde d'Aquitaine ont encore été soulignées, ainsi que l'influence des zones d'élevage humides et l'alimentation à base de fourrage humide.

Notre étude s'intègre dans cette démarche entreprise par Bovi-Loire pour comprendre l'implication de *Sarcocystis* spp. dans le développement de lésions de myosite éosinophilique afin de diminuer l'impact économique lié aux saisies pour ce motif. Dans un premier temps, nous utiliserons une technique de biologie moléculaire, l'Amplification en Chaîne par Polymérase (PCR) pour rechercher la présence du parasite *Sarcocystis* spp. dans des échantillons de muscles de bovins saisis pour myosite éosinophilique. Dans un second temps, nous essaierons de déterminer quelle est l'espèce de sarcocyste présente dans les échantillons

positifs. Cette identification constitue une étape majeure. En effet, l'implication d'espèces comme *S. cruzi*, impliquant des carnivores domestiques ou sauvages peut rendre quasi-impossible la maîtrise de la sarcosporidiose bovine. D'autre part, la prévalence de *S. hominis*, qui a pour hôte définitif l'homme, dans la viande bovine donne une information importante en terme de santé publique (More *et al.*, 2010) et permet de mesurer les risques pour le consommateur surtout dans les pays où l'on consomme beaucoup de viande peu cuite (Vangeel *et al.*, 2007).





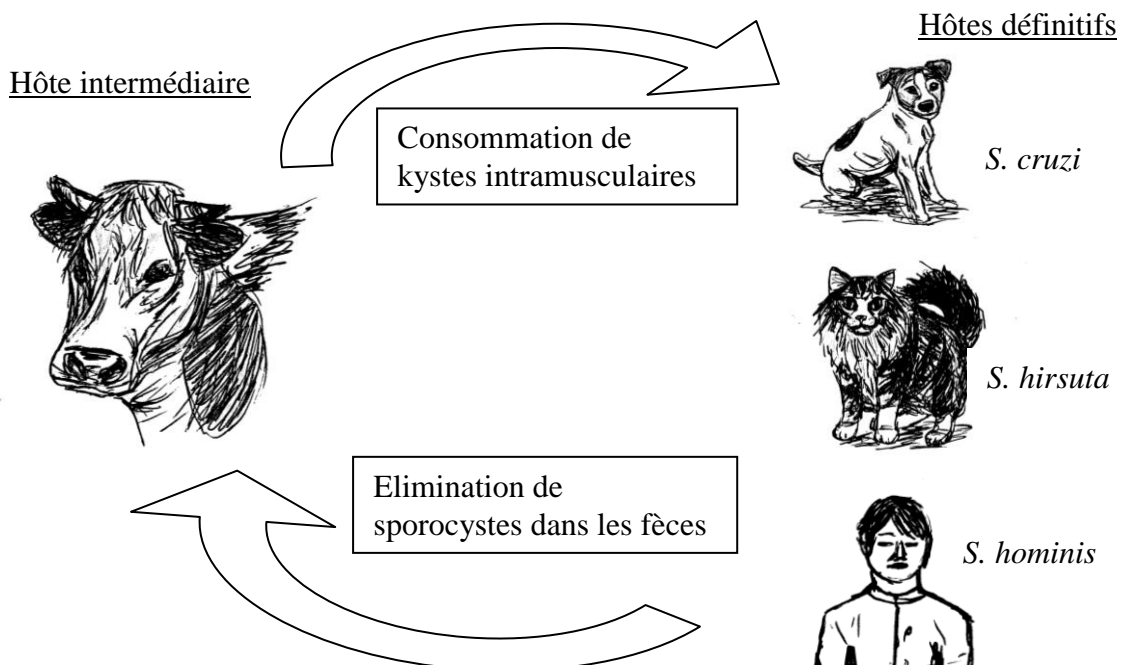
1<sup>ère</sup> partie : ETUDE  
BIBLIOGRAPHIQUE



## A) Etiologie de la sarcosporidiose bovine

*Sarcocystis* spp. a été identifié la première fois en 1843 sous la forme d'un kyste dans les muscles striés d'une souris domestique. Il fut par la suite identifié chez de nombreuses autres espèces mais la nature exacte de cet organisme resta inconnue jusqu'en 1967. Ce n'est qu'à cette époque que les sarcocystes ont pu être étudiés au microscope électronique. Les scientifiques ont alors constaté qu'il s'agissait de protozoaires apicomplexes comme *Toxoplasma* ou *Eimeria*. Le cycle de vie resta inconnu jusqu'en 1970 (Fayer, 2004).

Ce genre est composé de plus de 200 espèces et a un cycle de vie comportant deux hôtes obligatoires. L'hôte intermédiaire, un herbivore ou un omnivore, est le lieu de la mérogonie et de la formation de kystes alors que la gamétogénèse et la sporogonie ont lieu chez l'hôte définitif : carnivore ou omnivore (cf. figure 1). Les bovins principaux hôtes intermédiaires peuvent être affectés par trois espèces : *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis hirsuta*, *Sarcocystis hominis* qui ont pour hôte définitif respectivement les canins (domestiques ou sauvages), les félins et l'homme (Vangeel *et al.*, 2007).



**Figure 1 : Cycle épidémiologique des espèces de sarcocystes impliquées chez les bovins et leurs hôtes définitifs.**

1. Etapas du cycle parasitaire chez l'hôte intermédiaire : les bovins (d'après une étude de *S. cruzi* chez les bovins, Fayer, 2004)

Les sporocystes libres ou les ookystes provenant de l'hôte définitif sont ingérés par l'hôte intermédiaire où ils vont passer dans l'intestin grêle. La paroi des sporocystes se rompt et libère quatre sporozoïtes qui migrent à travers l'endothélium intestinal et pénètrent dans les cellules endothéliales des petites artères du corps. Ils forment la première des quatre générations de schizontes et vont produire de nombreux mérozoïtes 15 à 16 jours après l'ingestion des sporocystes.

Les mérozoïtes diffusent dans les artérioles, les veinules et les capillaires. Cette seconde génération est observée dans le sang périphérique 27 jours après l'ingestion des sporocystes.

La troisième génération est constituée de schizontes multinucléaires situés dans les capillaires à travers le corps, surtout dans les glomérules rénaux. Les mérozoïtes de cette génération pénètrent dans les cellules musculaires et forment des métrocystes qui vont constituer un sarcocyste. Les sites d'élection principaux sont les muscles striés squelettiques, et plus particulièrement la langue, l'œsophage, le diaphragme et le muscle cardiaque. Parfois, ils sont localisés dans le tissu nerveux comme dans la moelle épinière ou les fibres de Purkinje du cœur.

Au fur et à mesure, les métrocystes se multiplient et le sarcocyste augmente de taille. Les métrocystes vont se transformer en bradizoïtes et ce n'est qu'à ce moment que le sarcocyste devient infectieux pour l'hôte définitif, soit 2 mois ou plus après l'ingestion. L'aspect morphologique et la durée de maturation varient en fonction de l'espèce (Fayer, 2004).

## 2. Etapes du cycle parasitaire chez l'hôte définitif

Après que les sarcocystes soient ingérés par un hôte définitif (chien, chat, homme), la paroi se rompt mécaniquement ou par digestion et les bradizoïtes deviennent mobiles. Ils quittent le sarcocyste et rentrent dans les cellules intestinales de la *lamina propria* (cf. figure 2).

Chaque bradizoïte intracellulaire se transforme en un microgamète ou en un macrogamète. Les microgamètes donnent naissance après division à des microgamètes (mâles) et les macrogamètes se transforment en macrogamètes. La fusion d'un microgamète avec un macrogamète donne naissance à un ookyste contenant deux sporocystes et qui est libéré dans la lumière intestinale.

L'ookyste est ensuite éliminé dans le milieu extérieur par les fèces, parfois la paroi est rompue, libérant ainsi les sporocystes. Les sporocystes mesurent environ 10 à 15 micromètres et contiennent les quatre sporozoïtes qui sont directement infectieux pour l'hôte intermédiaire (Fayer, 2004).

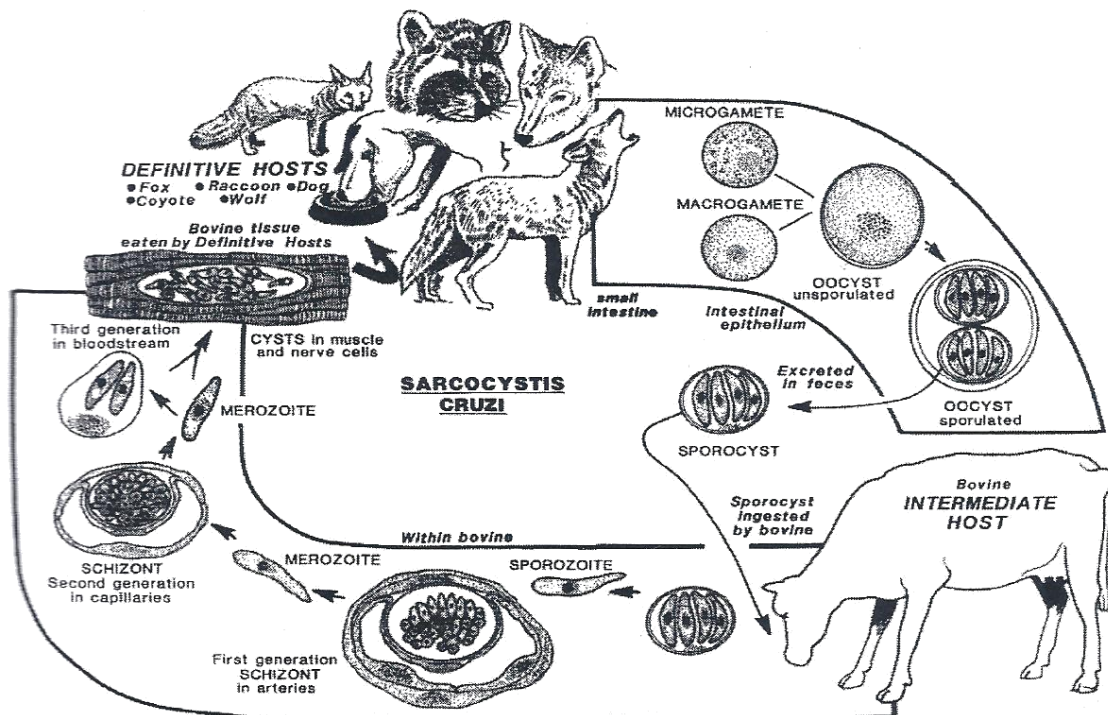


Figure 2 : Cycle évolutif de *Sarcocystis cruzi* (Dubey et Lindsay, 2006).

## B) Etude clinique

### 1. Chez les bovins

La sarcosporidiose bovine est une affection asymptomatique dans la plupart des cas surtout dans sa forme chronique. Mais cette maladie peut se traduire quelques fois par une symptomatologie non spécifique dans sa forme aigüe.

Savini *et al.*, ont réalisé en 1995 une étude sur la sarcosporidiose bovine aigüe par l'infection expérimentale de cinq vaches avec *S. cruzi*. Trois vaches ont reçu  $10^6$  sporocystes de *S. cruzi* par voie intra-ruminale et deux vaches témoins ont reçu une solution saline. Les sporocystes provenaient de chiens expérimentalement infectés. Les vaches ayant été infectées par voie intra-ruminale ont développé une sarcosporidiose aigüe avec les symptômes suivants : température élevée, perte de poids, anorexie, avortement, diarrhée, léthargie, faiblesse, perturbations neurologiques. Il est important de noter que l'importance des signes cliniques est à corrélérer avec la quantité de sporocystes ingérée.

De façon plus détaillée, les symptômes apparaissent deux semaines après l'ingestion, les bovins présentent de la fièvre liée au développement des mérozoïtes dans les cellules endothéliales des artérioles (Fayer *et al.*, 2004) associée à une anémie normochrome normocytaire (Savini *et al.*, 1995). Quatre semaines après l'ingestion, la reproduction asexuée a lieu dans les cellules endothéliales des vaisseaux provoquant ainsi une réaction inflammatoire et une infiltration périvasculaire de cellules mononucléaires (Fayer, 2004). Une augmentation des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes est aussi observée (Savini *et al.*, 1995).

La sarcosporidiose aigüe se traduit aussi par des avortements, de la mortalité embryonnaire, ou des naissances prématurées chez les femelles gestantes (Tenter, 1995).

*Sarcocystis cruzi* est le plus pathogène pour les bovins et provoque un épisode aigu chez les veaux de façon sporadique et des perturbations modérées de la coagulation (Dauguschies *et al*, 1998).

De façon générale, la sévérité de l'infection est corrélée à la quantité de sporocystes ingérée (Fayer, 2004), la sarcosporidiose chronique résultant d'une faible quantité de *Sarcocystis* spp. consommée (Tenter, 1995).

Cette forme chronique est la plus fréquente, souvent asymptomatique, elle peut se traduire par une perte d'appétit, un amaigrissement, un retard de croissance, une atrophie musculaire, une léthargie (Fayer, 2004) et des douleurs musculaires. Elle s'installe à partir du quatrième mois lorsque les parasites commencent à coloniser les muscles striés : myocarde, langue, diaphragme, œsophage, etc... (Euzéby, 1998). De plus, une étude de Daugschies *et al.* réalisée en 2000 montre que la présence du parasite entraîne une modification du métabolisme musculaire expliquant ainsi une partie des symptômes observés.

## 2. Chez l'hôte définitif

### *a. Les carnivores et les félins*

Les chiens et les chats sont les hôtes définitifs pour respectivement *Sarcocystis cruzi* et *Sarcocystis hirsuta*. Généralement ce sont des affections asymptomatiques, mais suivant la quantité de sporocystes ingérée, une atteinte gastro-intestinale non spécifique avec diarrhée et vomissement typique d'une coccidiose classique peut être observée.

### *b. Les hommes*

La maladie chez l'homme peut s'exprimer sous deux formes et est causée généralement par *Sarcocystis hominis*.

La première forme se manifeste sous l'aspect d'un syndrome toxinique. Elle se traduit par une atteinte gastro-intestinale non spécifique. Les signes cliniques apparaissent quelques heures après l'ingestion de viande contaminée généralement peu cuite et sont caractérisés par des vomissements, des diarrhées, des nausées et une léthargie (Bucca *et al.*, 2011). La guérison se fait sans traitement et sans séquelle en quelques jours. Dans tous les cas, c'est une forme apyrétique. La toxine en cause est la sarcocystine qui, bien que thermolabile, résiste à la cuisson à des températures inférieures à 50 °C et dont les kystes s'enrichissent après la mort des bradyzoïtes (Euzéby, 1998).

La seconde forme est le syndrome de coccidiose intestinale qui s'exprime par une entérite diarrhéique 10 à 15 jours après l'ingestion de la viande contaminée correspondant à l'excrétion des sporocystes dans les fèces (Euzéby, 1998).

Dans une étude expérimentale, des volontaires allemands se sont infectés en consommant de la viande crue infectée par *S. cruzi*. Un seul individu a présenté 3 à 6 heures après l'ingestion, une symptomatologie caractéristique incluant nausée, diarrhée et douleurs abdominales. Les signes cliniques sont transitoires et disparaissent en 36 heures sans traitement. L'intensité des symptômes est en relation avec la quantité de viande ingérée et l'effet individu n'est pas négligeable. Une étude similaire a été réalisée en Chine où des volontaires ont consommé un buffle expérimentalement infecté. Ils ont présenté, une semaine après l'ingestion, douleur et météorisme abdominal, diarrhée liquide, hyperéosinophilie. Les symptômes ont disparu en trois semaines sans traitement ni séquelle. De manière occasionnelle, les signes cliniques peuvent s'aggraver comme le montre le cas de 6 individus, en Thaïlande, qui ont développé une entérite nécrosante nécessitant une intervention chirurgicale (Desportes-Livage *et al.*, 2005).

Dans un contexte plus particulier qui sort de notre étude, l'homme peut très rarement être un hôte intermédiaire pour des espèces de *Sarcocystis* spp. que l'on retrouve en Asie du Sud-Est. Une atteinte musculaire caractérisée par de la fièvre, des douleurs musculaires, des bronchospasmes et du prurit peut être observée (Bucca *et al.*, 2011). Le tableau I récapitule les manifestations des différentes formes chez l'homme.



**Tableau I : Caractéristiques de la sarcosporidiose humaine en tant qu'hôte définitif et hôte intermédiaire (Fayer *et al.*, 2004).**

<b>Caractéristiques</b>	<b>Infection musculaire (hôte intermédiaire)</b>	<b>Infection intestinale (hôte définitif)</b>
<b>Source</b>	Eau ou aliment contaminé par des fèces d'un carnivore ou d'un omnivore	Viande crue ou mal cuite
<b>Stade infectieux</b>	Ookystes ou sporocystes libres	Sarcocystes contenant des bradizoïtes
<b>Développement</b>	Schizontes intravasculaires, sarcocystes intramusculaires	Reproduction dans la <i>lamina propria</i> , élimination dans les fèces
<b>Incubation</b>	Plusieurs semaines à plusieurs mois	3/6 h jusqu'à 36 h
<b>Symptômes</b>	Douleur musculaire, fièvre, cardiomyopathie, bronchospasme, œdème sous-cutané	Nausée, perte d'appétit, vomissement, diarrhée
<b>Diagnostic</b>	Biopsie, anticorps contre les bradizoïtes	Ookystes ou sporocystes dans les fèces
<b>Traitement</b>	Co-trimoxazole, furazolidone, albendazole, anti-coccidiens, pyriméthamine, anti-inflammatoires	Aucun

### **C) Pathogénicité**

Comme nous l'avons vu précédemment, la sarcosporidiose bovine est la plupart du temps cliniquement asymptomatique mais une atteinte musculaire caractérisée par une myosite éosinophilique peut être observée. Le pouvoir pathogène des *Sarcocystis* spp. est lié à la fois à leur action toxique, phlogogène et antigénique entraînant une réaction inflammatoire

et une nécrose du tissu musculaire. Les kystes parasitaires ne sont pas visibles à l'œil nu et nécessitent une analyse histologique (Euzéby, 1998).

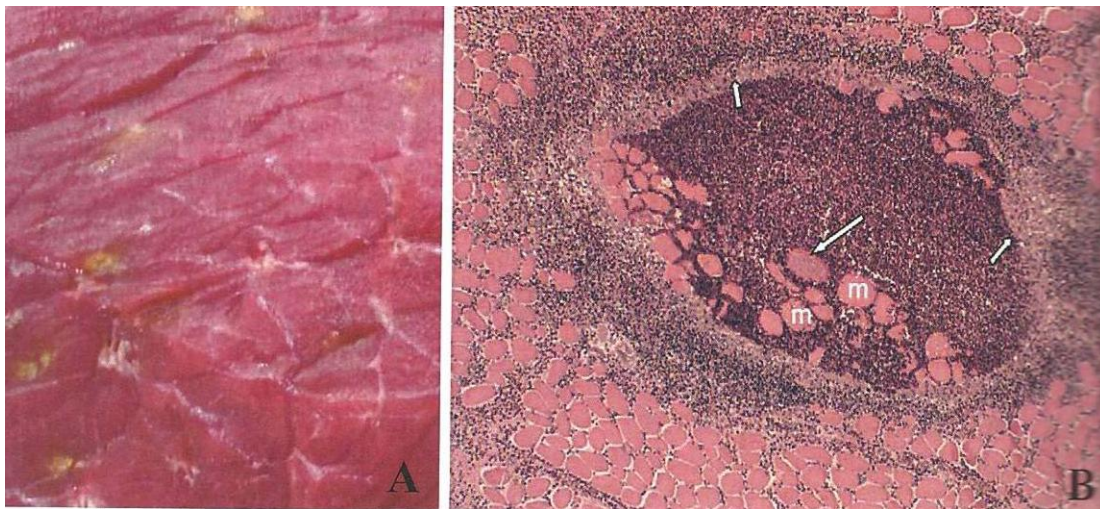
Pour une raison encore non élucidée, il semblerait que la présence du parasite dans le tissu musculaire entraîne parfois le développement d'une myosite éosinophilique. Cette atteinte musculaire est assez rare du fait que les granulocytes éosinophiles représentent moins de 10 % des granulocytes circulants. Cette infiltration assez exceptionnelle, du tissu musculaire par les granulocytes éosinophiles, s'observe généralement au cours d'infection parasitaire. Cependant chez l'homme, une myosite éosinophilique peut être observée lors de certaines affections principalement dysimmunitaires comme la sarcoïdose, la polyarthrite rhumatoïde, la périartérite noueuse ou des myopathies inflammatoires et congénitales (Chérin *et al.*, 2001).

Les carcasses présentant ce type de lésions sont saisies car elles sont impropres à la consommation humaine. Visuellement, deux types différents de lésions sont observables. Les plus fréquentes (environ 92,5% des cas selon Jensen *et al.*) sont les lésions multifocales, nombreuses, fusiformes et rondes, allongées dans le sens des fibres musculaires et mesurent entre 0,5 et 5 mm de longueur sur 0,5 à 2 mm de largeur (Jensen *et al.*, 1986). Quelques fois, on peut observer des lésions diffuses de 5 à 15 cm de long (cf. figure 3). Dans les deux cas, les lésions ont une couleur jaune pâle à verdâtre.



**Figure 3 : Lésion de myosite éosinophilique étendue au sein d'un muscle de vache (Photographie de Cappelier, 2011).**

A l'histologie, l'image est dominée par la présence de nombreux polynucléaires éosinophiles caractéristique d'un granulome (cf. figure 4). Au centre de la lésion, le sarcocyste peut être parfois entouré de neutrophiles dégénérés en association avec des fibres musculaires nécrotiques et des cellules phagocytaires ainsi qu'un tissu fibreux et des cellules épithéliales. Des polynucléaires neutrophiles associés à des macrophages et lymphocytes s'infiltrent tout autour de la lésion. Il y a une forte suspicion pour que ces lésions de myosite éosinophilique soient liées à la dégénérescence de *Sarcocystis* spp. Cependant, le parasite n'est pas toujours mis en évidence dans la lésion (Wouda *et al.*, 2006).



- (A) Lésions macroscopiques multifocales, fuselées, de 2-3 mm de large, verdâtres.
- (B) Observation au microscope électronique d'un granulome, noter le sarcocyste (grande flèche) entouré de myocytes dégénérés (m), de polynucléaires éosinophiles, de cellules épithélioïdes (petites flèches) et de fibrocytes.

**Figure 4 : Lésions macroscopiques et microscopiques de myosite éosinophilique au sein des muscles de la cuisse d'une vache de 8 ans (Wouda et al., 2006)**

Le rôle joué par *Sarcocystis* spp. dans la pathogénie des myosites éosinophiliques n'est pas clairement connu car certains animaux infectés expérimentalement par des sporocystes ne présentent pas de lésions. De plus, la présence de sarcocystes est très élevée dans le cheptel bovin en comparaison avec le faible pourcentage de lésions de myosite éosinophilique. Granstrom *et al.* (1989) ont proposé alors l'hypothèse d'une prédisposition génétique de certains animaux à produire des IgE en réponse aux antigènes des bradizoïtes. Ainsi la myosite éosinophilique serait une réaction anormale à la dégénérescence des sarcocystes et une réponse d'hypersensibilité de type I (Wouda *et al.*, 2006).

Une étude expérimentale réalisée en 2011 par Vangeel *et al.*, consistant à injecter en intramusculaire des antigènes de sarcocystes chez des veaux, a montré que les sites d'injection étaient histologiquement similaires aux lésions de myosite éosinophilique naturelle. La rupture de la paroi des sarcocystes peut donc intervenir dans l'apparition de lésions de myosite éosinophilique.

Plusieurs mécanismes immunitaires peuvent ainsi expliquer l'apparition de lésions de myosite éosinophilique associée à la présence de sarcocystes.

## **D) Epidémiologie**

### **1. Facteurs de prédisposition**

Comme nous venons de le voir, certains animaux présenteraient une prédisposition génétique à développer une réaction d'hypersensibilité de type I aux antigènes des bradizoïtes (Granstrom *et al.*, 1989). Cela peut expliquer pourquoi certains animaux vont présenter une myosite éosinophilique contrairement à d'autres chez qui le parasite est pourtant bien présent.

De plus, plusieurs études dont la thèse de Chloé Guénégan en 2005 soulignent la prépondérance de deux races à développer des lésions associées à des saisies pour sarcosporidiose à l'abattoir, la race Blonde d'Aquitaine principalement et la Limousine secondairement. A l'inverse, la race Charolaise ne présente ce type de lésion que très exceptionnellement. Ainsi, il semblerait que cette prédisposition génétique à développer des lésions de myosite éosinophilique responsables de saisie à l'abattoir pour sarcosporidiose soit étroitement liée à la race.

De plus, Reiten *et al.* en 1966, ont émis l'hypothèse que les femelles semblaient être prédisposées à développer des lésions de myosite éosinophilique responsables de saisie pour sarcosporidiose, des mécanismes hormonaux-dépendants avaient été alors évoqués.

Nous pouvons donc souligner l'importance de deux facteurs de prédisposition dans l'apparition de lésions de myosite éosinophile suite à l'infection par *Sarcocystis* spp. D'une part, une prédisposition génétique que l'on observe chez certaines races comme la Blonde d'Aquitaine essentiellement et la Limousine. Cependant, cette prédisposition n'a jamais été objectivée. Et d'autre part, le sexe semble être aussi un facteur de prédisposition non négligeable, les femelles étant les plus concernées.

## 2. Facteurs de risque

La transmission de la sarcosporidiose bovine se fait principalement horizontalement par l'ingestion de sporocystes ou d'oocystes excrétés dans les fèces des chiens ou d'autres canidés sauvages, des chats et des hommes. La transmission verticale par passage du placenta au fœtus est aussi possible. Cependant même si elle a été observée lors d'infections expérimentales, la fréquence lors d'infection naturelle reste inconnue (More *et al.*, 2009).

Une étude réalisée en Amérique Latine montre que la prévalence de *Sarcocystis* spp. est plus élevée dans la viande issue d'Argentine (23,44 %) que celle issue du Brésil (6,25%). Alors que les bovins sont élevés de la même façon en pâturage extensif dans les deux pays. Cette différence a été associée à une moins grande concentration de carnivores domestiques et sauvages au Brésil, et un abattage plus précoce en Argentine (Ghisleni *et al.*, 2006). Cette étude tend à indiquer ainsi que la présence de carnivores sur l'exploitation est un facteur de risque non négligeable du fait de la contamination possible des aliments destinés aux bovins par les fèces des chiens.

En revanche, aucune étude que ce soit en Italie (Bucca *et al.*, 2011) ou en France (Guénégan, 2009) n'a réussi à mettre en évidence des pratiques d'élevage à risque par rapport aux saisies à l'abattoir pour sarcosporidiose. Néanmoins, Chloé Guénégan montre dans sa thèse en 2009 que les élevages ayant au moins un bovin saisi pour sarcosporidiose appliquent insuffisamment les règles générales de biosécurité. Le non-respect des bonnes pratiques

d'hygiène en élevage, la présence de chiens en liberté et la consommation par ces derniers de viande bovine crue ou des dérivés, etc... peut favoriser le maintien des cycles évolutifs.

Ainsi, le maintien du cycle évolutif du parasite est un facteur de risque essentiel pour le développement de la sarcosporidiose bovine mais cela ne signifie pas que le nombre de saisies à l'abattoir pour des lésions de myosite éosinophilique évoquant la sarcosporidiose sera augmenté.

De plus, certains animaux abattus jeunes provenant d'exploitation, où le cycle parasitaire est entretenu et où le risque est élevé, ne vont pas présenter de lésions de myosite éosinophilique malgré la présence du parasite du fait de leur âge. En effet, les jeunes animaux n'ont pas le temps de développer de myosite éosinophilique à cause de la précocité de l'abattage. Donc même si le parasite est présent, l'absence de lésions visuelles empêche la saisie de la viande (Guénégan, 2009).

Il est nécessaire de souligner l'importance de l'âge dans le développement de lésions de myosite éosinophilique responsable de saisie à l'abattoir. Cependant, le facteur de risque principal de la sarcosporidiose bovine concerne les exploitations où le cycle parasitaire est entretenu. Des moyens de lutte devront être mis en œuvre dans ces exploitations.

## **E)Diagnostic**

### **1. Chez les bovins**

Les méthodes permettant la mise en évidence du parasite, directement ou indirectement, peuvent être mises en œuvre du vivant de l'animal ou après sa mort.

### *a. Du vivant de l'animal*

Le diagnostic clinique de la sarcosporidiose bovine est quasiment impossible du fait de la non spécificité des signes cliniques voir de leur absence. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la sarcosporidiose aigüe se manifeste par une température élevée, une perte de poids, de l'anorexie, des avortements, de la diarrhée, une léthargie, de la faiblesse, et des perturbations neurologiques (Savini *et al.*, 1995). La sarcosporidiose chronique, quant à elle, se traduit par une perte de poids et d'appétit ce qui est impossible à objectiver pour le clinicien.

Plusieurs techniques immunologiques ont été développées pour le diagnostic sérologique des infections à sarcocystes chez les bovins.

Une étude de Savini *et al.* en 1997 a comparé la sensibilité et la spécificité de deux tests ELISA pour le dépistage de *Sarcocystis* spp. Le premier test ELISA utilise des antigènes de mérozoïtes de *Sarcocystis cruzi* et le deuxième des antigènes de bradizoïtes. L'étude a montré que la sensibilité des deux tests était similaire, respectivement 98 et 95 %. En revanche, la spécificité est plus élevée pour le test basé sur les antigènes de mérozoïtes : 97 % qu'avec les bradizoïtes : 84 %. Ainsi, cette étude a permis de conclure à la haute spécificité et sensibilité du test ELISA basé sur les antigènes de mérozoïtes ce qui ouvre des possibilités dans les études épidémiologiques sur la sarcosporidiose en dépistant les animaux infectés ou non-infectés.

Cependant, l'intérêt du dépistage sérologique est à moduler. En effet, un grand nombre d'animaux en stade précoce d'infection peuvent être positifs sans présenter de kystes intramusculaires. Ensuite, le dépistage sérologique ne permet pas l'identification de l'espèce car la préparation d'antigène n'est pas spécifique d'une espèce (Savini *et al.*, 1997). Enfin, la possibilité de réactions croisées chez des animaux atteints de toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*) ne peut pas être exclue dans 3 à 4 % des cas (Euzéby, 1998).



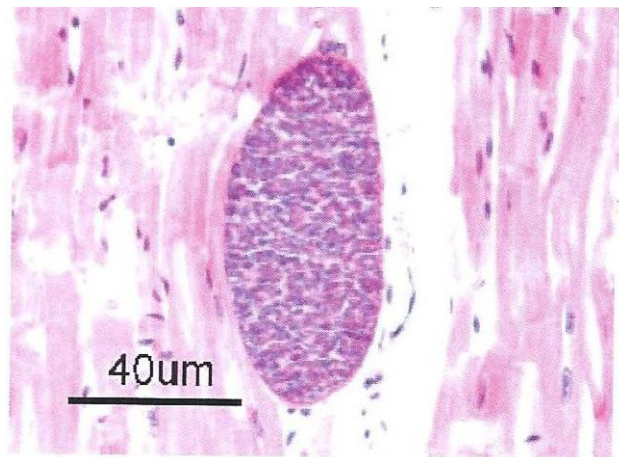
## *b. Lorsque l'animal est mort*

### *i. Diagnostic morphologique*

En cas de sarcosporidiose aiguë, il faut rechercher des lésions musculaires hémorragiques avec des ponctuations verdâtres et réaliser un prélèvement au niveau de ces lésions afin de réaliser une analyse histologique pour l'observation directe du parasite ou un test ELISA basés sur les antigènes de bradizoïtes (Euzéby, 1998).

A l'histologie, l'observation des parasites dans plusieurs muscles squelettiques est possible mais parfois une dégénérescence des kystes parasitaires peut être observée. Dans le cas de la sarcosporidiose chronique, les kystes sont plutôt observés dans les muscles squelettiques et le cœur (Tenter, 1995).

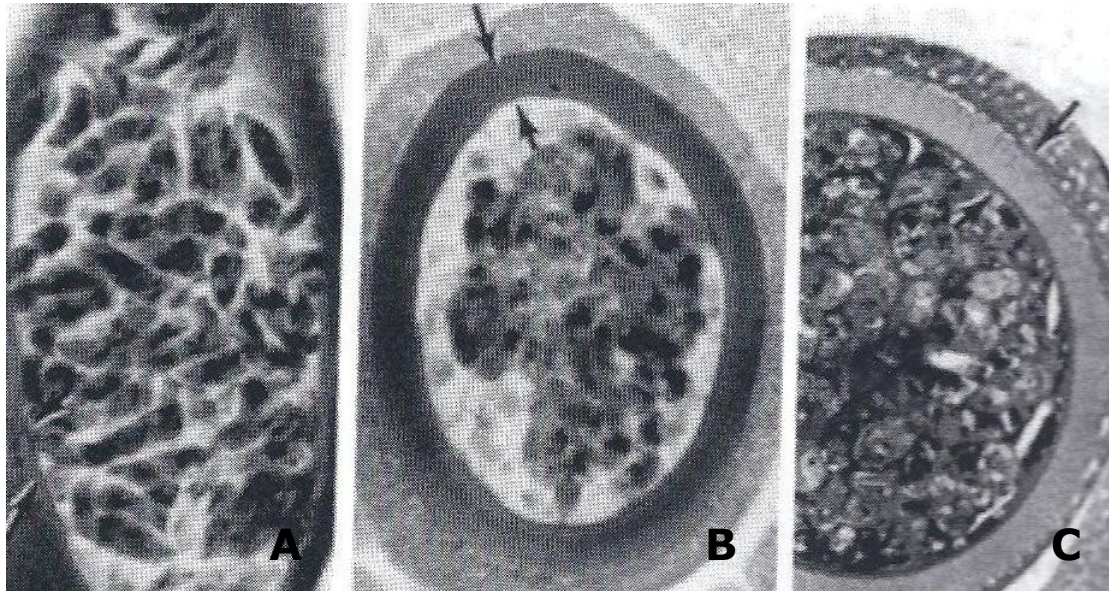
Le diagnostic morphologique se fait par l'observation d'un échantillon musculaire après digestion enzymatique (cf. figure 5). L'identification est basée sur l'examen morphologique de la paroi au microscope. En effet, chaque espèce a une paroi ayant des caractéristiques ultra-structurales qui lui sont propres. Actuellement, trente-sept types de parois différents ont été découverts (Lian-Young *et al.*, 2007).



**Figure 5 : Sarcocyste à paroi mince observé au microscope (x200), (Mary, 2005).**



Les trois espèces responsables de la sarcosporidiose bovine peuvent ainsi être différenciées par cette méthode (cf. figure 6). En effet, La paroi de *Sarcocystis cruzi* est très fine (<1 µm), celles de *Sarcocystis hirsuta* et de *Sarcocystis hominis* sont plus épaisses (2/7 µm) et sont difficilement différenciables au microscope (Wouda *et al.*, 2006).



Les flèches indiquent les faces interne et externe de la paroi. [(A) et (C) : bleu de toluidine, (B) PAS, grossissement x1000].

**Figure 6 : Parois de sarcocystes de *S. cruzi* (A), *S. hirsuta* (B), et *S. hominis* (C) observées au microscope photonique (Dubey *et al.*, 1989b).**

L'avantage de cette méthode est qu'elle peut être réalisée même après la congélation du prélèvement. En effet, une étude portant sur les effets de la congélation sur les caractéristiques de la paroi des sarcocystes montre qu'il n'y a pas de modification de la structure. Deux protocoles ont été testés : congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 3 jours et pendant 30 jours, puis les prélèvements ont été observés au microscope en comparaison avec des prélèvements frais. Les résultats montrent une perte d'activité des bradizoïtes accompagnée d'une dégénérescence. Ainsi, ils perdent leur pouvoir infectieux mais la structure de la paroi est conservée permettant l'utilisation de l'échantillon pour l'identification taxonomique (Lian-Young *et al.*, 2007).

Bien que le diagnostic morphologique soit très spécifique, son application est limitée à quelques échantillons car c'est une méthode fastidieuse et coûteuse (More *et al.*, 2010). De plus, elle ne permet pas l'identification précise de l'espèce car il est impossible de différencier *S. hirsuta* de *S. hominis* (Vangeel *et al.*, 2007). Enfin, c'est une méthode qui manque de sensibilité car l'histologie ne permet pas l'analyse d'une grande surface musculaire (Tenter, 1995).

## ii. Diagnostic moléculaire

Les méthodes de diagnostic moléculaire apparaissent comme étant un important outil en recherche épidémiologique pour la sarcosporidiose bovine. Plusieurs études utilisent la PCR basées sur l'analyse de l'ADN ribosomal 18S (MORE *et al.*, 2010) et ont démontré que c'était un bon marqueur pour la différenciation des espèces de *Sarcocystis* spp. (YANG *et al.*, 2002).

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique permettant l'amplification de l'ADN. Cette technique semble appropriée pour l'identification de sarcocystes car elle donne les mêmes résultats que l'analyse morphologique ou le séquençage ADN (YANG *et al.*, 2002). De plus, elle permet d'analyser une grande quantité d'échantillons en peu de temps.

C'est cette technique que nous utiliserons dans notre étude, nous la détaillerons plus longuement dans la partie expérimentale.

## 2. Chez l'hôte définitif

Le diagnostic chez les hôtes définitifs : chien, chat, homme est basé sur l'identification de sporocystes ou d'ookystes dans les fèces. Cependant, l'identification morphologique est très rarement envisageable (Xiang *et al.*, 2009).

Chez l'homme, le diagnostic de sarcosporidiose intestinale est orienté par les symptômes et la consommation récente de viande peu cuite ou crue. Le diagnostic définitif porte sur la détection de sporocystes excrétés 14 à 15 jours après l'ingestion de la viande contaminée (Deportes-Livage *et al.*, 2005).

## **F) Prophylaxie**

Actuellement, il n'existe aucune prophylaxie médicale spécifique de la sarcosporidiose chez les bovins (Bucca *et al.*, 2011). Néanmoins, en cas de suspicion de sarcosporidiose aiguë, des traitements anti-coccidiens classiques peuvent être mis en place. Les molécules utilisées sont les suivantes : l'amprolium, la salinomycine, l'oxytétracycline, le totrazuril ou l'hydroxynaphtoquinone (Euzéby, 1998).

De même, il n'y a pas de traitement prophylactique spécifique connu, ni de traitement curatif pour la sarcosporidiose intestinale chez l'homme (Deportes-Livage *et al.*, 2005). Un traitement classique contre les coccidioses peut être mis en place lors d'absence de réaction du système immunitaire (Euzéby, 1998).

Le seul moyen de lutte est la mise en place d'une prophylaxie sanitaire aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

Dans les élevages de bovins, la lutte contre l'excrétion d'ookystes par les hôtes définitifs est la seule solution (Bucca *et al.*, 2011). Les mesures de biosécurité en élevage sont donc fondamentales comme par exemple l'exclusion des carnivores domestiques et sauvages. La mise en place de bonnes pratiques d'hygiène est essentielle pour éviter la contamination de l'eau et des aliments par les matières fécales des hommes, des chiens et des chats (Fayer, 2004).

Chez l'homme, il faut conseiller de cuire correctement la viande à cœur ou encore de la congeler avant consommation pour que le parasite perde son pouvoir infectieux et ne pas

consommer de viande suspecte (Fayer, 2004). En effet, les viandes parasitées conservent leur pouvoir infectieux pendant plusieurs semaines voir plusieurs mois. Les kystes sarcosporidiens vont être détruits par la chaleur : cuisson à cœur (65/70 °C) pendant 30 minutes ou par la congélation : - 5°C pendant 24 heures ou - 20°C pendant 10 heures (Euzéby, 1998).

Ainsi, la lutte contre cette maladie passe avant tout par l'éducation à la fois des éleveurs et des consommateurs.

## **G) Importance de la sarcosporidiose bovine**

### **1. Prévalence**

La sarcosporidiose est une affection très fréquente chez les bovins à l'échelle mondiale. En effet, en Italie, une étude récente estime que la sarcosporidiose varie entre 54 % et 94,5% (Bucca *et al.*, 2011). Dès 1989 en Belgique, une analyse de muscles provenant de 100 bovins abattus, montrait un taux d'infection de 97 % (Vercruyssen *et al.*, 1989) ce qui a aussi été démontré plus récemment par la thèse de Nathalie MARY en France en 2005 où le portage de *Sarcocystis* spp. est de 97 % pour 37 bovins étudiés. Enfin dans le Sud de la Chine, la prévalence de *Sarcocystis* spp. est proche de 100% dans les troupeaux de bovins et de buffles sauvages (Xiang *et al.*, 2011). De façon générale, dans beaucoup de régions du monde, la prévalence de *Sarcocystis* spp dans le muscle de bovin adulte est aux alentours de 100 %.

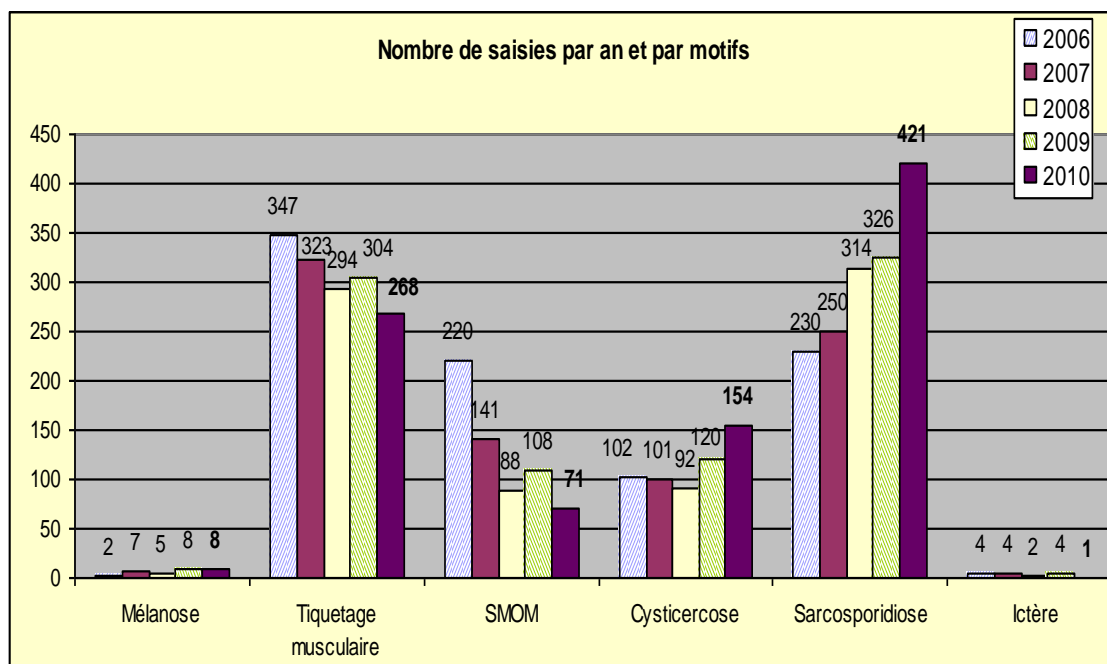
## 2. Importance médicale

Cette maladie omniprésente dans le cheptel mondial a une faible importance médicale. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la sarcosporidiose bovine est généralement considérée comme une affection asymptomatique non pathogène des bovins sauf dans certains cas où l'apparition de signes cliniques non spécifiques associée à une perte de production est observée surtout avec *S. cruzi*. Cette maladie peut aussi entraîner dans certains cas des lésions musculaires caractérisées par une myosite éosinophilique (Bucca *et al.*, 2011) qui entraînera lors de l'inspection post-mortem à l'abattoir une saisie partielle ou totale pour « lésions de sarcosporidiose ».

## 3. Importance économique

La sarcosporidiose bovine entraîne des pertes économiques considérables notamment à cause des lésions de myosite éosinophilique et des saisies à l'abattoir. En 1986 aux Etats-Unis, les pertes économiques étaient estimées à 95 millions de dollars/an (Dauguschies *et al.*, 2000). Pour palier ces pertes, les éleveurs peuvent être indemnisés par des groupements de défense sanitaire ou d'autres groupements professionnels si l'éleveur est adhérent.

En France, les saisies pour sarcosporidiose bovine sont en fait des saisies pour myosite éosinophilique. L'étude de Fradin en 2003 portant sur la prévalence des différents motifs de saisies dans huit abattoirs français montre un taux de saisie d'environ 2,32 % pour sarcosporidiose sur l'ensemble des saisies totales en France. La majorité des saisies étant totale, l'impact économique est réel. De plus, comme le montre l'étude réalisée par Bovi-Loire en 2011, le nombre de saisie pour sarcosporidiose a quasiment doublé dans la région Pays de la Loire en 5 ans, passant de 230 en 2006 à 421 en 2010 (cf. figure 7).



Tiquetage musculaire : purpura d'abattage

SMOM : Sclérose Musculaire d'Origine Métabolique

**Figure 7 : Nombre de saisies à l'abattoir par an et motifs (Bovi-Loire, 2011)**

Pour aider les éleveurs, il existe des groupements d'interprofessions tels que Bovi-Loire dans la région Pays de la Loire qui indemnise les éleveurs lorsqu'un de leurs bovins a été saisi pour sarcosporidiose ou d'autres motifs référencés à partir du Fond d'Assainissement Régional (F.A.R.). Les éleveurs cotisent 1 euros par carcasse et lors de saisie pour sarcosporidiose par exemple, ils sont indemnisés à 80 % de la valeur de la carcasse, soit 1 908 euros pour une carcasse de 2 385 euros correspondant au prix moyen d'une carcasse de Blonde d'Aquitaine d'environ 600 kg.

La sarcosporidiose bovine représente ainsi 504 000 euros de remboursement par an par Bovi-Loire sachant que le remboursement ne représente que 80 % de la valeur réelle. Si le F.A.R. n'existait pas cela représenterait 604 800 euros de perte pour la filière sans compter les frais d'élevage des bovins. De plus, dans 90 % des cas en 2010, la saisie a été totale entraînant la perte de la valeur de la carcasse. Pour les éleveurs allaitants, la perte est estimée à environ 2 385 euros par carcasse. Pour les élevages laitiers, les conséquences économiques sont moindres car la plupart du temps les carcasses sont mal classées du fait de leur mauvaise

conformation bouchère (environ 600 euros pour une carcasse de 300 kg) et ne représente pas le seul revenu de l'élevage contrairement à l'élevage allaitant.

Même en absence de saisie, la sarcosporidiose chronique entraîne une perte de poids et une diminution du gain de croissance ce qui sera préjudiciable à l'éleveur lors de l'abattage de l'animal. En revanche, la qualité de la viande n'est pas altérée par la présence du parasite s'il n'y a pas de lésions de myosite éosinophile et d'inflammation associées (Dauguschies *et al.*, 2000).

L'augmentation du nombre de saisies pour sarcosporidiose et le coût engendré justifie le désir de la filière viande bovine en France de mettre en place des méthodes de lutte et de prévention.

#### 4. Importance en santé publique

La sarcosporidiose bovine à *Sarcocystis hominis* provoque chez l'homme une coccidiose intestinale mineure. D'un point de vue de santé publique, des données sur la prévalence de *S. hominis* dans les troupeaux sont nécessaires et doivent être contrôlés surtout dans les pays où l'on mange beaucoup de viande crue ou peu cuite (Vangeel *et al.*, 2007).

La prévalence de cette maladie chez l'homme est très largement sous-estimée du fait de la symptomatologie. Quelques cas sont rapportés en Europe : en 1989, l'examen d'échantillons fécaux d'enfants polonais et allemands montre une positivité de 10,4 % et de 7,3 % respectivement (Desportes-Livage *et al.*, 2005). De même, en France, 4 à 32 % des individus ayant fait l'objet d'examen micro-coprosopiques se sont révélés excréteurs de sporocystes de *Sarcocystis* spp. (Euzéby, 1998).

C'est d'autant plus important que d'après le règlement 854/2004, aucune viande parasitée ne doit être destinée à la consommation humaine, or la présence du parasite est la plupart du temps asymptomatique et invisible à l'œil nu. Une grande quantité de viande

parasitée est ainsi consommée chaque jour (Bucca *et al.*, 2011). Une étude réalisée par Vangeel *et al.*, en 2006 en Belgique a montré que sur 67 steaks hachés provenant de magasins différents, 63 contenaient des sarcocystes dont 97,4 % correspondaient à *S. hominis*. Ces résultats montrent l'enjeu que représente la sarcosporidiose bovine pour la santé publique.

Notre étude financée par Bovi-Loire a plusieurs objectifs. Le premier objectif est de détecter des sarcocystes grâce à la PCR dans des lésions de myosite éosinophilique afin d'apporter des données complémentaires sur la connaissance de la relation entre la sarcosporidiose bovine et les myosites éosinophiliques. Puis, dans un second temps, l'objectif sera de préciser l'espèce impliquée en cas d'échantillons positifs.

Les résultats obtenus vont nous permettre de savoir si la présence macroscopique de lésions peut être utilisée comme un indicateur de la présence de sarcocystes. Enfin, l'identification de l'espèce permettra d'orienter les mesures de prophylaxie à mettre en place pour la protection de la santé humaine et la diminution des pertes économiques.



**2<sup>ème</sup> partie : ETUDE  
EXPERIMENTALE**



Comme nous l'avons vu précédemment, la sarcosporidiose bovine est étroitement liée au développement des myosites éosinophiliques. Notre étude comporte plusieurs objectifs. Dans un premier temps, elle consiste à mettre en évidence la présence de sarcocystes dans des muscles présentant des lésions de myosite éosinophilique et ainsi d'étudier l'implication de *Sarcocystis* spp. dans ces lésions responsables de la saisie à l'abattoir. Dans un deuxième temps, le séquençage permettra d'identifier les espèces présentes dans ces lésions ce qui orientera la mise en place de mesures prophylactiques.

## **A. Matériels et méthodes**

### **1. Echantillonnage**

Les prélèvements ont été réalisés par le vétérinaire de Bovi-Loire. Plusieurs abattoirs de bovins de la région Pays de la Loire sont concernés par cette étude : Les Herbiers, Le Lyon d'Angers, Challans, La Roche/Yon, Cherré, Cholet, Laval, Sable sur Sarthe et Chateaubriant.

Lorsque Bovi-Loire reçoit un avertissement de saisie pour sarcosporidiose, le vétérinaire se déplace pour constater s'il s'agit bien de sarcosporidiose. Puis en cas de confirmation, il réalise un prélèvement sur le muscle présentant la lésion, accompagné d'un prélèvement sur le diaphragme du même animal. Les prélèvements pèsent environ 200 g et sont réalisés à l'aide d'un scalpel à usage unique sans condition de stérilité, le même scalpel étant utilisé pour un seul animal. Au total, 141 carcasses présentant des lésions ont été prélevées entre 2009 et 2010.

De manière à constituer une population témoin composée d'animaux ne présentant pas de lésions de myosite éosinophilique, des bovins ne présentant pas de lésions macroscopiques ont été choisis parmi des saisies pour autre motif que la sarcosporidiose. La destination de ces carcasses était la catégorie 3 des sous-produits animaux de l'abattoir d'après le règlement

européen 1069/2009. Le choix a été réalisé au hasard sans tenir compte de la race, du poids ou du classement de l'animal. Le prélèvement a été effectué au niveau du diaphragme pour 15 bovins, et dans 7 cas au niveau des muscles du collier. Le même protocole que ci-dessus est utilisé pour la réalisation du prélèvement. Le diaphragme est un prélèvement de choix car il est réputé être un site d'élection du parasite. Le tableau II récapitule les différents échantillons analysés.

Ensuite, les échantillons ont été stockés au congélateur à une température de  $-20^{\circ}\text{C}$  et enregistrés avec toutes les données de l'animal : numéro d'identification, numéro de tuerie, sexe, race, âge, poids et conformation.

**Tableau II : Répartition des différents échantillons de l'étude**

Prélèvements	Lésions	Diaphragme	Muscles du collier	Total
Bovins avec lésions	133	116		249
Bovins sans lésions		15	7	22
Total	133	131	7	271

Parmi les bovins présentant des lésions de myosite éosinophilique, la lésion et le diaphragme correspondant ont été analysés pour 108 animaux, pour 33 animaux un seul prélèvement (diaphragme ou lésion) a été analysé.

## 2. Digestion enzymatique des échantillons

Selon une technique optimisée préalablement au laboratoire d'Hygiène et Qualité des Aliments à ONIRIS Nantes, les échantillons sont mis à décongeler doucement 24 heures avant l'étape de digestion enzymatique au réfrigérateur à  $4^{\circ}\text{C}$ . Chaque échantillon est préparé de la même façon. Deux cent grammes de muscle sont d'abord prélevés et broyés avec un mixeur à

viande électrique. Puis, 20 g du muscle haché sont mélangés à 100 mL d'une solution afin de réaliser une digestion artificielle (voir annexe 1 pour la préparation). Le mélange broyat de muscle/solution de digestion est placé dans un flacon au bain marie avec agitation pendant 30 minutes. Le contenu du flacon est alors filtré à l'aide d'un tamis de 400 µm permettant le passage des sarcocystes. Le filtrat est alors placé dans une ampoule à décantation pendant 30 minutes. Enfin, le culot de décantation, où se trouve les sarcocystes s'ils sont présents, est récupéré et réparti dans 5 tubes de 1,5 mL qui sont stockés au congélateur à - 20 °C en attente de l'extraction de l'ADN. Du fait de la digestion enzymatique, seuls les bradizoïtes sont visibles au microscope.

### 3. Extraction de l'ADN

Un tube de chaque échantillon est mis à décongeler 20 minutes avant le début des manipulations. Puis, nous avons utilisé un kit d'extraction « NucleoSpin® Tissue » (Macherey Nalgen). L'objectif de cette étape est de récupérer l'ADN des sarcocystes s'ils sont présents associé à l'ADN cellulaire. L'utilisation de plusieurs réactifs telle que la protéinase K permet la lyse des cellules et ainsi la libération de l'ADN. Ensuite, le mélange est placé dans des colonnes possédant une membrane en silice. Après centrifugation, l'ADN se fixe sur cette membrane et les autres constituants sont éliminés dans des tubes collecteurs. Après plusieurs lavages pour bien éliminer tous les autres constituants, un éluant à 70 °C est versé sur la membrane afin de désolidariser l'ADN qui est récupéré ensuite dans le tube collecteur. Une fois les manipulations terminées, les extraits sont placés au congélateur à - 20°C (voir annexe 2 pour le détail du protocole).

#### 4. PCR et détection de l'ADN de *Sarcocystis* spp.

Enfin, l'étape la plus importante est l'amplification de l'ADN par PCR puis la détection de ce dernier permettant la mise en évidence de *Sarcocystis* spp.

Les échantillons sont répartis dans des tubes PCR auquel on ajoute le Master mix qui contient tous les réactifs nécessaires à la PCR. En plus des échantillons à tester, deux témoins sont utilisés : de l'eau qui représente le témoin négatif et un échantillon contenant de l'ADN de sarcocystes qui représente le témoin positif. L'utilisation de ces témoins nous permet de valider l'étape de la PCR (voir annexe 3 pour les détails du protocole).

Les échantillons sont ensuite placés dans un thermocycleur iCycler de BIORAD® où le programme suivant est réalisé :

- 1 cycle à 94 °C pendant 4 minutes
- 40 cycles : 94 °C pendant 1 minute, 63 °C pendant 1 minute, 72 °C pendant 1 minute
- 1 cycle à 72 °C pendant 10 minutes
- Refroidissement et maintien à 14 °C

Ensuite, une électrophorèse est réalisée pour détecter l'ADN. Chaque produit de PCR est placé dans un puits avec un tampon de migration. Puis la migration se fait pendant 45 minutes à 110 volts et 400 mA. Enfin, le gel d'électrophorèse est placé sous lumière UV et observé grâce à une caméra reliée à un ordinateur avec le logiciel Quantity one®. Les échantillons positifs présentent une bande blanche au niveau de 160/180 bpm.

Pour la PCR, nous utilisons deux amorces SAR forward (5'-TGGCTAATACATGCGCAAATA – 3') et SAR reverse (5' – AACTTGAATGATCTATCGCCA – 3') qui permettent l'amplification d'une zone d'ADN ribosomal 18S des trois espèces cibles de sarcocystes (cf. tableau III). La taille des séquences amplifiées est de 164 bp pour *Sarcocystis hominis*, 172 bp pour *Sarcocystis cruzi* et 186 bp pour *Sarcocystis hirsuta* (Vangeel *et al.*, 2006). Les amorces ont été fournis par EUROBIO Laboratoires (Courtaboeuf, France).

**Tableau III : localisation des amorces et caractéristiques des séquences de l'ADNr 18 S amplifié (Vangeel *et al.*, 2006).**

Espèces	Numéro GenBank	Position de l'amorce SARf	Position de l'amorce SARr	Taille de l'amplicon (bp)
<i>S. cruzi</i>	AF017120	152-172	303-323	172
<i>S. hirsuta</i>	AF017122	163-183	328-348	186
<i>S. hominis</i>	AF006470	88-108	231-251	164

## 5. Séquençage

Lors de résultats positifs à la PCR, les extraits d'ADN des échantillons ont été testés une seconde fois à la PCR et amplifiés deux fois afin d'obtenir une concentration optimale d'ADN pour le séquençage. Ensuite, les produits de la PCR ont été dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop® afin de connaître la concentration en ADN. Puis une dilution est réalisée afin d'obtenir une concentration inférieure à 50 ng/μL. Ensuite les produits PCR sont répartis dans une plaque de 96 puits à raison de 20 μL par puits. La plaque est ensuite envoyée au laboratoire GATC BIOTECH spécialisé dans le séquençage. Une fois les résultats obtenus, les séquences sont analysées avec un logiciel d'alignement de séquences (BLAST disponible sur internet sur NCBI) et qui compare la séquence avec la banque de données GenBank.





## **B. Résultats**

### **1. Population d'étude**

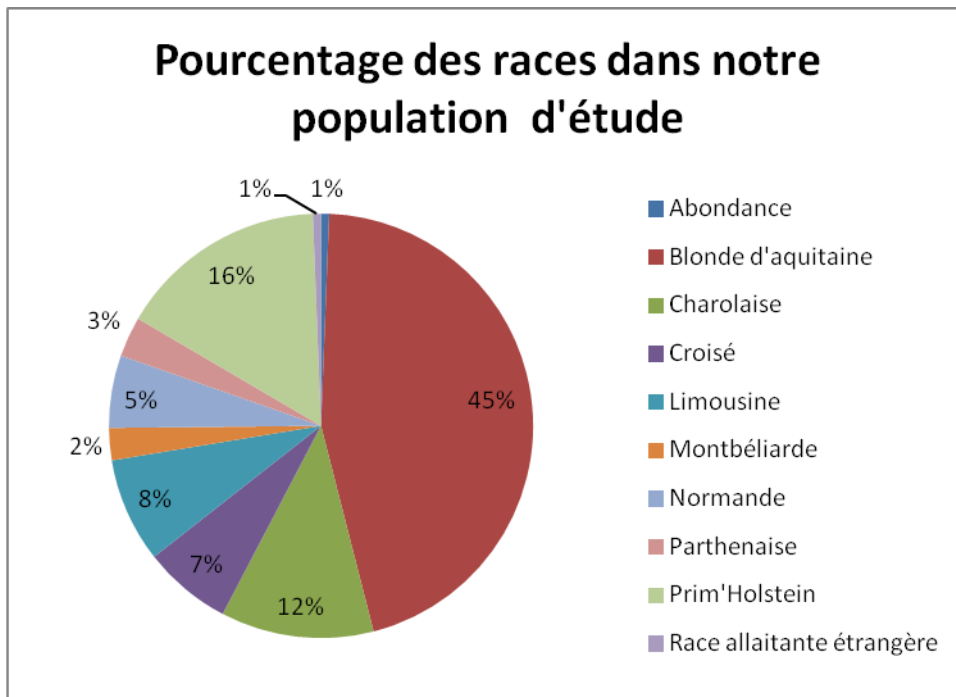
L'étude a porté sur l'analyse de 271 prélèvements provenant de 163 animaux. 108 carcasses saisies pour myosite éosinophilique ont fourni deux prélèvements comme prévu. Cependant pour 33 animaux saisis pour myosite éosinophilique, un seul prélèvement sur les deux a été analysé par PCR, suite à des soucis d'identification.

Parmi les 163 animaux, il y a 22 bovins ne présentant aucune lésion de myosite éosinophilique mais qui étaient saisis pour un autre motif et constituent la population témoin.

Presque toutes les carcasses présentant des lésions ont été saisies en totalité sauf pour 5 où la saisie a été partielle.

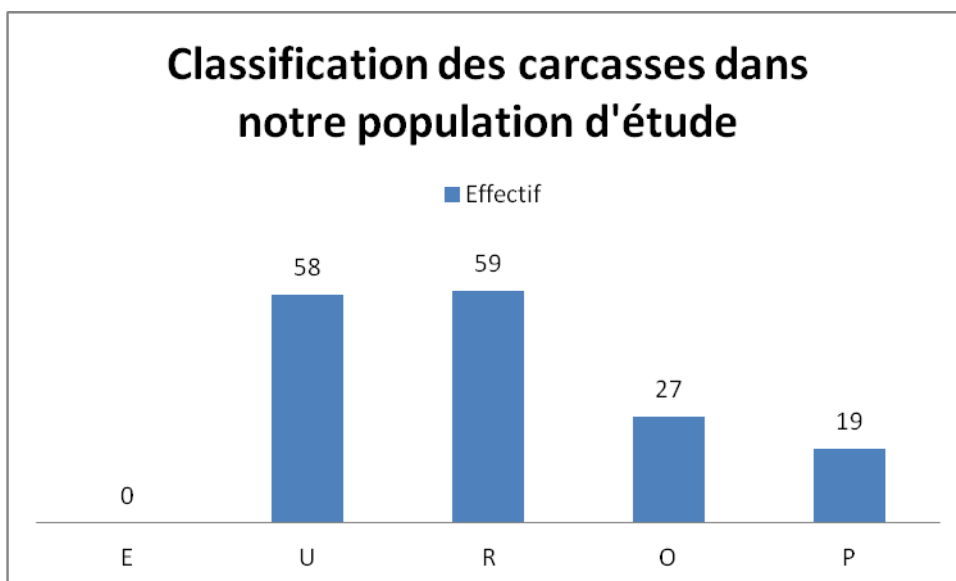
Notre population d'étude ne nous permet pas d'étudier l'influence du sexe car la totalité des échantillons proviennent de femelles. Nous y reviendrons dans la partie discussion.

Enfin, nous pouvons constater à l'aide de la figure 8 que la race Blonde d'Aquitaine (45 %) est largement représentée dans notre population, ainsi que la Prim'holstein (16 %) et la Charolaise (12 %). Ce premier résultat conforte le fait que la Blonde d'Aquitaine est une race à risque vis-à-vis de la myosite éosinophilique. Par contre, la race Charolaise arrive en troisième position, bien que lors de l'étude bibliographique, nous l'avons décrite comme une race ne présentant qu'exceptionnellement ce type de lésion.



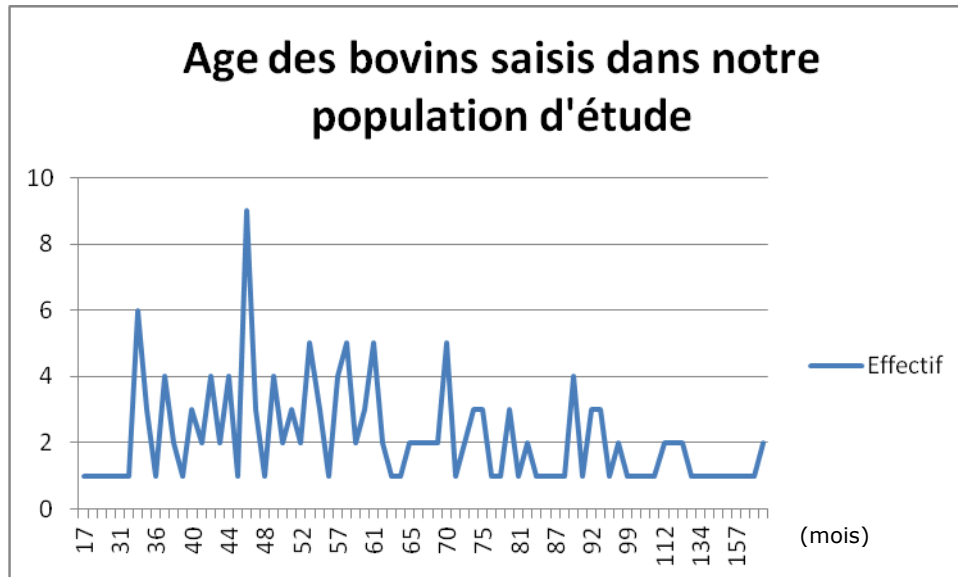
**Figure 8 : Pourcentage des races présentes dans notre population d'étude.**

D'après le système de classification de l'abattoir SEUROP sur la conformation et la qualité des carcasses, notre population d'étude est représentée par des carcasses d'une assez bonne qualité de catégorie U et R car la majorité des bovins affectés proviennent d'élevage allaitant et sont élevés pour leur qualité bouchère (cf. figure 9).



**Figure 9 : Classification des carcasses dans notre population d'étude.**

La figure 9 souligne l'importance économique de cette affection musculaire car le revenu des éleveurs est basé sur cette classification et est proportionnelle au classement : les carcasses E étant les plus rémunérées, les P les moins rentables.



**Figure 10 : Age des bovins saisis dans notre population d'étude.**

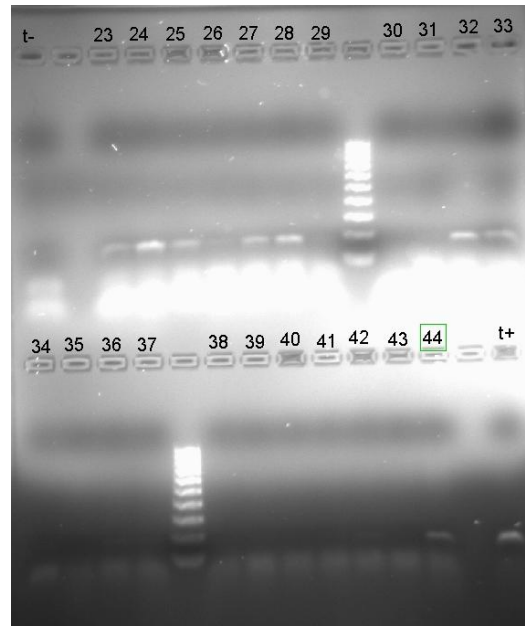
L'âge semble avoir peu d'influence sur le développement de lésion de myosite éosinophilique. En effet, la figure 10 montre une hétérogénéité dans l'âge d'abattage. On peut souligner néanmoins la présence de deux pics à 34 et 46 mois représentant respectivement 6 et 9 animaux.

## 2. Résultat de l'étude expérimentale

Voici, l'image (cf. figure 11) que nous observons le plus fréquemment après l'amplification par PCR et la migration. L'observation du gel d'électrophorèse se fait sous rayon ultra-violet et l'image est visualisée sur un ordinateur relié à une caméra grâce au logiciel Quantity one®. Le témoin négatif (l'eau) ne présente aucune bande, contrairement au témoin positif. Cette bande que l'on retrouve chez plusieurs échantillons révèle la présence d'ADN de *Sarcocystis* spp. mais ne permet pas d'identifier l'espèce car on manque de

précision au niveau du poids moléculaire. On voit seulement qu'elle est située entre 160 et 180 bpm environ grâce au marqueur.

Les échantillons présentant une bande visible sont considérés comme étant positif, ce qui signifie que l'ADN du parasite a bien été amplifié. Ainsi, tous les échantillons positifs sont porteurs de *Sarcocystis* spp. (voir l'annexe 4 pour l'ensemble des images).



t - : négatif	29 : négatif	36 : positif	42 : positif
23 : positif	30 : négatif	37 : négatif	43 : négatif
24 : positif	31 : négatif	38 : négatif	44 : positif
25 : positif	32 : positif	39 : négatif	t + : positif
26 : négatif	33 : positif	40 : négatif	
27 : positif	34 : négatif	41 : négatif	
28 : positif	35 : négatif	41 : négatif	

**Figure 11 : Gel d'électrophorèse observé sous UV après migration des amplifiats de la PCR.**

Les 271 échantillons de l'étude ont tous été analysés avec cette méthode. Les résultats sont résumés dans le tableau IV.

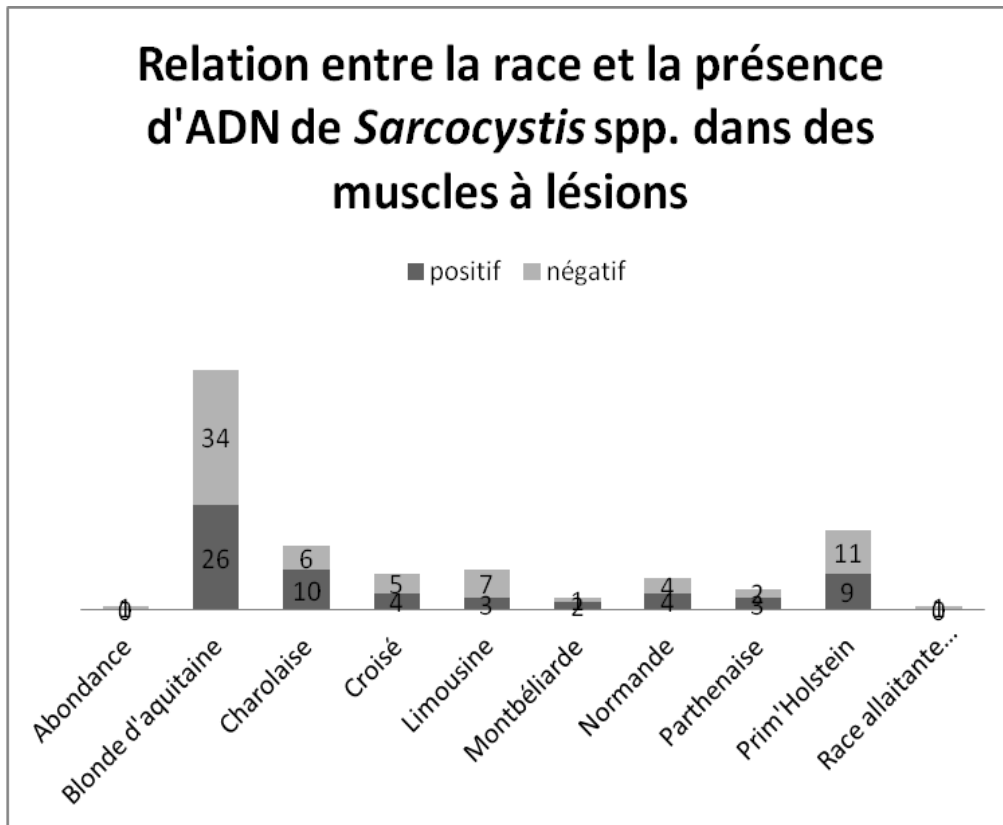
**Tableau IV : Synthèse des résultats obtenus à la PCR en fonction des échantillons.**

		Résultats à la PCR	
		Positifs	Négatifs
Bovins avec lésion de myosite éosinophilique (n=141)	Muscle présentant la lésion	61	72
	Diaphragme	25	91
Bovins sans lésion de myosite éosinophilique (n=22)	Diaphragme	3	12
	Muscle du collier	0	7

Ainsi, 61 muscles présentant une lésion de myosite éosinophilique sont porteurs d'ADN de *Sarcocystis* spp. ce qui représente un pourcentage de 46 % sur la totalité des muscles avec lésion. C'est un résultat important car il reflète le portage réel du parasite dans le muscle présentant une lésion de myosite éosinophilique et montre que dans ces muscles, le parasite est présent environ une fois sur deux. Chez les bovins saisis pour lésion de myosite éosinophilique, l'ADN de *Sarcocystis* spp. est détecté dans le diaphragme de 21,6 % (25/116) des cas. Enfin, parmi la population de bovin sans lésion de myosite éosinophilique, l'ADN de *Sarcocystis* spp. a été détecté chez 3 animaux au niveau du diaphragme sur les 22 analysés, ce qui représente 13,6 % de la population des animaux sans lésions.

Au total, sur les 271 échantillons analysés, 89 ont été positifs à la PCR. La détection de l'ADN de *Sarcocystis* spp. dans notre population d'étude est donc de 32,8 %.

- Etude des échantillons présentant des lésions de myosite éosinophilique



**Figure 12 : Relation entre la race et la présence d'ADN de *Sarcocystis* spp. dans des muscles à lésions.**

La figure 12 nous permet de constater la prédominance de la Blonde d'Aquitaine, suivi de la Prim'Holstein, de la Charolaise et de la Limousine. La Blonde d'Aquitaine représente, à elle seule, 60 échantillons sur 133 provenant de lésions visibles macroscopiquement. Ce résultat confirme la prédisposition de cette race à développer des lésions de myosite éosinophilique et l'enjeu de la sarcosporidiose bovine pour ses éleveurs.

Pour étudier la relation entre la race et la présence du parasite dans les muscles à lésion de myosite éosinophilique, il est intéressant de réaliser un test de  $\chi^2$  qui nous permet de conclure sur l'indépendance de ses deux critères. Le principe est de comparer notre population d'étude avec une population théorique où la race et le pourcentage de positif sont indépendants.

Population étudiée

Race	positif	négatif	total
Abondance	0	1	1
Blonde d'aquitaine	26	34	60
Charolaise	10	6	16
Croisé	4	5	9
Limousine	3	7	10
Montbéliarde	2	1	3
Normande	4	4	8
Parthenaise	3	2	5
Prim'Holstein	9	11	20
Race allaitante étrangère	0	1	1

Population théorique

Race	positif	négatif	total
Abondance	0.459	0.541	1
Blonde d'aquitaine	27.519	32.481	60
Charolaise	7.338	8.662	16
Croisé	4.128	4.872	9
Limousine	4.586	5.414	10
Montbéliarde	1.376	1.624	3
Normande	3.669	4.331	8
Parthenaise	2.293	2.707	5
Prim'Holstein	9.173	10.827	20
Race allaitante étrangère	0.459	0.541	1

Pour calculer le  $\chi^2$  observé, il faut utiliser cette formule, le O représente la valeur observée et le E la valeur théorique obtenue lorsque l'on considère les deux critères indépendants.

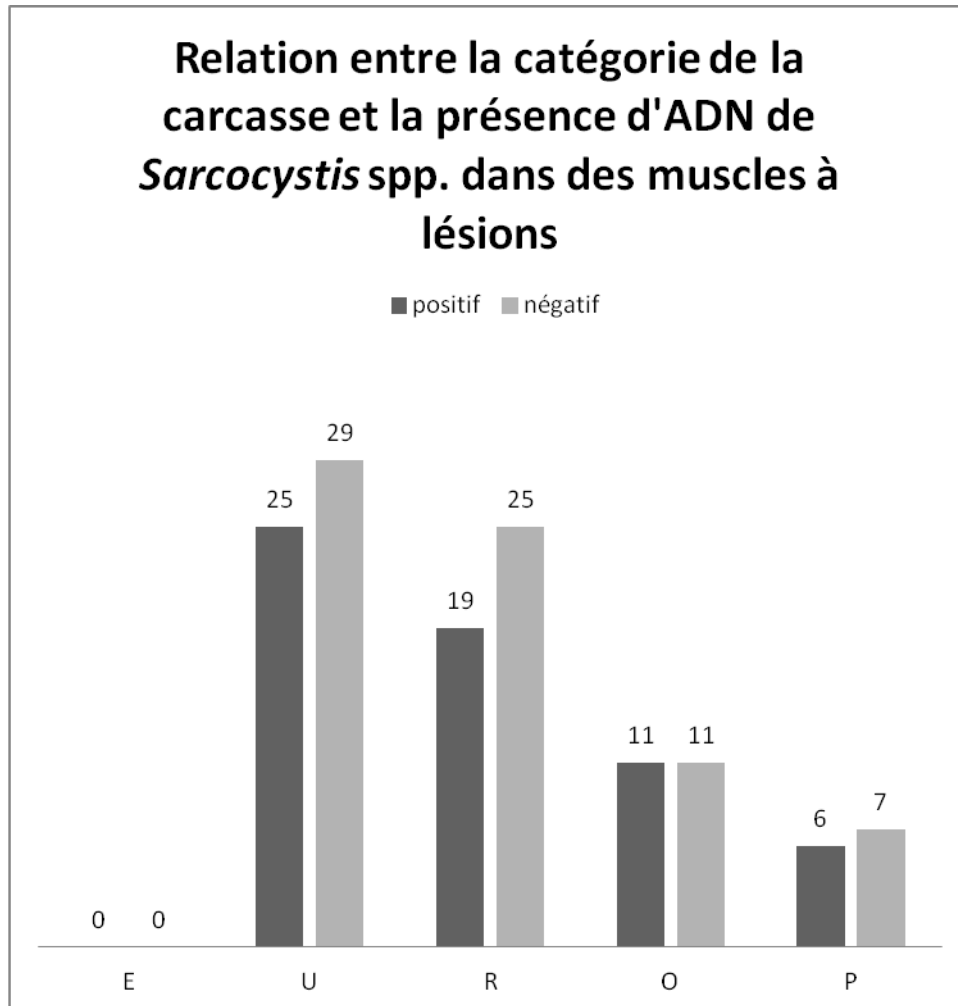
$$\chi^2 = \sum_{i,j} \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

On obtient alors  $\chi^2$  observé = 5,642 avec un degré de liberté de 9.

Si on prend un risque de 5 %, la valeur critique donnée par les tables est  $\chi^2$  critique = 14,68

Ainsi  $\chi^2$  observé <  $\chi^2$  critique, la race et la présence d'ADN de *Sarcocystis* spp. sont indépendants.

Ainsi, d'après ce test il n'y a pas de race prédisposée à être porteur *Sarcocystis* spp. dans les lésions de myosite éosinophilique et pour chaque race, la proportion d'échantillons positifs est similaire à la proportion d'échantillons positifs dans la population d'ensemble, soit environ 50 %.



**Figure 13 : Relation entre la catégorie de la carcasse et la présence d'ADN de *Sarcocystis* spp. dans des muscles à lésions.**

La figure 13 permet de constater que ce sont des carcasses de bonne qualité de catégorie U et R qui présentent le plus de lésions de myosite éosinophilique.

De même, pour étudier la relation entre la catégorie de la carcasse et la présence du parasite, il est intéressant de réaliser un test de  $\chi^2$  qui nous permet de conclure sur l'indépendance de ses deux critères.



### Population d'étude

Catégorie	positif	négatif
E	0	0
U	25	29
R	19	25
O	11	11
P	6	7

### Population théorique

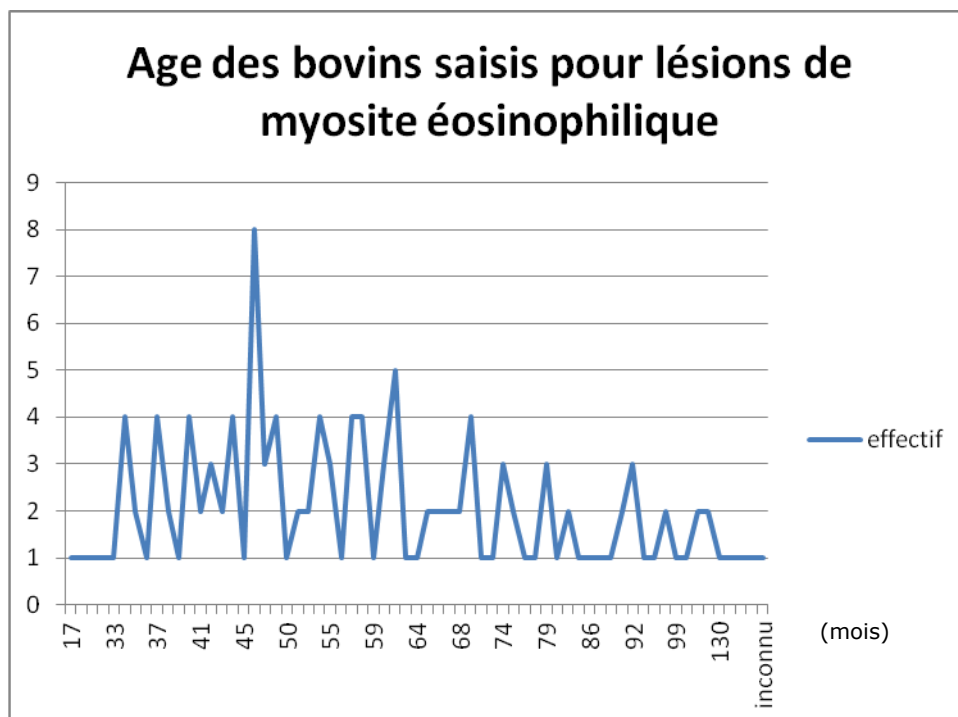
Catégorie	positif	négatif
E	0	0
U	24.767	29.233
R	20.18	23.82
O	10.09	11.91
P	5.962	7.038

On obtient alors  $\chi^2$  observé = 0,283 avec un degré de liberté de 4.

Si on prend un risque de 5 %, la valeur critique donnée par les tables est  $\chi^2$  critique = 7,78

Ainsi  $\chi^2$  observé <  $\chi^2$  critique, la catégorie de la carcasse et la présence d'ADN de *Sarcocystis* spp. sont indépendants.

Ainsi, la présence d'ADN du parasite et donc le portage du parasite n'ont pas d'influence sur le développement musculaire et sur la conformation bouchère des carcasses. Il n'est pas plus présent chez des carcasses passables que chez les très bonnes carcasses.



**Figure 14 : Age des bovins saisis pour lésions de myosite éosinophilique.**

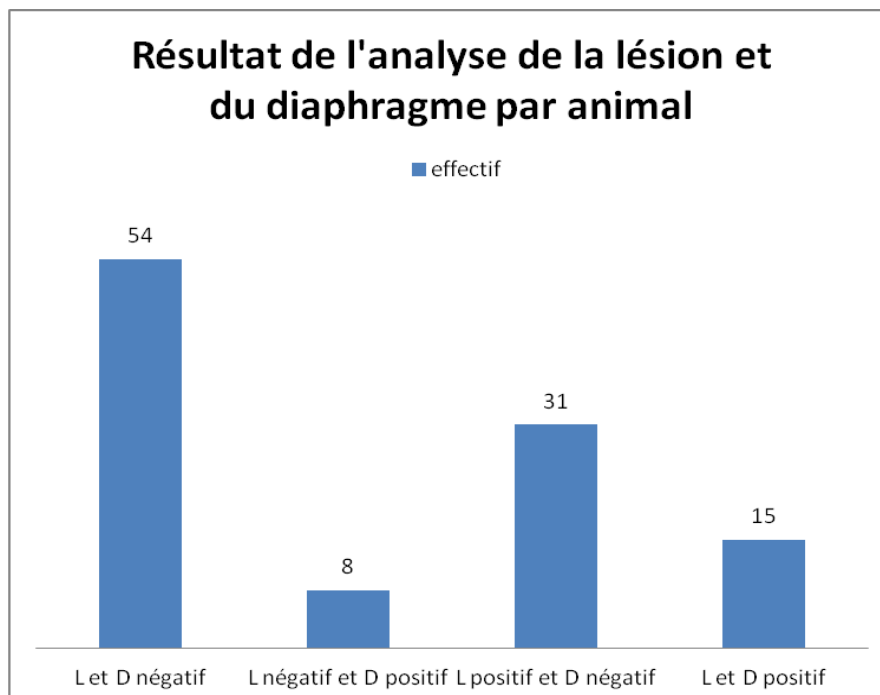
On constate que la répartition de l'âge est hétérogène dans la population des bovins présentant des lésions de myosite éosinophilique (cf. figure 14). On observe que 8 animaux ont été saisis à 46 mois. Parmi ces 8 bovins, 5 ont été positifs à la PCR et présentent donc des traces d'ADN de *Sarcocystis* spp.

- **Etude par animal**

Au total, l'analyse simultanée d'un muscle à lésion et du diaphragme a été réalisée chez 108 bovins saisis pour lésion de myosite éosinophilique.

Pour analyser les résultats de la PCR, les bovins ont été classés en 4 groupes :

- Lésion et diaphragme négatifs
- Lésion négative et diaphragme positif
- Lésion positive et diaphragme négatif
- Lésion et diaphragme positifs



**Figure 15 : Résultats de l'analyse de la lésion et du diaphragme par animal.**

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de la figure 14. Dans un premier temps, 54 bovins ayant la lésion et le diaphragme analysés et saisis pour la présence de lésions de myosite éosinophilique ne sont pas porteurs du parasite, ni à l'endroit de la lésion, ni au niveau du diaphragme pourtant considéré comme un site d'élection pour ce parasite. Ce résultat représente 50 % de l'ensemble des bovins. Les lésions de myosite ne sont donc pas associées systématiquement à la présence de sarcocystes. Pour 8 bovins, soit 7,4 %, le parasite a été détecté non pas au niveau de la lésion mais au niveau du diaphragme. Dans un second temps, 46 animaux sont porteurs du parasite au niveau des lésions, et dont 15 sont aussi porteurs au niveau du diaphragme.

Ainsi, on observe une détection de l'ADN de *Sarcocystis* spp. de 50 % parmi les animaux ayant au moins un échantillon positif (diaphragme et lésion confondu). La présence de parasite au niveau du diaphragme montre qu'elle n'est pas toujours corrélée à la présence de lésions.

La quasi-totalité de ces bovins ont été saisis totalement, cependant 5 animaux n'ont été saisis que partiellement et parmi ces 5 animaux, il s'est révélé que 3 étaient positifs. Ce résultat montre l'importance du rôle du vétérinaire inspecteur dans ses décisions de saisies et que malgré un aspect visuel non préoccupant, le parasite peut être bien présent.

### 3. Etude des espèces impliquées grâce au séquençage

Le séquençage des produits issus de la PCR a été réalisé avec succès pour 64 échantillons sur 97 échantillons positifs envoyés au laboratoire GATC Biotech, soit un taux de réussite de 66 %. Le détail des résultats est donné dans le tableau V. Certains échantillons n'ont pas pu être séquencés du fait de la qualité insuffisante de l'ADN.

**Tableau V : Synthèse des résultats du séquençage en fonction des échantillons.**

(seuil d'homologie minimum d'après BLAST : total score = 113)

	Bovins avec lésions de myosite éosinophilique		Bovins sans lésions de myosite éosinophilique
Résultat du séquençage	Muscles positifs	Diaphragmes positifs	Diaphragmes positifs
<i>Sarcocystis hominis</i>	45	12	2
<i>Sarcocystis cruzi</i>	2	1	1
<i>Sarcocystis hirsuta</i>	0	0	0
<i>Sarcocystis</i> spp.	0	1	0
Total échantillons séquencés	47	14	3
Séquençage non réalisable	14	11	0

La prédominance de *Sarcocystis hominis* est soulignée avec une prévalence de 92 % (59/64) dans l'ensemble des échantillons positifs ayant été séquencés alors que celle de *Sarcocystis cruzi* est très faible : 6 % (4/64). Les lésions de myosite éosinophilique porteuses d'ADN de sarcocystes sont associées dans 96 % (45/47) des cas à la présence de *Sarcocystis hominis* et dans 4 % (2/47) des cas à la présence de *Sarcocystis cruzi*. *Sarcocystis hirsuta* n'a été détectée dans aucun échantillon de l'étude.

Ainsi *Sarcocystis hominis* a une implication forte dans le développement de lésion de myosite éosinophilique contrairement à *Sarcocystis cruzi*. Le diaphragme semble être plus atteint par *Sarcocystis hominis* que par *Sarcocystis cruzi* avec une fréquence respective de 86 % et de 7 % chez les bovins présentant une lésion de myosite éosinophilique et 67 % et 33 % chez les bovins sans lésions.

## RÉSUMÉ

- La prédisposition de la Blonde d'Aquitaine à développer des lésions de myosite éosinophilique est confirmée (45 %) suivie par la Prim'holstein (16 %) et la Charolaise (12 %). Cependant, aucune prédisposition raciale n'a été démontrée quant au portage de *Sarcocystis* spp. chez les animaux présentant des lésions de myosite éosinophilique.
- La totalité des bovins de l'étude sont des femelles.
- Sur les 163 bovins à lésions, 5 ont fait l'objet de saisies partielles, tous les autres ont fait l'objet de saisies totales.
- Les carcasses saisies pour lésions de myosite éosinophilique sont de bonne qualité bouchère et la présence du parasite ne modifie pas la conformation, ni l'aspect musculaire.
- L'âge des bovins saisis pour lésions de myosite éosinophilique est assez hétérogène.
- Quarante-six pour cent des muscles présentant une lésion de myosite éosinophilique sont porteurs d'ADN de *Sarcocystis* spp.
- Le taux de détection d'ADN de *Sarcocystis* spp. dans tous les échantillons confondus est de 32,8 %.
- Parmi les bovins saisis pour lésions de myosite éosinophilique ayant eu une analyse simultanée du diaphragme et de la lésion, 50 % sont porteurs de *Sarcocystis* spp. (diaphragme et lésion confondus).
- Les bovins ne présentant pas de lésion de myosite éosinophilique sont porteurs de l'ADN de *Sarcocystis* spp. dans 13,6 % des cas.
- La différence de détection d'ADN de *Sarcocystis* spp. entre la population d'animaux présentant des lésions de myosite éosinophilique (46 %) et la population sans lésion (13,6 %) montre que la fréquence du parasite est plus élevée lors de myosite éosinophilique.
- *Sarcocystis hominis* est impliqué dans le développement de 96 % des lésions de myosite éosinophilique positives contrairement à *Sarcocystis cruzi* dans qui n'est présent que dans 4 % de ces lésions.
- La présence de *Sarcocystis hominis* a été mise en évidence dans 92 % de l'ensemble des échantillons positifs.
- Le diaphragme semble être davantage un lieu d'élection pour *Sarcocystis hominis* que pour *Sarcocystis cruzi*.

## C. Discussion

Les résultats que nous avons obtenus sont à discuter pour plusieurs raisons.

- Technique d'analyse des échantillons

Dans un premier temps, la PCR est une technique assez délicate. En effet, la mise au point a été assez longue et la lecture pas toujours évidente. De plus, la quantité d'ADN de sarcocystes doit être suffisante pour pouvoir être visible sur le gel d'électrophorèse. Si tous les résultats présentés ici ont été vérifiés plusieurs fois, des faux positifs suite à des problèmes de contamination ont pu aussi être observés. Cependant, cette technique est très spécifique, elle est simple à mettre en place et permet l'analyse de 24 échantillons par gel et deux PCR peuvent être facilement réalisées par jour.

Mary en 2005 a réalisé une étude comparant plusieurs techniques permettant la détection de *Sarcocystis* spp. Les techniques de digestion enzymatique suivie de l'observation au microscope optique et d'histologie bien que plutôt sensibles sont assez limitées car elles sont plus longues à mettre en place, plus coûteuses et moins spécifiques. L'histologie n'est pas assez spécifique dans le sens où il faut beaucoup de coupes musculaires pour avoir une chance de tomber sur le parasite, ce qui est long, coûteux et peu fiable pour un diagnostic de routine. De plus, cette technique n'est pas réalisable sur des échantillons congelés et les kystes identifiés peuvent être provoqués par d'autres coccidies comme *Toxoplasma* spp. Quant à la digestion enzymatique couplée à l'observation au microscope optique, elle est aussi longue à mettre en place avec l'observation des lames pour identifier les bradizoïtes et peut entraîner de faux positifs avec parfois des bradizoïtes difficilement reconnaissables parmi les débris musculaires. Toutefois, une étude complémentaire mettant en œuvre une analyse histologique et une analyse PCR sur le même échantillon pourrait être envisagée. En effet, cela permettrait sur un même prélèvement de visualiser les kystes à l'histologie et de confirmer la présence d'ADN de sarcocystes par la PCR.

Ainsi, la PCR s'avère être une technique d'avenir pour la détection de bovins infectés par *Sarcocystis* spp. néanmoins elle ne permet pas d'identifier l'espèce car les séquences

amplifiées des trois espèces ont un poids moléculaire similaire. Elle doit donc être complétée par un séquençage des produits de PCR pour devenir spécifique. De plus, la PCR quantitative pourrait être une autre piste intéressante car elle permettrait d'estimer la quantité d'ADN parasitaire.

- Technique de prélèvements des échantillons

La technique de prélèvement est aussi essentielle pour garantir des résultats les plus fiables possibles. Cette technique a été optimisée l'année dernière dans l'unité Hygiène et Qualité des Aliments à ONIRIS - Nantes par Mallory Pibot qui a montré que les résultats de la PCR sont très aléatoires lorsque le muscle est prélevé tel quel.

En effet, le problème de détection ne vient pas de la méthode mais de la répartition non homogène du parasite dans le muscle prélevé. Ainsi, à partir d'un simple fragment de muscle, les résultats peuvent être aléatoires. Pour améliorer ces résultats, il est nécessaire d'homogénéiser la répartition du parasite dans les tissus musculaires en hachant la viande. Il a ainsi été montré qu'en procédant de cette façon, on multipliait par 8 la chance de trouver le parasite.

Cependant, cette technique n'est pas encore parfaite car à partir du prélèvement réalisé sur la carcasse seulement 200 g sont hachés et 20 g sont utilisés dans la digestion enzymatique pour que cela reste réalisable. Si l'infection n'est pas massive, le parasite peut ne pas être détecté. Une des solutions serait de réaliser plusieurs analyses à partir de fragments prélevés à différents endroits du même muscle.

- Caractéristique de notre population d'étude

Par rapport à nos résultats, la prédominance de la Blonde d'Aquitaine et de la Prim'Holstein dans les saisies est en adéquation avec les autres études notamment celle de Chloé Guénégan en 2009, en revanche, ce n'est pas le cas pour la race Charolaise qui a priori avait été considérée très peu sensible dans cette même étude. L'étude réalisée par Bovi-Loire en 2011 (données non publiées) comparant des élevages cas et des élevages témoins a aussi abouti à cette même observation. Ainsi, il semblerait qu'il existe bien un effet race dans l'apparition de lésions de myosite éosinophilique mais qu'il n'y ait pas d'effet race dans le



portage du parasite. D'après nos résultats, le parasitisme n'est proportionnellement pas plus important, en revanche les carcasses sont davantage saisies du fait des lésions. Cet effet race peut s'expliquer par une prédisposition génétique chez certaines lignées à développer une réaction d'hypersensibilité de type I aux antigènes des bradizoïtes comme le supposait Granstrom *et al.*, en 1989. La sélection de certains reproducteurs pouvant être porteurs de cette prédisposition peut expliquer l'augmentation de saisie dans la race Charolaise qui auparavant semblait peu sensible.

Le sexe semble être un facteur non négligeable car la totalité des animaux de l'étude saisis pour sarcosporidiose sont des femelles ce qui renforce les travaux réalisés par Chloé Guénégan en 2009 et par Bovi-Loire en 2011. Reiten *et al.* en 1966, avaient déjà émis l'hypothèse que les femelles semblaient être prédisposées à développer des lésions de myosite éosinophilique, sans pour autant identifier précisément les mécanismes hormonaux mis en causes.

Ainsi, nous pouvons grâce à nos résultats confirmer la sensibilité de certaines races et des femelles à développer des lésions de myosite éosinophilique même si le lien avec la présence de sarcocystes n'apparaît pas si évident comme nous le verrons par la suite. Cependant, nous ne sommes pas en mesure de pouvoir modifier ou diminuer cette sensibilité sauf en préconisant un abattage plus précoce pour ces races et pour les femelles ce qui éviterait le développement de lésions mais pas le portage parasitaire. L'identification de marqueurs génétiques pour cette prédisposition ou l'identification de lignées d'animaux prédisposées seraient les seuls moyens de diminuer cet impact. De plus, il est important de noter qu'il n'y a pas d'influence de l'état de la carcasse à présenter des lésions. En effet, les carcasses les plus saisies sont des carcasses de bonne conformation car ce sont les races allaitantes les plus sensibles comme nous l'avons vu plus haut. Ainsi, la présence de lésions n'est pas synonyme de carcasses de mauvaise conformation.

- Prévalence de *Sarcocystis* spp. dans les muscles à myosite éosinophilique

Quarante-six pour cent des muscles présentant une lésion de myosite éosinophilique sont porteurs d'ADN de *Sarcocystis* spp. Dans la population sans lésion de myosite éosinophilique, 13.6 % des prélèvements sont porteurs d'ADN de sarcocystes. De plus, sur

108 animaux ayant les deux prélèvements (diaphragme et lésion) analysés, 54 animaux sont négatifs au niveau de la lésion et au niveau du diaphragme représentant ainsi 50 % de la population. Ces résultats nous montrent deux choses essentielles :

La première est que la fréquence de *Sarcocystis* spp. est plus importante dans les muscles présentant des lésions de myosite éosinophilique que dans les muscles sans lésions. Cependant la relation entre les lésions de myosite éosinophilique et la présence de sarcocystes n'est pas aussi évidente comme le suggérait déjà en 1989 Granstrom *et al.*, ainsi que l'étude de Mary en 2005 et Guénégan en 2009. En effet, moins d'une lésion sur deux est associée à la présence du parasite. L'hypothèse que les lésions de myosite éosinophilique sont provoquées par une infestation parasitaire très minime et qui empêche la détection du parasite avec notre méthode peut être envisagée. Une seconde hypothèse serait que les sarcocystes aient dégénéré un certain temps auparavant mais les lésions provoquées sont elles restées visibles. Enfin, on peut remettre aussi en question les techniques de prélèvements au niveau de la lésion et d'échantillonnage par la suite. Il serait intéressant d'analyser plusieurs échantillons d'une même lésion afin de pouvoir étudier précisément la présence ou l'absence du parasite et sa répartition au niveau de la lésion. La fréquence de *Sarcocystis* spp. dans les lésions de myosite éosinophilique étant de 46 %, une dernière hypothèse serait que ces lésions de myosite éosinophilique aient une autre origine : idiopathique, dysimmunitaire comme c'est le cas chez l'homme (Chérin *et al.*, 2001) ou soit confondue avec d'autres lésions similaires. En effet, ces lésions sont déterminées macroscopiquement à l'abattoir et d'autres lésions parasitaires ou non peuvent ressembler à des lésions de myosite éosinophilique, comme une cysticerose suppurée, certaines formes de toxoplasmose généralisée, etc... (cf figure 16).



**Figure 16 : Exemple de lésion de cysticerose provoquée par *Cysticercus bovis***  
**(Photographie de Cappelier, 2011)**

La deuxième chose que l'on peut souligner est l'intérêt de choisir le diaphragme comme second site de prélèvement. D'après les données bibliographiques, le diaphragme est considéré comme un site d'élection important pour les sarcocystes (Fayer *et al.*, 2004). En revanche, nos résultats montrent que sur les 46 bovins étant positifs au niveau de la lésion, seulement 15 sont aussi positifs au niveau du diaphragme. L'hypothèse que le diaphragme est porteur de sarcocystes mais seulement lors d'invasion parasitaire massive peut être envisagée.

De plus, la détection d'ADN de *Sarcocystis* spp. dans nos échantillons est de 32,8 %. Cette prévalence est inférieure aux valeurs observées dans la littérature. En effet, dans une étude réalisée en Belgique par Vangeel *et al.* en 2006 sur 67 échantillons de steaks hachés, 63 contenaient des sarcocystes. Ce résultat différent peut s'expliquer par le fait que les steaks hachés sont constitués de viande provenant de plusieurs animaux différents et que dans notre étude le résultat est basé sur l'individu.

- Implication des différentes espèces de sarcocystes

Le séquençage a permis de conclure à une forte implication de *Sarcocystis hominis* dans le développement des lésions de myosite éosinophilique. En effet, cette espèce a été détectée dans 96 % des lésions de myosites éosinophiliques porteuses d'ADN de sarcocystes. En revanche, *Sarcocystis cruzi* est présent dans seulement 4 % des lésions de myosite éosinophilique et *Sarcocystis hirsuta* n'a pas été identifié. Ce constat est renforcé si on compare la prévalence de *Sarcocystis hominis* chez les bovins à lésions de myosite éosinophilique et chez les bovins sans lésions même si la faible taille de l'échantillon témoin d'animaux sans lésions ne permet pas de conclure de façon certaine. Des recherches similaires sur une population témoin représentative sont donc à envisager.

Ce résultat soulignant l'implication de *Sarcocystis hominis* dans le développement de lésions de myosite éosinophilique va permettre d'orienter des mesures prophylactiques adaptées notamment en ce qui concerne l'épandage de boue de station d'épuration comme engrais sur des parcelles destinées à l'alimentation des bovins. Cependant d'après l'étude réalisée par Bovi-Loire en 2011, l'épandage de boue de station sur les parcelles n'a pas été rapporté dans les élevages ayant eu des saisies à l'abattoir pour sarcosporidiose. Une étude plus approfondie concernant les pratiques d'épandage serait à envisager afin de comprendre le mode de contamination des bovins. De plus, la faune sauvage et domestique longtemps incriminée par les données bibliographiques semble au vu de nos résultats peu responsable du développement de lésion de myosite éosinophilique.

Le cycle épidémiologique du parasite prédominant comprend l'homme comme hôte définitif. Par conséquent, les mesures de gestion de la myosite éosinophilique semblent passer par une maîtrise des relations hommes-bovins. Il serait par conséquent intéressant de réaliser une étude sur le portage intestinal de *Sarcocystis hominis* chez l'homme. En effet, peu de données existent à cause de la non-spécificité des symptômes.

De plus, *Sarcocystis hominis* est présent dans 92 % de l'ensemble des échantillons positifs séquencés. Même si l'ensemble des échantillons proviennent d'animaux saisis et non destinés à la consommation humaine, ce résultat souligne l'importance de la gestion de la sarcosporidiose bovine d'un point de vue de santé publique et est en concordance avec les données publiées par Vangeel *et al.* en 2006 qui annoncent une prévalence de *Sarcocystis hominis* de 97,4 % dans des échantillons de steak hachées destinés à la consommation humaine. Des mesures préventives comme la bonne cuisson des viandes ou la congélation sont donc à préconiser afin de diminuer le risque de contamination de l'homme.



## CONCLUSION

La myosite éosinophilique est souvent associée à la sarcosporidiose bovine. Cette affection parasitaire est de plus en plus préoccupante comme le montre la multiplication par deux du nombre de saisie pour ce motif depuis ces cinq dernières années. De plus, les races les plus affectées sont des races allaitantes : Blonde d'Aquitaine, Charolaise, Limousine ayant une haute valeur bouchère et entraînant des pertes économiques considérables pour les groupements professionnels qui indemnisent les éleveurs en cas de saisie. C'est aussi un enjeu majeur pour la santé publique humaine avec l'implication de *Sarcocystis hominis* provoquant une atteinte gastro-intestinale chez l'homme secondaire à la consommation de viande crue et peu cuite.

Notre étude avait plusieurs objectifs. Dans un premier temps, nous voulions identifier la présence de sarcocystes dans des muscles présentant des lésions de myosite éosinophilique par PCR ainsi que dans des muscles sans lésions. Les résultats ont permis de confirmer que la présence de lésion de myosite éosinophilique n'est pas toujours corrélée à la présence du parasite, dans notre étude cela représente 46 % des cas. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat comme la dégénérescence du parasite, une infestation trop minime pour pouvoir être détectée par notre technique expérimentale, la présence d'un autre parasite ou une autre cause. Dans un second temps, le séquençage a permis de montrer la forte implication de *Sarcocystis hominis* dans le développement des lésions de myosite éosinophilique contrairement à *Sarcocystis cruzi* avec une prévalence de 96 %. Ainsi le cycle épidémiologique est davantage entretenu par l'homme que par la faune sauvage et domestique. Ce résultat est important en termes de santé publique et permettra d'orienter davantage les mesures prophylactiques.

Afin d'approfondir les connaissances sur la sarcosporidiose bovine, il serait intéressant de réaliser une étude épidémiologique sur le portage intestinal de *Sarcocystis hominis* chez l'homme ainsi que sur les pratiques d'épandages dans les élevages les plus atteints.





## **Annexe 1 : Protocole de digestion enzymatique**

### **Matériel**

- Bécher
- Pipette
- Eprouvette de 100 mL
- Flacon de 1 L
- Eau distillée
- Pepsine 2000 FIP U/g
- NaCl
- HCl à 25 %
- Pipette
- Balance
- Broyeur à viande
- Flacons de 200 mL avec bouchon
- Bain marie à 37°C avec agitateur
- Tamis avec maille de 400 µm
- Ampoule à décanter
- Petits tubes de 1,5 mL

### **Technique**

- Préparer la solution de digestion :

Pour 1 L d'eau distillée : - 3 g de Pepsine (Pepsine 2000 FIP U/g, Merck)  
- 5 g de NaCl  
- 7 mL d'HCl à 25 % (4,7 mL à 37 %)

- Peser 200 g de l'échantillon de viande et le hacher avec un broyeur à viande. Dans notre étude, nous avons utilisé la moulinette Moulinex ® 1000 W.
- Prélever 20 g et les placer dans un flacon de 200 mL, ajouter 100 mL de la solution de digestion.
- Placer au bain marie à 37 °C avec agitation pendant 30 minutes.
- Filtrer le contenu du flacon avec le tamis de 400 µm, récupérer le filtrat et le mettre à décanter dans une ampoule pendant 30 minutes.
- Récupérer environ 10 mL et répartir dans 5/6 tubes de 1,5 mL et les placer dans une boîte de stockage.
- Placer les tubes au congélateur à – 20°C en attente de l'extraction ADN.



## Annexe 2 : Protocole d'extraction de l'ADN

### Matériel

- kit « NucleoSpin® Tissue»
- pipettes
- tube eppendorf 1,5 mL
- bain marie sec (70°C)
- vortex
- éthanol 95 %
- centrifugeuse eppendorf
- petits tubes pour la congélation et le stockage

### Technique

- **Lyse de l'échantillon**
  - Vortex
  - Ajouter 200 µL de B3
  - Vortex
  - Incubation 70°C pendant 10 minutes au bain-marie sec
- **Précipitation de l'ADN**
  - Ajouter 210 µL d'éthanol à 95 %
  - Vortex
- **fixation de l'ADN à la membrane de silice**
  - Mettre tout le contenu des tubes dans les colonnes ayant des tubes collecteurs
  - Centrifuger 1 minute à 12000\*g
  - Eliminer le liquide récupéré dans le tube collecteur
- **Lavage de la membrane de silice**
  - 1<sup>er</sup> lavage : ajouter 500 µL de BW, centrifuger 1 minute à 12000\*g, puis éliminer le liquide récupéré dans le tube collecteur
  - 2<sup>ème</sup> lavage : ajouter 600 µL de B5, centrifuger 1 minute à 12000\*g, puis éliminer le liquide récupéré dans le tube collecteur
- **Séchage de la membrane de silice**
  - Centrifuger 1 min à 12000\*g
- **Elution de l'ADN**
  - Placer les colonnes dans des tubes eppendorf, y ajouter 100 µL de BE à 70 ° C (penser à mettre le BE à chauffer au moment des lavages), laisser incubé pendant 1 minute à température ambiante
  - Centrifuger 1 minute à 12000\*g
  - Récupérer le liquide et le placer dans des petits tubes
- **Congélation de l'extrait d'ADN à -20°C en attente de PCR**



## Annexe 3 : Protocole de la PCR

### Matériel

- Tubes PCR
- Tube eppendorf de 1.5 mL
- Vortex
- Pipettes
- Réactifs pour la PCR

### Technique

#### Préparation du Master Mix :

Le Master Mix contient tous les réactifs nécessaires à la PCR hormis l'extrait d'ADN. Il faut le préparer dans un tube eppendorf stérile de 1,5 mL en ajoutant les réactifs suivants en conservant l'ordre.

Pour un échantillon :

Réactif	Concentration	Volume à ajouter (µL)
H <sub>2</sub> O		12,65
Tampon PCR 10X	1 mM	2,5
MgCl <sub>2</sub> mM	1,5 mM	2,5
Amorce SAR <sub>f</sub> 25µM	1 µM	1
Amorce SAR <sub>r</sub> 25µM	1 µM	1
dNTPs 10 mM	0,2 mM	0,25
Taq polymérase (5u/µL)	0,5 unité/25 µL	0,1

Ensuite, le Master Mix est mélangé en passant par le vortex puis il faut répartir 20 µL dans chaque tube PCR.

Pour finir, ajouter 5 µL de chaque échantillon d'extrait ADN.

#### PCR :

Placer les tubes PCR dans le thermocycleur et activer le programme suivant :

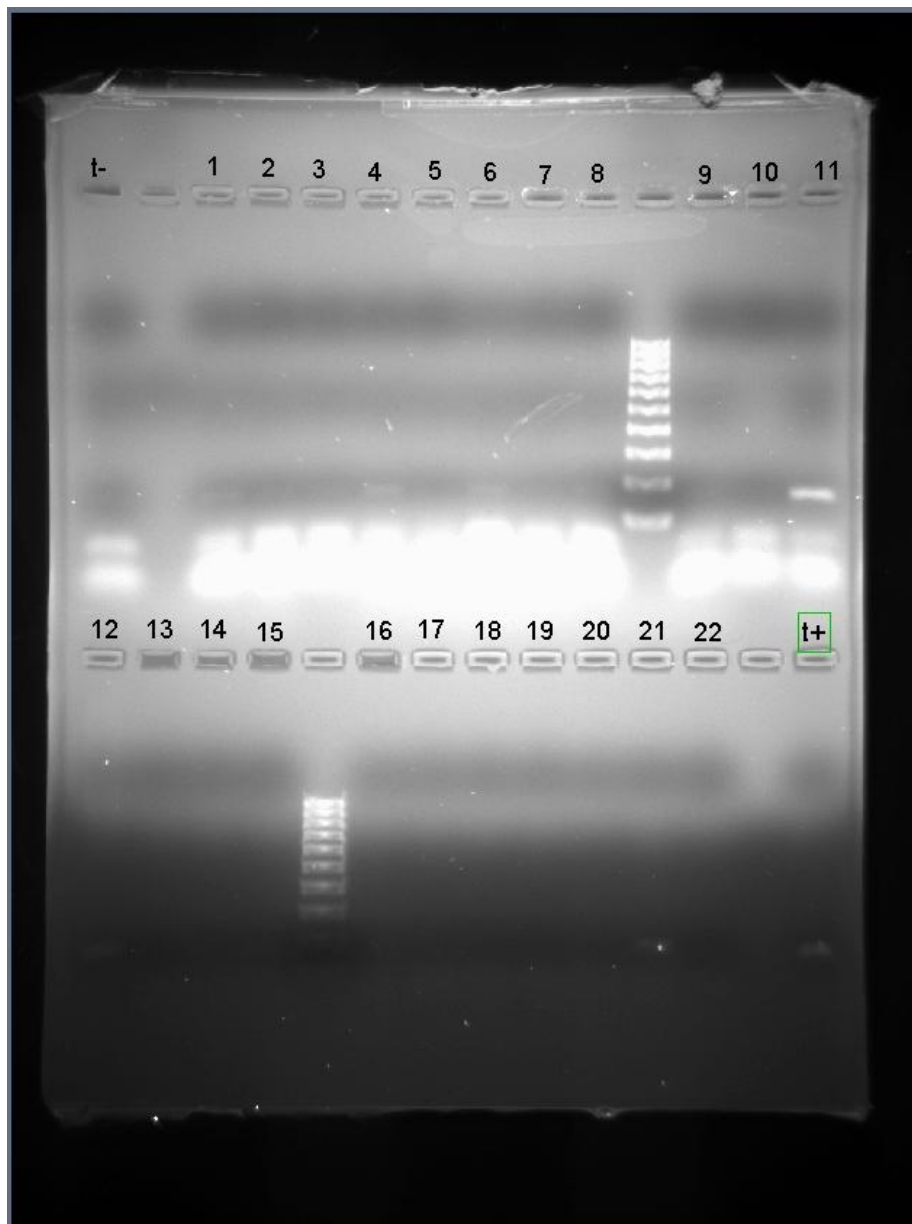
- 1 cycle à 94 °C pendant 4 minutes
- 40 cycles : 94 °C pendant 1 minute, 63 °C pendant 1 minute, 72 °C pendant 1 minute
- 1 cycle à 72 °C pendant 10 minutes
- Refroidissement et maintien à 14 °C

#### Détection des produits de PCR par électrophorèse :

- Déposer 20 µL de chaque produit de PCR et 4,5 µL de TBE 0,5 X dans un puits d'un gel d'agarose à 1,6 % avec du TBE à 0,5X
- Migration pendant 45 minutes à 110 volts et 400 mA
- Lecture sous lampe UV, les échantillons positifs présentent une bande blanche vers 160/180 bpm.



**Annexe 4 : Images des gels d'électrophorèse observés aux UV**



t - : négatif  
1 : positif  
2 : négatif  
3 : négatif  
4 : positif  
5 : négatif  
6 : positif  
7 : négatif

8 : positif  
9 : négatif  
10 : négatif  
11 : positif  
12 : positif  
13 : négatif  
14 : négatif  
15 : négatif

16 : négatif  
17 : négatif  
18 : négatif  
19 : négatif  
20 : négatif  
21 : positif  
22 : négatif  
t + : positif

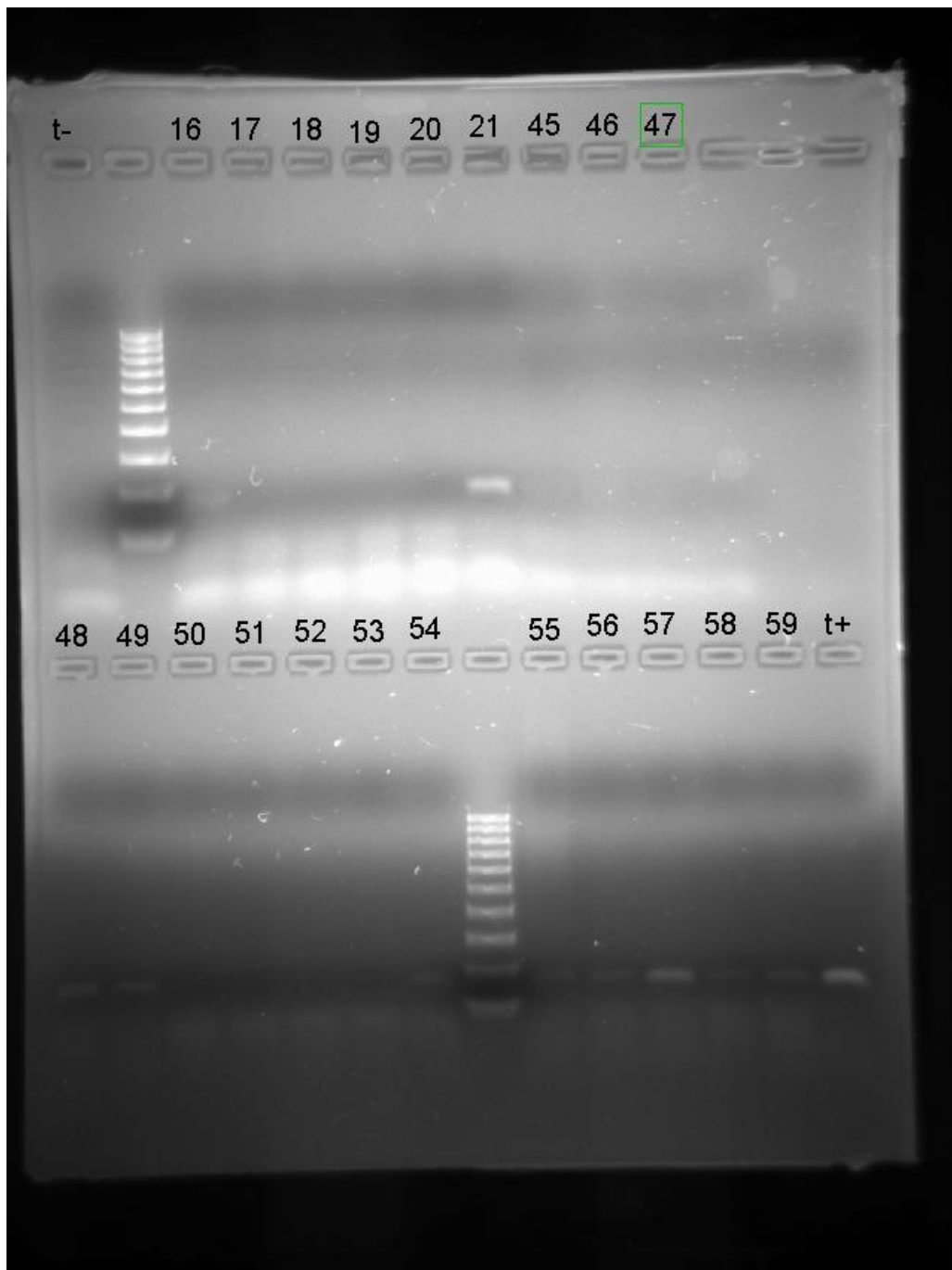


t - : négatif  
 23 : positif  
 24 : positif  
 25 : positif  
 26 : positif  
 27 : positif  
 28 : positif  
 29 : négatif  
 30 : négatif

31 : négatif  
 32 : positif  
 33 : positif  
 34 : négatif  
 35 : négatif  
 36 : positif  
 37 : négatif  
 38 : négatif  
 39 : négatif

40 : négatif  
 41 : négatif  
 42 : positif  
 43 : négatif  
 44 : positif  
 t + : positif





t - : négatif  
 16 : positif  
 17 : négatif  
 18 : négatif  
 19 : négatif  
 20 : négatif  
 21 : positif  
 45 : négatif

46 : négatif  
 47 : négatif  
 48 : positif  
 49 : positif  
 50 : négatif  
 51 : négatif  
 52 : négatif  
 53 : négatif

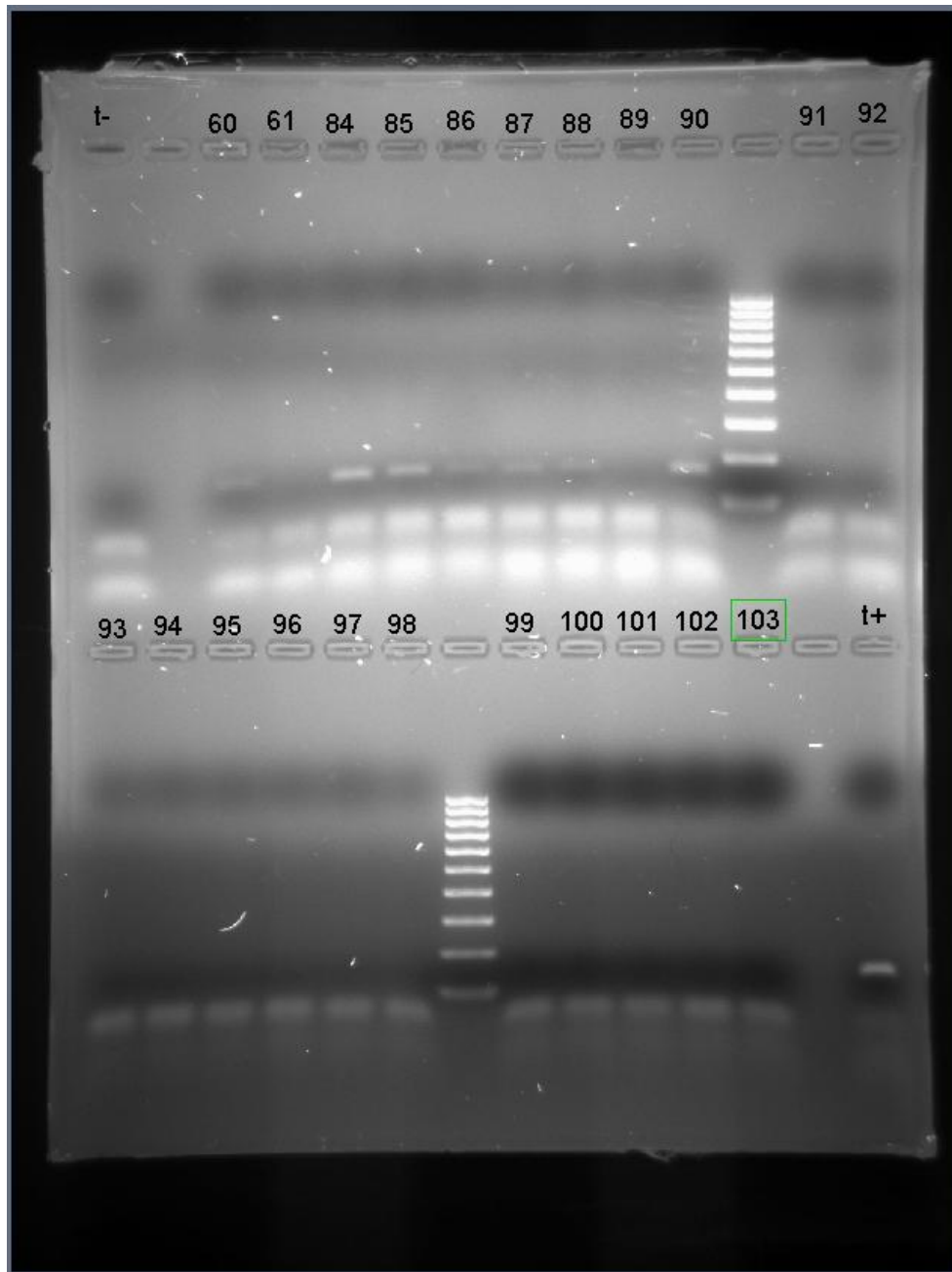
54 : négatif  
 55 : positif  
 56 : positif  
 57 : positif  
 58 : positif  
 59 : positif  
 t + : positif



t - : négatif  
 62 : négatif  
 63 : négatif  
 64 : positif  
 65 : négatif  
 66 : négatif  
 67 : positif  
 68 : négatif

69 : négatif  
 70 : négatif  
 71 : négatif  
 72 : négatif  
 73 : positif  
 74 : négatif  
 75 : négatif  
 76 : positif

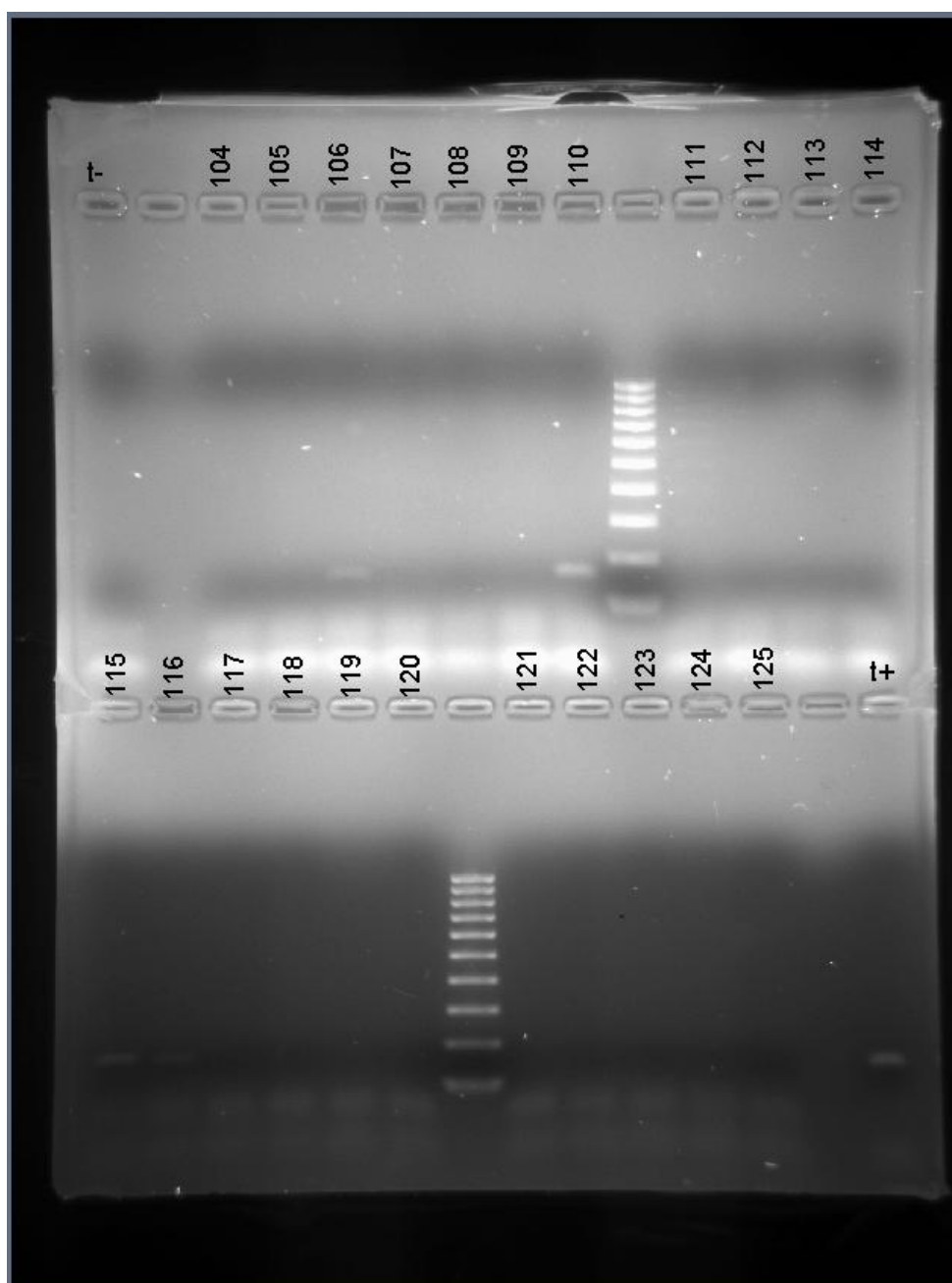
77 : positif  
 78 : négatif  
 79 : négatif  
 80 : négatif  
 81 : négatif  
 82 : négatif  
 83 : négatif  
 t + : positif



t - : négatif  
 60 : positif  
 61 : négatif  
 84 : positif  
 85 : positif  
 86 : positif  
 87 : positif  
 88 : positif

89 : négatif  
 90 : positif  
 91 : négatif  
 92 : négatif  
 93 : négatif  
 94 : négatif  
 95 : négatif  
 96 : négatif

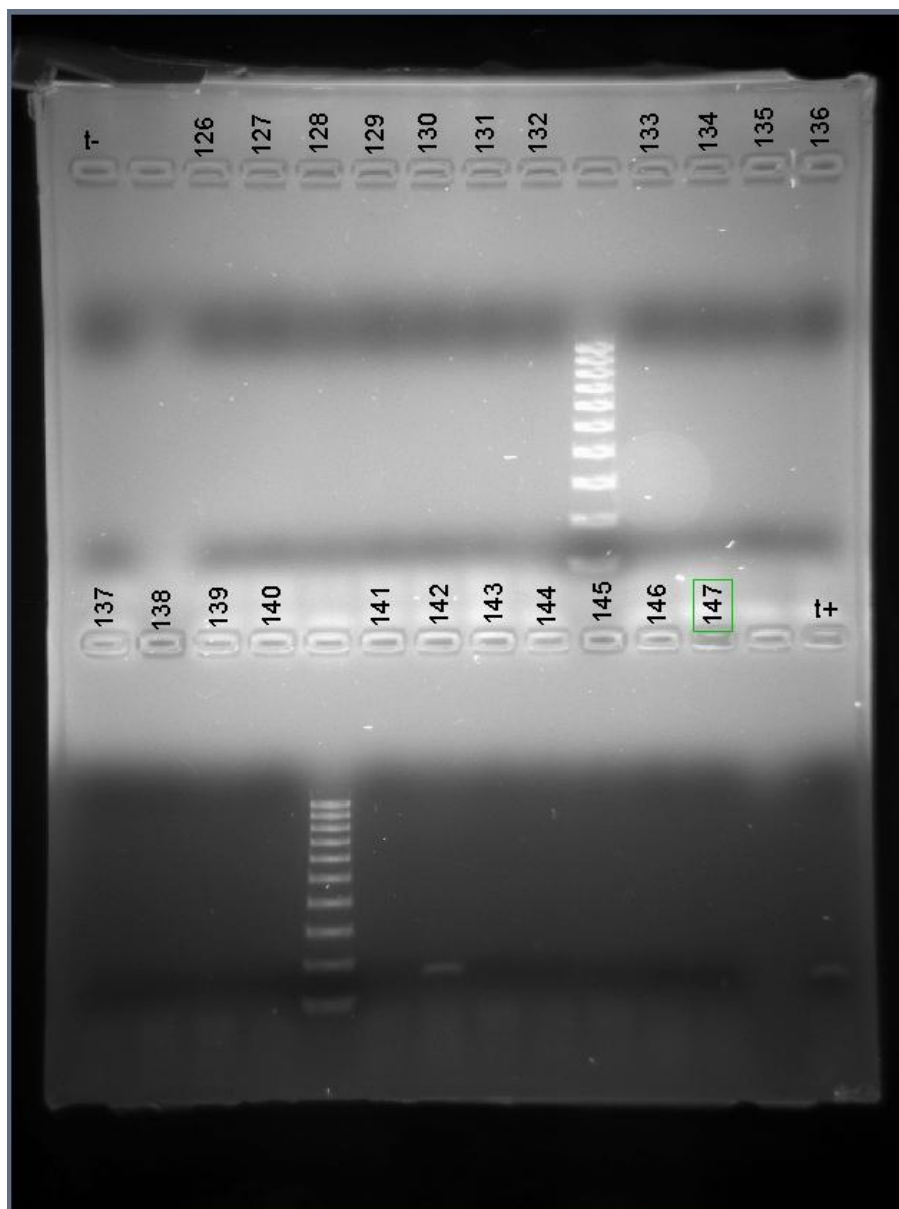
97 : négatif  
 98 : négatif  
 99 : négatif  
 100 : négatif  
 101 : négatif  
 102 : négatif  
 103 : négatif  
 t + : positif



t - : négatif  
 104 : négatif  
 105 : négatif  
 106 : positif  
 107 : négatif  
 108 : négatif  
 109 : négatif  
 110 : positif

111 : négatif  
 112 : négatif  
 113 : négatif  
 114 : négatif  
 115 : positif  
 116 : positif  
 117 : négatif  
 118 : négatif

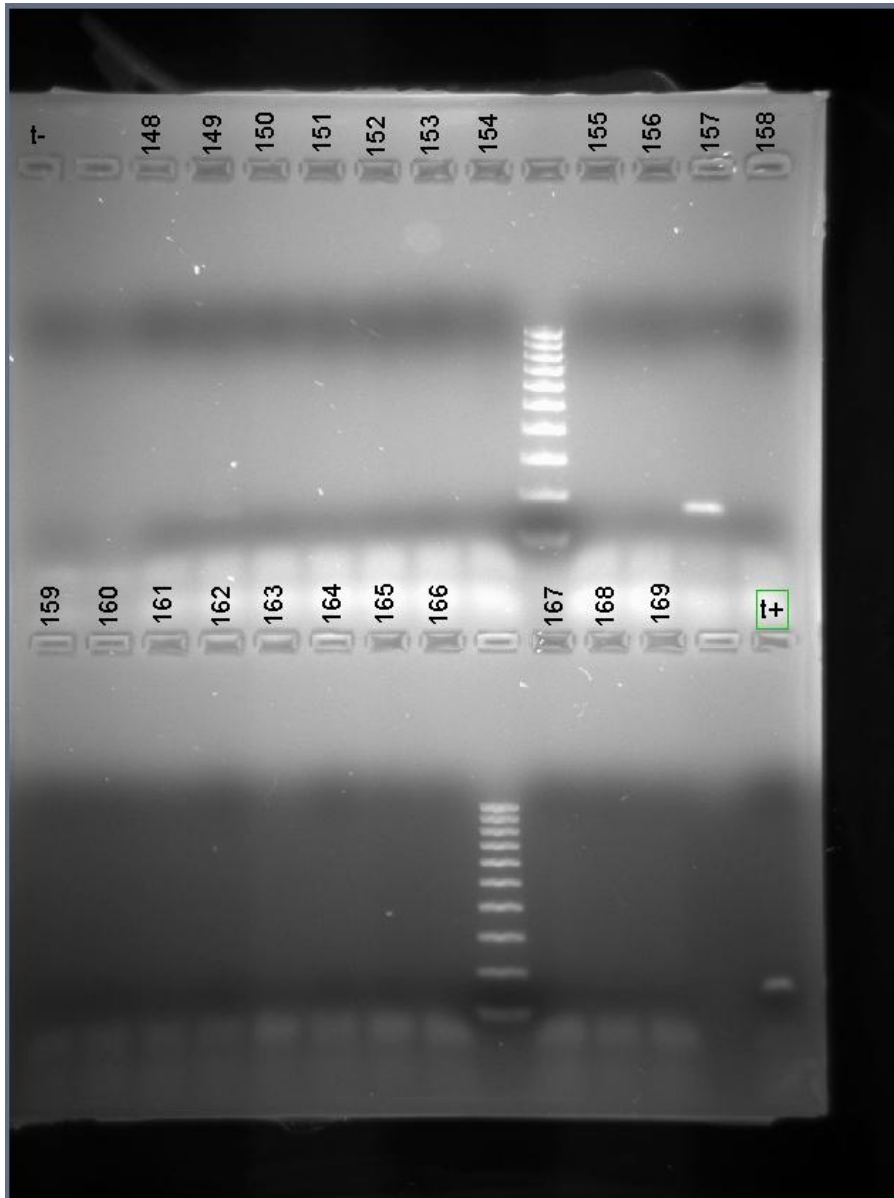
119 : négatif  
 120 : négatif  
 121 : négatif  
 122 : négatif  
 123 : négatif  
 124 : négatif  
 125 : négatif  
 t + : positif



t - : négatif  
 126 : négatif  
 127 : négatif  
 128 : négatif  
 129 : négatif  
 130 : négatif  
 131 : négatif  
 132 : négatif

133 : négatif  
 134 : négatif  
 135 : négatif  
 136 : négatif  
 137 : négatif  
 138 : négatif  
 139 : négatif  
 140 : négatif

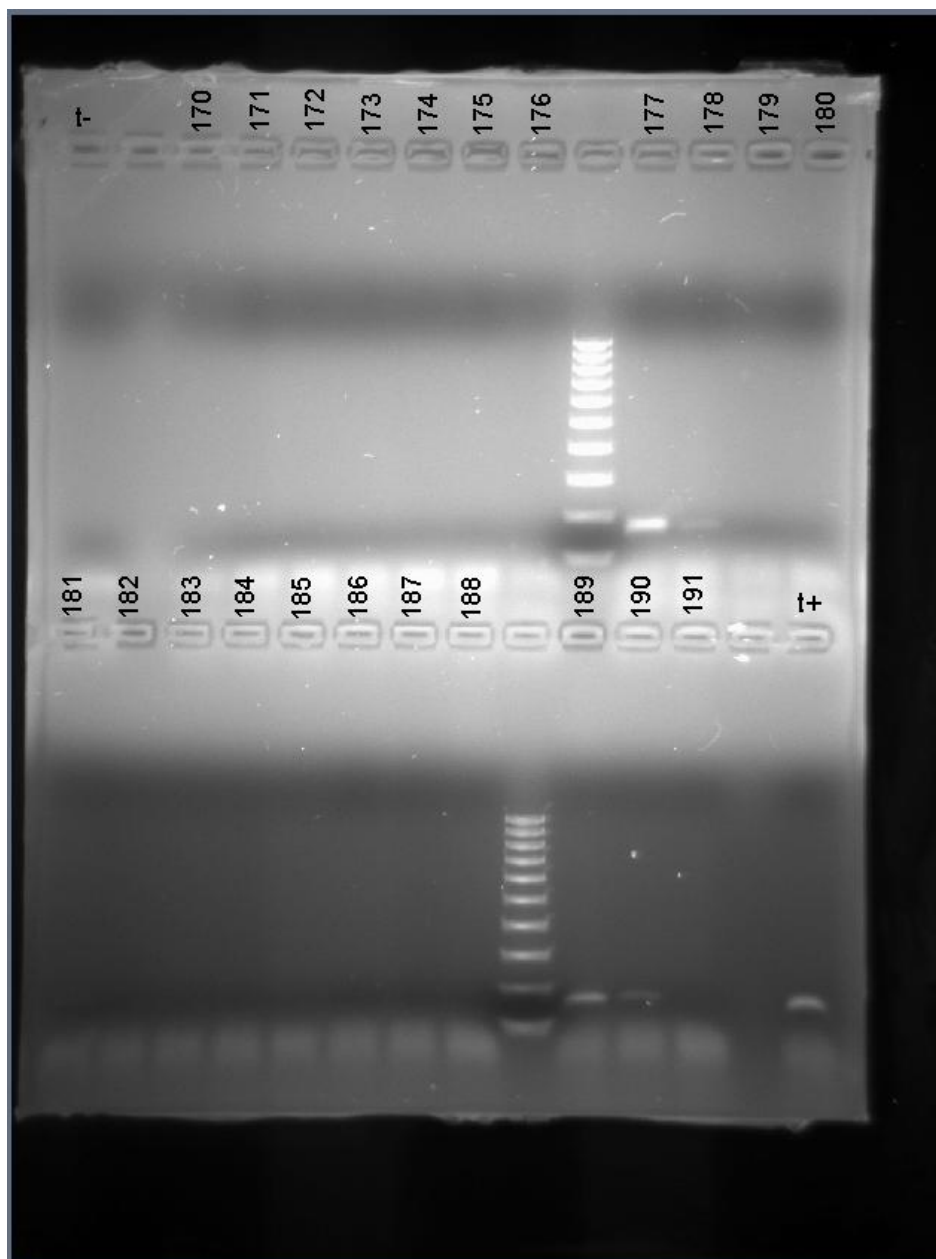
141 : négatif  
 142 : positif  
 143 : négatif  
 144 : négatif  
 145 : négatif  
 146 : négatif  
 147 : négatif  
 t + : positif



t - : négatif  
 148 : négatif  
 149 : négatif  
 150 : négatif  
 151 : négatif  
 152 : négatif  
 153 : négatif  
 154 : négatif

155 : négatif  
 156 : négatif  
 157 : positif  
 158 : négatif  
 159 : négatif  
 160 : négatif  
 161 : négatif  
 162 : négatif

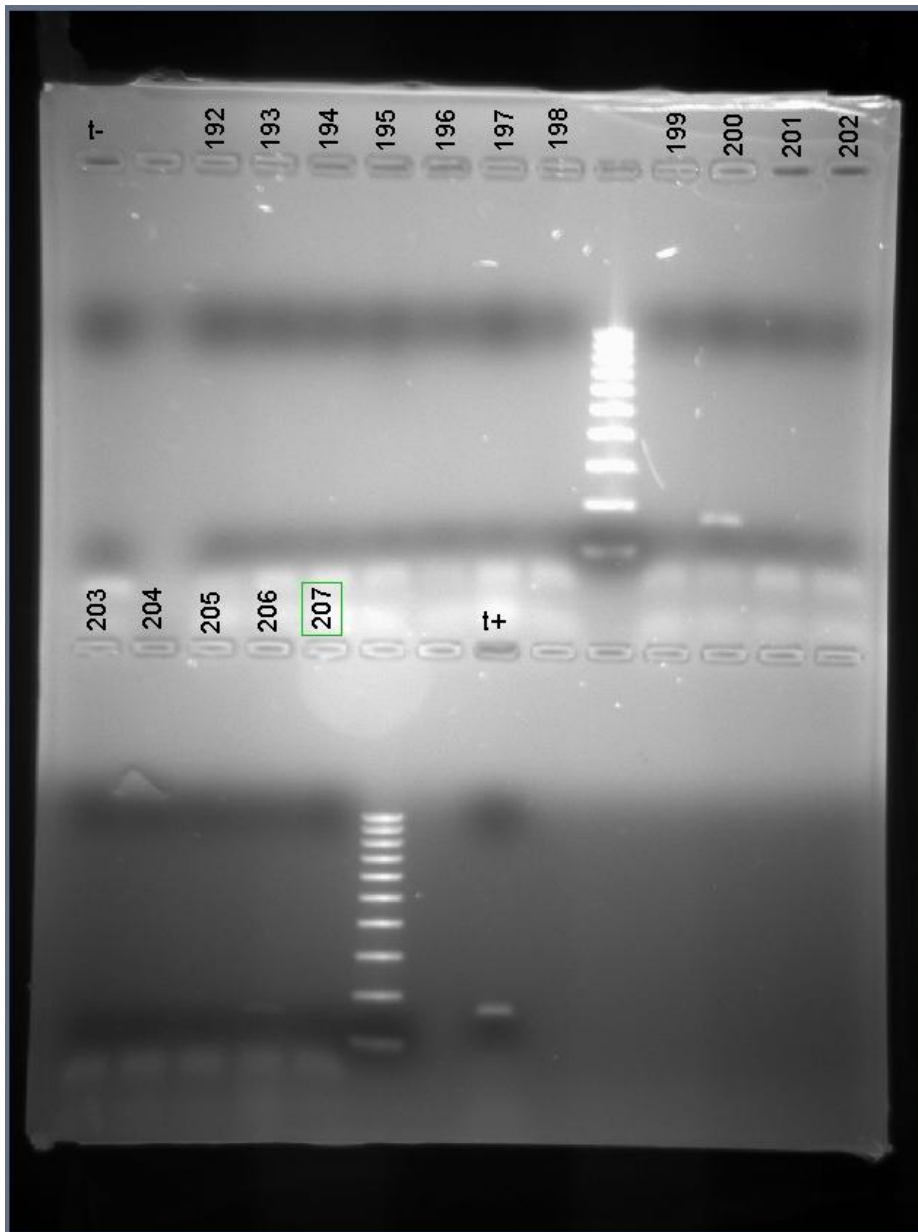
163 : négatif  
 164 : négatif  
 165 : négatif  
 166 : négatif  
 167 : négatif  
 168 : négatif  
 169 : négatif  
 t + : positif



t - : négatif  
 170 : négatif  
 171 : négatif  
 172 : négatif  
 173 : négatif  
 174 : négatif  
 175 : négatif  
 176 : négatif

177 : positif  
 178 : positif  
 179 : négatif  
 180 : négatif  
 181 : négatif  
 182 : négatif  
 183 : négatif  
 184 : négatif

185 : négatif  
 186 : négatif  
 187 : négatif  
 188 : négatif  
 189 : positif  
 190 : positif  
 191 : négatif  
 t + : positif

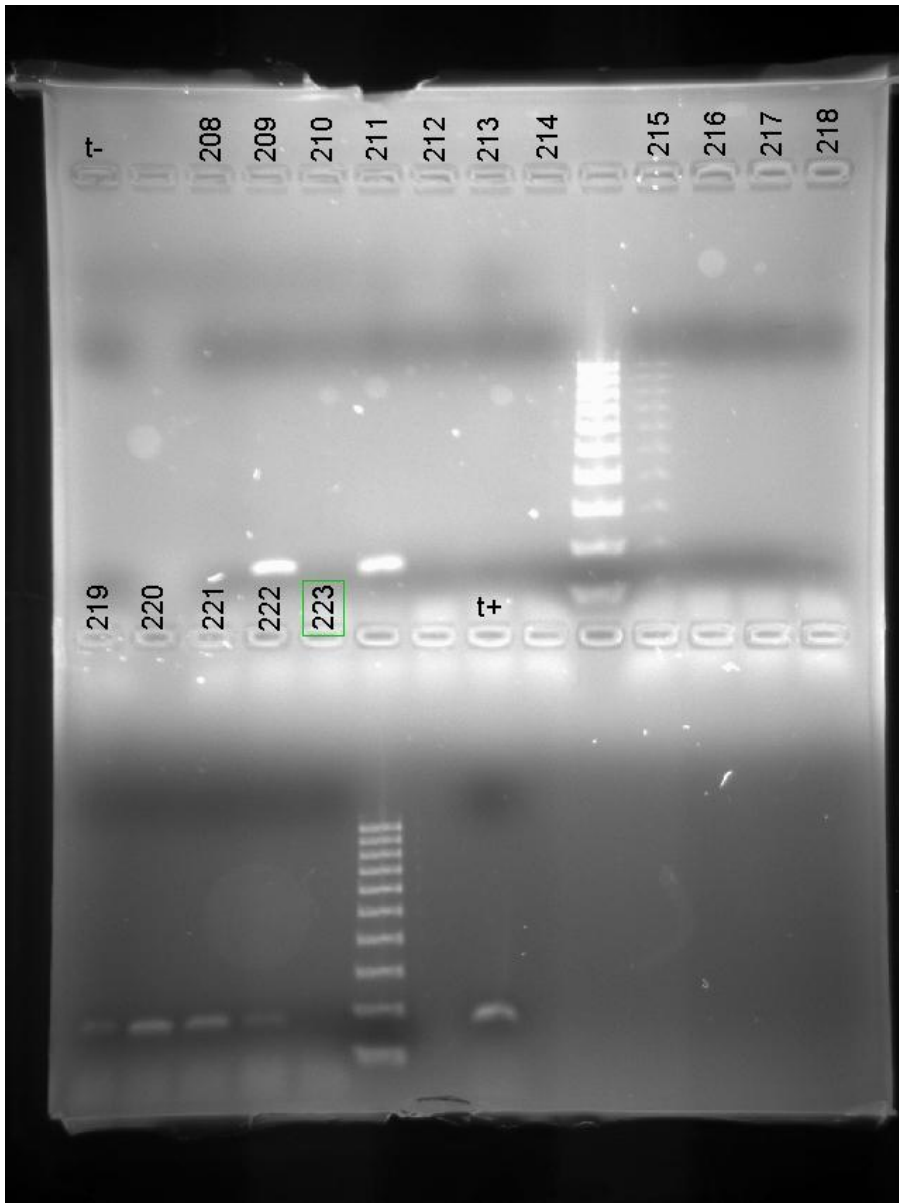


t - : négatif  
 192 : négatif  
 193 : négatif  
 194 : négatif  
 195 : négatif  
 196 : négatif

197 : négatif  
 198 : négatif  
 199 : négatif  
 200 : positif  
 201 : négatif  
 202 : négatif

203 : négatif  
 204 : négatif  
 205 : négatif  
 206 : positif  
 207 : négatif  
 t + : positif

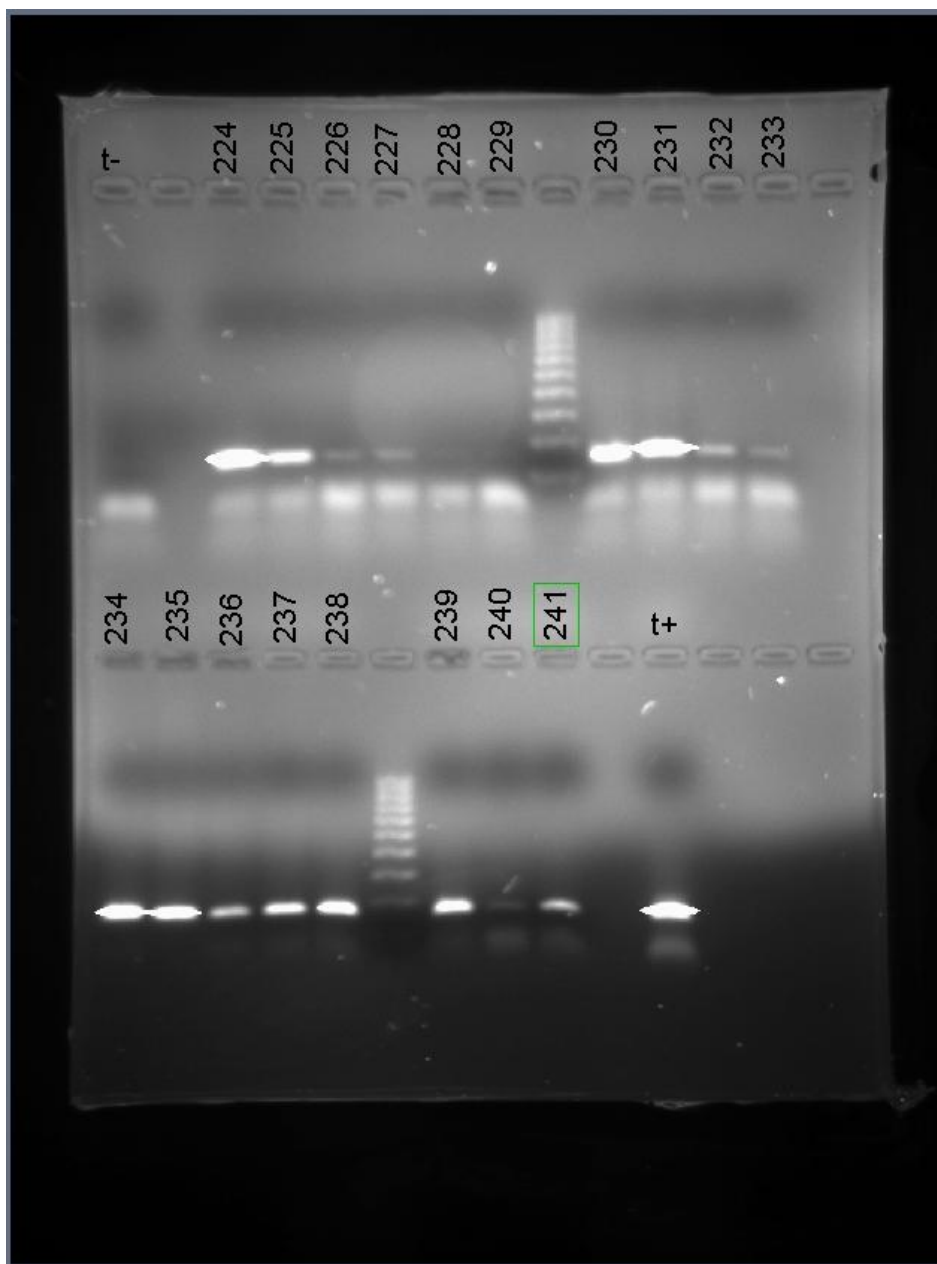




t - : négatif  
 208 : négatif  
 209 : positif  
 210 : négatif  
 211 : positif  
 212 : négatif

213 : négatif  
 214 : négatif  
 215 : négatif  
 216 : négatif  
 217 : négatif  
 218 : négatif

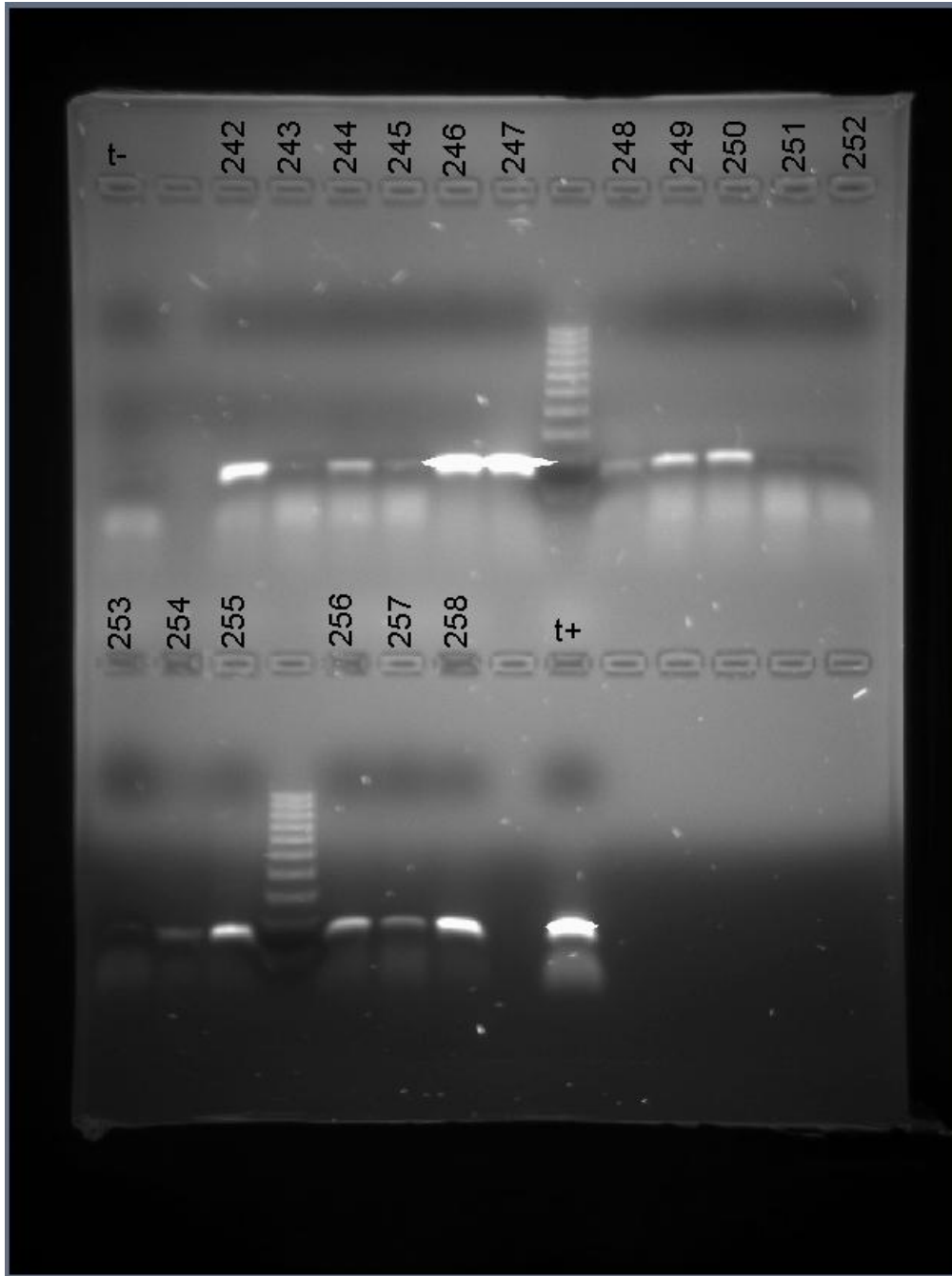
219 : positif  
 220 : positif  
 221 : positif  
 222 : positif  
 223 : négatif  
 t + : positif



t - : négatif  
 224 : positif  
 225 : positif  
 226 : positif  
 227 : positif  
 228 : négatif  
 229 : négatif

230 : positif  
 231 : positif  
 232 : positif  
 233 : positif  
 234 : positif  
 235 : positif  
 236 : positif

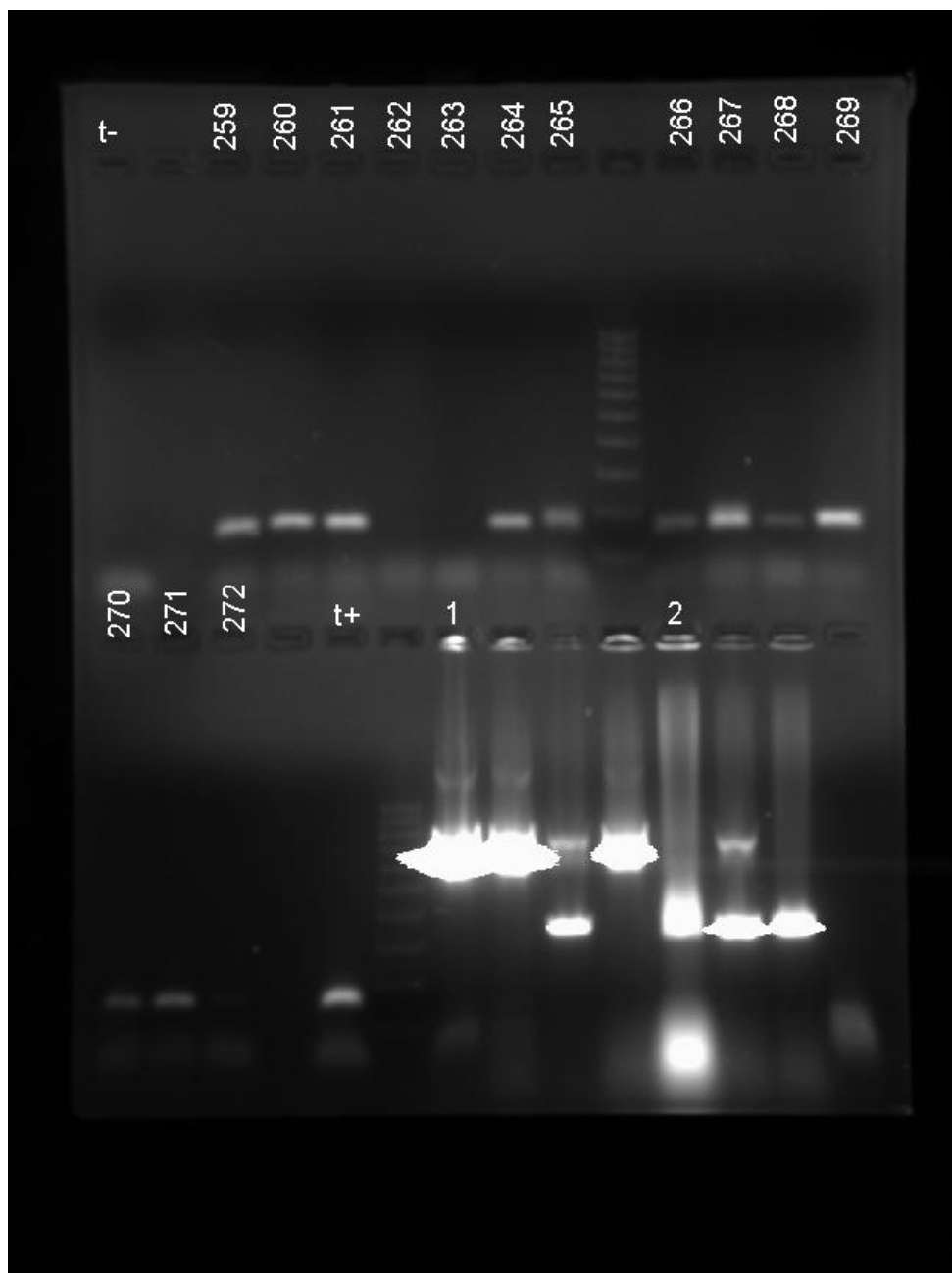
237 : positif  
 238 : positif  
 239 : positif  
 240 : positif  
 241 : positif  
 t + : positif



t - : négatif  
 242 : positif  
 243 : négatif  
 244 : positif  
 245 : positif  
 246 : positif  
 247 : positif

248 : positif  
 249 : positif  
 250 : positif  
 251 : négatif  
 252 : négatif  
 253 : négatif  
 254 : positif

255 : positif  
 256 : positif  
 257 : positif  
 258 : positif  
 t + : positif



t - : négatif  
 259 : positif  
 260 : positif  
 261 : positif  
 262 : négatif  
 263 : négatif  
 264 : positif

265 : positif  
 266 : positif  
 267 : positif  
 268 : positif  
 269 : positif  
 270 : positif  
 271 : positif

272 : négatif  
 t + : positif  
 1 et 2 : autres PCR sortant  
 de notre étude

## BIBLIOGRAPHIE

**BUCCA M., BRIANTI E., GIUFFRIDA A., ZIINO G., CICCARI S., PANEBIANCO A., 2011.** Prevalence and distribution of *Sarcocystis* spp. cysts in several muscles of cattle slaughtered in Sicily, Southern Italy. *Food control*, 22, 105-108.

**CHERIN P., GENEREAU T., LEVY-SOUSSAN M., HERSON S., 2001.** Les myosites à éosinophiles. <http://www3.univ-lille2.fr/immunologie/hei/myosite.htm>

**DAUGSCHIES A., HINTZ J., HENNING M., ROMMEL M., 2000.** Growth performance, meat quality and activities of glycolytic enzymes in the blood and muscle tissue of calves infected with *Sarcocystis cruzi*. *Veterinary Parasitology*, 88, 7-16.

**DAUGSCHIES A., RUPP U., ROMMEL M., 1998.** Blood clotting disorders during experimental sarcocystiosis in calves. *International Journal for Parasitology*, 28, 1187-1194.

**DESORTES-LIVAGE I., DATRY A., 2005.** Infection à microsporidies, *Isospora* et *Sarcocystis*. *EMC, maladies infectieuses*, 2, 178-196.

**DUBEY J.P., LINDSAY D.S., 2006.** Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 22(3), 645-671.

**DUBEY J.P., SPEER C.A., FAYER R., 1989b.** *Sarcocystosis of Animals and Man*, CRC Press, Boca Raton, Floride, 205p.

**EUZEBY J., 1998.** Les parasites des viandes: épidémiologie, physiopathologie, incidences zoonosiques. *Edition Lavoisier*, 20-44.

**FAYER R., 2004.** *Sarcocystis* spp. in Human Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 894-902.

**FRADIN N., 2003.** Evaluation de la fréquence et de la répartition des motifs de saisie en abattoir de ruminants et de porcs. Th. Med. Vet., Nantes, 155 p.

**GHISLENI G., ROBBA S., GERMANI O., SCANZIANI E., 2006.** Identification and prevalence of *Sarcocystis* spp. cysts in bovine canned meat. *Food control*, 17, 691-694.

**GONZALEZ L.M., VILLALOBOS N., MONTERO E., MORALES J., ALAMO SANZ R., MURO A., HARRISON L.J.S, PARKHOUSE R.M.E., GARATE T., 2006.** Differential molecular identification of *Taeniid* spp. and *Sarcocystis* spp. cysts isolated from infected pigs and cattle. *Veterinary Parasitology*, 142, 95-101.

**GUENEGAN C., 2009.** Facteurs de risque de saisie en abattoir pour sarcosporidiose chez les bovins : étude en région Pays de la Loire. Th. Med. Vet., Nantes, p. 122.

**GRANSTROM D. E., RIDLEY R. K., BAOAN Y., GERSHWIN L. J., NESBITT P. M., WEMPE L. A., 1989.** Type-I hypersensitivity as a component of eosinophilic myositis (muscular sarcocystosis) in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 50, 571-574.

**JEHLE C., DINKEL A., SANDER A., MORENT M., ROMING T., LUC PV., DE TV., THAI VV., MACKENSTEDT U., 2009.** Diagnosis of *Sarcocystis* spp. in cattle (*Bos taurus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Northern Vietnam. *Veterinary parasitology*, 166, 314-320.

**JENSEN R., ALEXANDER A.F., DAHLGREN R.R., JOLLEY W.R., MARQUARDT W.C., FLACK D.E., BENNET B.W., COX M.F., HARRIS C.W., HOFFMAN G.A., TROUTMAN R.S., HOFF R.L., JONES R.L., COLLINS J.K., HAMAR D.W., CRAVANS R.L., 1986.** Eosinophilic myositis and muscular sarcocystosis in the carcasses of slaughtered cattle and lambs. *American Journal of Veterinary Research*, 47, 587-593.

**LIAN-YONG C., BEN-JIANG Z., ZHAO-QING Y., CUI-YING L., S.W. A., WEN-LIN W., LIN L., XIAO-DONG S., ZAI-XING Z., 2007.** Effects of frozen storage on the structure of sarcocysts in pig muscle and implication in taxonomic studies. *Experimental parasitology*, 115, 393-398.

**MARY N., 2005.** Rôle dans les lésions de myosite éosinophilique et espèces impliquées. Th. Med. Vet., Nantes, p. 89.

**MORE G., ABRAHAMOVICH P., JURADO S., BACIGALUPE D., MARIN JC., RAMBEAUD M., VENTURINI L., VENTURINI MC., 2010.** Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. *Veterinary parasitology*.

**MORE G., BACIGALUPE D., BASSO W., RAMBEAUD M., BELTRAME F., RAMIREZ B., VENTURINI M. C., VENTURINI L., 2009.** Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Veterinary parasitology*, 160, 51-54.

**PARLEMENT EUROPEEN ET CONSEIL, 2004.** Règlement (CE) n° 854/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine. [En ligne]. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, L226, 83-127. Disponible sur internet

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0083:0127:FR:PDF>

(consulté le 18 octobre 2011)

**PRAYSON B., MCMAHON J.T., PhD, PRAYSON R. A., MD, 2008.** Fast food hamburgers : what are we really eating? *Annals of Diagnostic Pathology*.

**REITEN A.C., JENSEN R., GRINER L.A., 1966.** Eosinophilic myositis (sarcosporidiosis; sarco) in beef cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 27(119), 903-906.

**SAVINI G., ROBERTSON I. D., DUNSMORE J. D., 1995.** Studies on pathogenesis, tissue infection and congenital transmission in cows experimentally infected with *Sarcocystis cruzi* by various routes. *Veterinary parasitology*, 64, 319-327.

**SAVINI G., ROBERTSON I. D., DUNSMORE J. D., 1996.** Viability of the sporocysts of *Sarcocystis cruzi* after exposure to different temperatures and relative humidities. *Veterinary parasitology*, 67, 153-160.

**SAVINI G., ROBERTSON I. D., DUNSMORE J. D., 1997.** Sensitivities and specificities of two ELISA tests for detecting infection with *Sarcocystis* in cattle of Western Australia. *Preventive veterinary medicine*, 32, 35-40.

**TENTER A. M., 1995.** Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *International Journal for Parasitology*, 25(11), 1311-1330.

**VANGEEL L., HOUF K., CHIERS K., VERCRUYSSSE J., D'HERDE K., DUCATELLE R., 2007.** Molecular-based identification of *Sarcocystis hominis* in belgian minced beef. *Journal of Food Protection*, 70(6), 1523-1526.

**VERCRUYSSSE J., FRANSEN J., VAN GOUBERGEN M., 1989.** The prevalence and identity of *Sarcocystis* cysts in cattle in Belgium. *Journal of Veterinary Medicine. Series B*, 36(2), 148-153.

**WOUDA W., SNOEP J.J., DUBEY J.P., 2006.** Eosinophilic Myositis due to *Sarcocystis hominis* in a beef cow. *Journal of Comparative Pathology*, 135(4), 249-253.

**XIANG Z., CHEN X., YANG L., HE Y., JIANG R., ROSENTHAL M., LUAN P., ATTWOOD S.W., ZUO Y., ZHANG Y.P., YANG Z., 2009.** Non-invasive methods for identifying oocysts of *Sarcocystis* spp. from definitive hosts. *Parasitology international*, 58, 293-296.

**XIANG Z., HE Y., ZHAO H., ROSENTHAL BM., DUNAMS DB., LI X., ZUO Y., FENG G., CUI L., YANG Z., 2011.** *Sarcocystis cruzi*: comparative studies confirm natural infections of buffaloes. *Experimental parasitology*.

**YANG Z.Q., LI Q.Q., ZUO Y.X., CHEN X.W., CHEN Y.J., NIE L., WEI C.G., ZEN J.S., ATTWOOD S.W., ZHANG X.Z., ZHANG Y.P., 2002.** Characterization of *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. *Experimental parasitology*, 102, 212-217.



# **ETUDE DE L'IMPLICATION DE *SARCOCYSTIS* SPP. DANS LE DEVELOPPEMENT DES MYOSITES EOSINOPHILIQUES CHEZ LES BOVINS**

## **RESUME**

Le rôle de *Sarcocystis* spp. dans le développement des myosites éosinophiliques chez les bovins est depuis longtemps suspecté sans être objectivé. La recherche par PCR de sarcocystes montre que 46% des lésions de myosite éosinophilique sont associées à la présence d'ADN de *Sarcocystis* dans les muscles de bovins. Le séquençage identifie *Sarcocystis hominis* dans 96 % des échantillons positifs. Ces résultats sont à prendre en compte dans la gestion du risque *Sarcocystis*.

## **SUMMARY**

The role of *Sarcocystis* spp. in the development of eosinophilic myositis in cattle has been suspected for a long time but not really shown. The detection of *Sarcocystis* DNA by PCR show that 46 % of eosinophilic myositis were associated with the presence of *Sarcocystis* DNA in cattle muscles. The sequencing identified *Sarcocystis hominis* in 96 % of positive samples. These results must be taken into account in *Sarcocystis* risk management.

## **MOTS-CLES :**

Sarcosporidiose, *Sarcocystis*, bovin, réaction de polymérisation, ADN, séquençage, saisie des carcasses, abattoir.

## **JURY :**

Président : Monsieur Michel MARJOLET, Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes  
Rapporteur : Monsieur Jean-Michel CAPPELIER, Maître de Conférences à ONIRIS-Nantes  
Assesseur : Madame Nathalie RUVOEN, Maître de Conférences à ONIRIS-Nantes

## **ADRESSE DE L'AUTEUR :**

4 avenue des Iris, l'Onglette  
44240 Sucé sur Erdre

## **NOM DE L'IMPIMEUR :**

Imprimerie d'ONIRIS