

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

ANNEE 2013

MYOSITE EOSINOPHILIQUE ET SARCOSPORIDIOSE BOVINE :
IMPLICATION DES DIFFERENTES ESPECES DE
SARCOCYSTIS SPP.

THESE
pour le
diplôme d'Etat
de
DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement
le 13 novembre 2013
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Marie BERTIN

Née le 08 mars 1987 à Roanne (42)

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 Catherine MAGRAS
Professeur 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 (Pr)
PHARMACOLOGIE et TOXICOLOGIE	Yassine MALLEM (MCC) 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 (Pr)	Julie HERVE (MC)
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	Laurent LE THUAUT (MC) Thierry SEROT (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Carole PROST (Pr) Florence TEXIER (MC) Mathilde MOSSER (MCC)
MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE INDUSTRIELLE	Xavier DOUSSET (Pr) Bénédicte SORIN (Chef de travaux) Bernard ONNO (MC)	Hervé PREVOST (Pr) Emmanuel JAFFRES (MC) Nabila Haddad (MC)
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 CAPPELLIER (MC)
MEDECINE DES ANIMAUX D'ELEVAGE	Arlette LAVAL (Pr émérite) Catherine BELLOC (MC) Isabelle BREYTON (MC) Christophe CHARTIER (Pr)	Alain DOUART (MC) Sébastien ASSIE (MC) Raphaël GUATTEO (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MCC)
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 émérite) Suzanne BASTIAN-ORANGE (MC)	Nathalie RUVOEN-CLOUET (MC) Carole PEROZ (MC)
ZOOTECHE, ECONOMIE	Aurélien MADOUASSE (MCC) Xavier MALHER (Pr) François BEAUDEAU (Pr)	Christine FOURICHON (MC) Nathalie BAREILLE (Pr)
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) Caroline TESSIER (MCC)	Gwenola TOUZEAU (MCC) 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) Nicolas CHOUIN (MCC)	Marion FUSELLIER (MC) Jack-Yves DESCHAMPS (MC) Odile SENECAT (MC) Françoise ROUX (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) Laurence POTTIER (MC)	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 CARIU (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) Florence BEAUGRAND (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 :

BERTIN, M. (2013). Myosite éosinophilique et sarcosporidiose bovine : implication des différentes espèces de *Sarcocystis* spp. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine de Nantes. Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique. 136 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 et sa bienveillance,
Sincères remerciements.*

A Madame Catherine MAGRAS, professeur à ONIRIS :
*Pour nous avoir fait l'honneur de participer à notre jury et pour ses conseils avisés
Sincères remerciements.*

A Monsieur Christophe CHARTIER, professeur à ONIRIS :
*Pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils avisés,
Sincères remerciements*

A Monsieur Olivier ALBARIC, ingénieur de recherche à ONIRIS :
*Pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils avisés,
Sincères remerciements*

A Monsieur Nicolas OUDOT, vétérinaire à Boviloire :
*Pour son implication tout au long de l'étude,
Hommages respectueux.*

A Monsieur Philippe TESSERAU, directeur de Boviloire :
*Pour avoir été l'investigateur de cette étude.
Hommages respectueux.*

A Monsieur Albert ROSSERO, ingénieur d'étude à ONIRIS :
*Pour ses conseils techniques avisés et son aide tout au long de l'étude,
Sincères remerciements*

A l'équipe UMR-INRA 1014 SECALIM :
*Pour leur accueil et leur disponibilité,
Remerciements chaleureux.*

A Cyprien WILLEMSE, stagiaire :
*Pour son implication, son aide attentive, son travail soigneux,
Remerciements chaleureux.*

A mes parents, à mon frère et ma sœur :

Pour votre soutien et votre amour indéfectibles, pour tous les moments passés ensemble, pour tous vos appels et messages.

A mes grands-parents et à mes cousins/cousines :

Pour toutes vos pensées positives, pour tous les moments partagés, à Noël et en été, pour tous les fous rires et les heures de jeux.

A mes amis de prépa :

Pour votre soutien, votre amitié, pour tous les fous rires et les excellents moments sportifs, intellectuels, voyages... passés ensemble. Des amis pour la vie : Rosemarie, Etienne, François, Laure. Au plaisir de vous revoir sans tarder.

Aux chouchous :

Pour tous les regards échangés en TD, tous les moments passés ensemble, toutes les soirées, les tours en voiture, les journées en clinique, pour notre soutien mutuel dans tous les moments difficiles.

Aux colocs :

Pour cette grande année passée à vos côtés, et tous les moments passés ensemble par la suite. Marthe sera toujours dans nos cœurs.

Aux filles :

Pour cette "rencontre" de fin d'étude, pour les pique-niques, les fous rires, les mots fléchés, les sorties à la plage, les embouteillages et les moments de ras-le-bol.

Aux copains/copines de running ainsi qu'à toutes les personnes formidables rencontrées à l'école et en stage :

Pour toutes les sorties qui changent les idées, pour toutes les grandes et les petites victoires partagées ensemble, pour toutes ces discussions précieuses. Aujourd'hui plus forts qu'hier !

A Jean-Jacques RIVAT et sa famille, à BRAILLE et tous ses membres :

Pour m'avoir donné envie d'aller plus loin.

Aux amis du passé et à ceux du présent :

Pour toutes les choses partagées au cours de ces 26 dernières années.

Et enfin à Florent :

Pour ton soutien toujours, pour ton amour et ta patience.

TABLE DES MATIERES

<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	14
<i>LISTE DES FIGURES</i>	15
<i>LISTE DES ANNEXES</i>	17
<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i>	18
<u>Introduction</u>	20
<u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	25
<u>I- CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET BIOLOGIQUES DE SARCOCYSTIS SPP.</u>	28
<u>I-A Taxinomie</u>	28
<u>I-B Cycles évolutifs</u>	28
<u>I-C Morphologie</u>	30
<u>II- ETUDE CLINIQUE</u>	33
<u>II-A Chez les bovins</u>	33
<u>II-A-1 Symptômes</u>	33
<u>II-A-2 Diagnostic</u>	33
<u>II-A-2-a Diagnostic du vivant de l'animal</u>	33
<u>II-A-2-b Diagnostic post mortem</u>	34
<u>II-A-3 Traitement chez les bovins</u>	40
<u>II-B Chez l'homme, hôte définitif</u>	40
<u>II-B-1 Symptômes</u>	40
<u>II-B-2 Diagnostic</u>	41
<u>II-B-3 Traitement</u>	41
<u>II-C Chez les carnivores, hôtes définitifs</u>	41
<u>III- PATHOGENIE ET IMMUNOLOGIE</u>	42
<u>III-A Pathogénie</u>	42
<u>III-B Immunologie</u>	42
<u>III-B-1 Chez les hôtes intermédiaires</u>	42
<u>III-B-2 Chez les hôtes définitifs</u>	43
<u>IV- LESIONS CHEZ LES BOVINS</u>	43

<u>V- IMPORTANCE DE LA SARCOSPORIDIOSE</u>	46
<u>V-A Prévalence</u>	46
<u>V-B Epidémiologie</u>	49
<u>V-C Importance économique</u>	50
<u>VI- MOYENS DE LUTTE</u>	51
ETUDE EXPERIMENTALE	53
<u>I- MATERIELS ET METHODES</u>	55
<u>I-A Echantillonnage</u>	55
<u>I-B Digestion enzymatique des échantillons</u>	56
<u>I-C Extraction de l'ADN</u>	56
<u>I-D PCR multiplex et électrophorèse</u>	57
<u>I-E Etude histologique</u>	58
<u>I-F Interprétation des résultats</u>	59
<u>I-G Etude de population</u>	59
<u>II- RESULTATS</u>	60
<u>II-A Population d'étude</u>	60
<u>II-A-1 Caractéristiques épidémiologiques des bovins abattus et des bovins saisis pour myosite éosinophilique</u>	60
<u>II-A-2 Caractéristiques des carcasses saisis et non saisis</u>	64
<u>II-B Résultats de l'étude des prélèvements</u>	67
<u>II-B-1 Myosite éosinophilique</u>	67
<u>II-B-2 Prévalence de la sarcosporidiose</u>	74
<u>II-B-3 Détermination des espèces de Sarcocystis</u>	78
<u>II-B-3-a Espèces observées</u>	78
<u>II-B-3-b Données concernant les espèces</u>	80
<u>II-B-3-c Observation par élevage</u>	84
<u>III- DISCUSSION</u>	85
<u>II-A Technique d'analyse des échantillons</u>	85
<u>II-B Caractéristiques des populations d'étude</u>	88
<u>II-C Myosite éosinophilique et présence de Sarcocystis spp.</u>	89
<u>Conclusion</u>	92
<u>ANNEXES</u>	95

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résultats obtenus par Savini <i>et al.</i> en terme de sensibilité et spécificité de deux tests ELISA	34
Tableau 2 : Présentation des deux types de paroi de sarcocystes observables chez les bovins au microscope photonique	36
Tableau 3 : Parois des trois types de sarcocystes présents chez les bovins, vues au microscope électronique.....	38
Tableau 4 : Prévalence dans diverses régions du monde de l'infection par <i>Sarcocystis</i> spp. chez des animaux de rente	47
Tableau 5 : Prévalence de <i>Sarcocystis</i> spp. selon l'espèce de mammifère en jeu et le site musculaire étudié	48
Tableau 6 : Nombre de prélèvements par catégorie de muscles (hampe =H, lésion = L, cœur = C) en fonction de la saisie ou non de la carcasse pour motif de sarcosporidiose, et analyses pratiquées	56
Tableau 7 : Localisation des amorces et taille des amplicons obtenus (Chiesa <i>et al.</i> , 2011)	57
Tableau 8 a : Effectifs réels – Test de khi deux « Existe-t-il une différence significative entre races ? »	61
Tableau 8 b : Effectifs théoriques – Test de khi deux « Existe-t-il une différence significative entre races ? »	61
Tableau 9 : Risque relatif de saisie pour myosite éosinophilique en fonction de la race.....	62
Tableau 10 : Synthèse des résultats de l'étude histologique en fonction du type de prélèvements	74
Tableau 11 : Synthèse des résultats de prévalence obtenus par histologie au niveau des individus	74
Tableau 12 a : Synthèse des résultats de l'étude par PCR en fonction du type de prélèvements toutes analyses comprises	75
Tableau 12 b : Synthèse des résultats corrigés de l'étude par PCR en fonction du type de prélèvements	75
Tableau 13 : Synthèse des résultats de prévalence obtenus par PCR au niveau des individus.....	75
Tableau 14 : Comparaison des résultats de prévalence obtenus par les deux méthodes	77
Tableau 15 : Résultats d'identification de parois par histologie, au niveau du prélèvement	80
Tableau 16 : Résultats d'identification d'espèces dans les prélèvements par PCR multiplex	81
Tableau 17 : Résultats d'identification d'espèces par histologie, en nombre de prélèvements, extraits du tableau 15	81
Tableau 18 : Résultats d'identification d'espèces par PCR multiplex, en nombre de prélèvements, extraits du tableau 16.....	82
Tableau 19 a : Résultats d'identification d'espèces chez les bovins par histologie	82
Tableau 19 b : Résultats d'identification d'espèces chez les bovins par PCR multiplex.....	82
Tableau 20 : Nombre d'espèces identifiées chez les individus, dans le même prélèvement ou dans des prélèvements différents, PCR multiplex et histologie confondues	83

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma du cycle évolutif des espèces de <i>Sarcocystis</i> infectant les bovins (Cappelier et Honore, 2012).....	29
Figure 2 : Observation macroscopique de kystes sarcosporidiens dans un muscle de l'épaule d'un bovin(animal h15) (Nicolas Oudot, BOVILOIRE, 2012)	31
Figure 3 : A gauche un kyste à paroi fine de <i>S. cruzi</i> , et à droite un kyste à paroi épaisse de <i>S. hirsuta</i> ou <i>hominis</i> . Coloration Hémalun-éosine. x600. (Ghisleni <i>et al.</i> , 2006)	31
Figure 4 : Coupe transversale de sarcocysties en microscopie électronique, montrant des septa traversant le sarcocyste. (Wouda <i>et al.</i> , 2006)	32
Figure 5 : Ookystes de <i>S. cruzi</i> isolés à partir de fèces de chien (Xiang <i>et al.</i> , 2010).....	32
Figure 6 a : Lésions diffuses et étendues de myosite éosinophilique, observées dans un muscle de bovin (Cappelier et Honore, 2012)	44
Figure 6 b : Lésions multifocales disséminées de myosite éosinophilique, avec centre suppuré, sur une section de muscle de bovin (Wouda <i>et al.</i> , 2006).....	44
Figure 7 : Lésion microscopique de granulome éosinophilique dans un muscle de bovin (Wouda <i>et al.</i> , 2006).....	45
Figure 8 : Exemple de gel d'électrophorèse et sa grille de lecture	58
Figure 9 : Représentation des différentes populations de notre étude	59
Figure 10 a : Répartition des bovins dans P_{ab} selon leur race	60
Figure 10 b : Répartition des bovins dans P_{abs} selon leur race	60
Figure 11 : Taux de saisie en fonction de la race	61
Figure 12 : Répartition des animaux selon leur catégorie dans P_{ab}	62
Figure 13 : Taux de saisie selon la catégorie.....	62
Figure 14 : Parts relatives des différentes catégories parmi les bovins abattus en fonction de leur race	63
Figure 15 : Parts relatives des différentes catégories parmi les bovins saisis en fonction de leur race	63
Figure 16 : Répartition des carcasses (P_{ab}) en fonction de leur classement EUROP	65
Figure 17 : Répartition des carcasses saisies en fonction de leur classement EUROP	65
Figure 18 : Taux de saisie en fonction du classement EUROP.....	65
Figure 19 : Répartition des carcasses selon leurs poids dans P_{ab}	66
Figure 20 : Répartition des carcasses selon leurs poids dans P_{abs}	66
Figure 21 a : Coupe transversale de muscle strié squelettique, coloration HES, x100 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS)	68
Figure 21 b : Coupe longitudinale de muscle strié squelettique, coloration HES, x200 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS)	68
Figure 22 a : Coupe transversale de muscle strié cardiaque, coloration HES, x200 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS)	69
Figure 22 b : Coupe longitudinale de muscle strié cardiaque, coloration HES, x100 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS)	69

Figure 23 : Observation d'une lésion macroscopique sur un muscle strié squelettique de bovin (Nicolas OUDOT, BOVILOIRE, 2012)	70
Figure 24 : Lésion microscopique. Lésion d'aspect caractéristique, en grain de riz. Coloration HES, grossissement x20 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS)	71
Figure 25 a : Lésion aiguë. Coloration HES, grossissement x100 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).....	71
Figure 25 b : Lésion aiguë-détail. Coloration HES, grossissement x200 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).....	72
Figure 25 c : Lésion aiguë et kyste parasitaire à paroi épaisse-détail. Coloration HES, grossissement x400 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS)	72
Figure 26 a : Lésion chronique. Coloration HES, grossissement x100 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).....	73
Figure 26 b : Lésion chronique-détail. Coloration HES, grossissement x200 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS)	73
Figure 27 a : Kyste à paroi fine en bordure de myocyte. Coupe transversale de muscle (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS)	79
Figure 27 b : Kyste à paroi épaisse au centre d'un myocyte. Coupe transversale de muscle (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS)	79
Figure 28 : Exemple de bandes obtenues de différents poids moléculaires.....	80

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Protocole de digestion enzymatique	96
Annexe 2 : Protocole d'extraction d'ADN	97
Annexe 3 : Protocole de PCR multiplex <i>Sarcocystis</i> spp.....	99
Annexe 4 : Protocole de clonage	101
Annexe 5 : Résultats des gels d'électrophorèse observés à la lumière UV.....	103
Gel du 2 avril 2013	103
Gel du 22 avril 2013	104
Gel du 23 avril 2013	105
Gel du 24 avril 2013	106
Gel du 26 avril 2013	107
Gel du 30 avril 2013	108
Gel du 7 mai 2013	109
Gel du 14 mai 2013.....	110
Gel du 21 mai 2013.....	111
Gel du 8 juillet 2013 (1)	112
Gel du 8 juillet 2013 (2)	113
Gel du 8 juillet 2013 (3)	114
Gel du 22 juillet 2013 (1)	115
Gel du 22 juillet 2013 (2)	116
Gel du 23 juillet 2013 (1)	117
Gel du 23 juillet 2013 (2)	118
Gel du 24 juillet 2013 (1)	119
Gel du 24 juillet 2013 (2)	120
Gel du 24 juillet 2013 (3)	121
Gel du 25 juillet 2013 (1)	122
Gel du 25 juillet 2013 (2)	123
Résultats obtenus pour le clonage, le 28 avril 2013.....	124
Annexe 6 : Données statistiques.....	125

LISTE DES ABREVIATIONS

Classement EUROP : Classement de conformation des carcasses.

E : Conformation de qualité supérieure

U : Très bonne conformation

R : Bonne conformation

O : Assez bonne conformation

P : Conformation médiocre

HES : Hémalun Eosine Safran

GMQ : Gain Moyen Quotidien, il s'exprime en kg/j. C'est un indicateur de la croissance.

H/L/C : Identification des prélèvements de l'étude. H = Hampe, L = Lésion, C = Cœur.

h/p/t : Identification des bovins de l'étude. h = animaux traités en PCR et en histologie, p = animaux traités uniquement en PCR, t = animaux témoins, ils sont traités en PCR et en histologie.

JB : Jeune Bovin = bovin mâle non castré de moins de 24 mois.

LHA : Laboratoire d'Histopathologie Animale

ME : myosite éosinophilique

OR : Odd Ratio

P_{ab} : Population des animaux abattus en Pays de Loire de janvier à décembre 2012.

P_{abs} : Population des animaux saisis de janvier à décembre 2012.

PCR : Polymerase Chain Reaction

Introduction

Aujourd'hui, la qualité des produits alimentaires proposés au consommateur est en constante amélioration. En effet, d'une part le consommateur est de plus en plus exigeant sur les qualités organoleptiques des produits (aspect, goût, texture, teneur en matière grasse...(Cartier et Moevi, 2007)), et d'autre part, la réglementation impose des normes de sécurité et de traçabilité de plus en plus strictes. Le vétérinaire officiel en abattoir a un rôle très important à jouer sur ce dernier aspect, alors que les éleveurs et l'ensemble de la filière viande disposent de leviers d'action aux différents niveaux.

Dans cette optique, BOVILOIRE (Interprofession bovine des Pays de la Loire) représentant INTERBEV (Association Nationale Interprofessionnelle du Bétail et des Viandes) en Pays de la Loire, est à l'origine d'actions de recherche visant à améliorer ces qualités. Son activité de recherche et de développement se porte en particulier sur trois points : la sécurité des aliments, la gestion de la qualité et le bien-être animal (INTERBEV). BOVILOIRE finance notamment des études sur un parasite, *Sarcocystis*, qui porte atteinte à la fois à la sécurité de la viande, en provoquant une coccidiose intestinale chez l'homme, et aux qualités organoleptiques de la viande, en modifiant son aspect et sa couleur. En effet, ce parasite est suspecté d'être responsable, au moins en partie, de l'apparition de lésions de myosite éosinophilique chez les bovins, rendant la viande impropre à la consommation humaine. Cette atteinte musculaire est caractérisée par des ponctuations ou des plages verdâtres plus ou moins étendues (Wouda *et al.*, 2006) conduisant à la saisie partielle ou totale de la carcasse concernée. C'est une lésion inflammatoire musculaire, due à une augmentation du taux de granulocytes éosinophiles dans les fibres musculaires. Fréquemment asymptomatique, cette lésion est visible macroscopiquement sur la viande, contrairement à la seule présence du parasite qui est indétectable.

BOVILOIRE est de plus en plus concerné par les saisies pour "sarcosporidiose". (La lésion observée macroscopiquement devrait en réalité porter le nom de myosite éosinophilique, mais il existe une forte confusion entre ces deux termes. Dans notre étude, nous consacrerons donc le terme de sarcosporidiose au portage du parasite par les bovins, et le terme de myosite éosinophilique à la lésion observable macroscopiquement.) En effet, le taux de saisie pour ce motif de myosite éosinophilique s'élève à 0,85‰ des animaux abattus en 2011 (étude de BOVILOIRE). Et ce nombre de saisies est en augmentation régulière depuis quelques années (0,63‰ en 2010) ce qui pose un problème au F.A.R. (Fonds d'Assainissement Régional, qui vise à dédommager l'éleveur lorsque des lésions sont découvertes lors de l'abattage alors qu'elles étaient indétectables du vivant de l'animal). En effet, ces saisies conduisent à des remboursements des carcasses aux éleveurs concernés (à hauteur de 80% de la valeur de l'animal). Le nombre de dossiers de remboursement pour sarcosporidiose est en augmentation et dépasse celui des remboursements pour cysticercose (0,36‰ contre 0,85‰ en 2011). Il était, au moment de la mise en place du F.A.R., de 7 carcasses par an en 1991 (Mary, 2005) et est en 2012 de l'ordre de 363 carcasses par an. La sarcosporidiose, s'il s'avère qu'elle est bien corrélée à l'apparition de lésions de myosite éosinophilique, constitue dès lors un impact économique important.

Cependant le rôle de *Sarcocystis* spp. dans l'apparition de ces lésions est encore à approfondir, car si la prévalence de ce parasite avoisine les 100% chez les bovins et ce de façon cosmopolite (Bucca *et al.*, 2011; Ghisleni *et al.*, 2006; Huong, 1999; Vercruysse *et al.*, 1989), l'apparition de lésions reste relativement peu fréquente (0,8‰ en Pays-de-la-Loire en 2011). De plus, si les connaissances générales sur le parasite sont assez étendues aujourd'hui, son interaction avec l'hôte et, par là, son rôle dans l'apparition des myosites éosinophiles restent assez méconnues. Ces lacunes dans la connaissance de ce parasite et de ses interactions avec son hôte intermédiaire font de ce thème de recherche un thème très intéressant et toujours très actuel.

Trois espèces de *Sarcocystis* font intervenir les bovins comme hôtes intermédiaires et se développent donc dans leurs muscles : *S. cruzi*, *S. hirsuta*, *S. hominis*, ayant respectivement les canidés, les félinés et les primates (l'homme) comme hôtes définitifs. *S. hominis* est donc de plus un agent zoonotique mineur. Il est en effet à l'origine d'une coccidiose intestinale se caractérisant par une atteinte gastro-intestinale passant souvent inaperçue ou très bénigne chez l'homme. De la même façon

l'homme peut être atteint par *S. suis/hominis* qui fait intervenir le porc comme hôte intermédiaire. En outre il semblerait que *S. hominis* présente un cycle épidémiologique très performant, avec des prévalences élevées chez l'homme et chez les bovins, permettant actuellement le développement du parasite et conduisant à l'augmentation du nombre de cas observés (Vangeel *et al.*, 2007). La dissémination du parasite est d'autant plus efficace dans les contrées de l'ouest de l'Europe où la viande est régulièrement consommée crue ou peu cuite.

BOVILOIRE a déjà financé au cours des années précédentes 3 thèses sur le sujet de la sarcosporidiose bovine. L'une d'entre elles visait à étudier les facteurs de risque d'apparition de la sarcosporidiose et de lésions de myosite éosinophilique tandis que les deux autres concernaient l'étude de la prévalence de *Sarcocystis* spp. chez les bovins et leur rôle dans l'apparition des lésions de myosite éosinophilique. La première étude concernant la prévalence utilisait trois méthodes : l'histologie qui est la méthode de référence dans l'étude du parasite, la digestion enzymatique et la PCR (Mary, 2005). La seconde étude utilisait une PCR avec séquençage pour l'identification des espèces en cause (Honoré, 2011).

Les objectifs de cette étude sont : i) d'approfondir les connaissances sur le lien entre la présence de kystes sarcosporidiens et des lésions macroscopiques et microscopiques, de myosite éosinophilique ; et ii) de répondre aux questions suivantes :

- Quelle est la prévalence de l'infection des bovins et quelles sont les espèces parasitaires incriminées ?
- Existe-t-il une espèce de *Sarcocystis* associée plus fréquemment à l'apparition des lésions macroscopiques et microscopiques de myosite éosinophilique ?
- L'association d'au moins deux espèces de *Sarcocystis* est-elle à l'origine de l'apparition de ces lésions ?
- Les espèces parasitaires ont-elles des sites musculaires électifs qui leur sont propres ?
- Existe-t-il des effets liés aux animaux (race, âge, sexe...) ?

Cette étude débutera par une synthèse des données bibliographiques. L'étude expérimentale s'articulera ensuite autour de trois parties. La première présentera l'ensemble du matériel et des méthodes employés. Les résultats seront ensuite présentés, puis discutés dans une troisième partie avant de conclure.

Etude **bibliographique**

I- Caractères morphologiques et biologiques de *Sarcocystis* spp.

I-A Taxinomie

La sarcosporidiose est une maladie parasitaire déterminée par le développement de coccidies kystogènes appartenant à la famille des Isosporidés, la sous-famille des Sarcocystinés et au genre *Sarcocystis* (phylum des *Apicomplexa*, classe des sporozoaires) (Euzeby, 1997; Euzeby, 1998). Les hôtes définitifs sont, dans la majorité des cas, les prédateurs (oiseaux, serpents, mammifères...), d'hôtes intermédiaires qui sont le plus souvent des herbivores ou des omnivores (Euzeby, 1998). Jusqu'à récemment *Sarcocystis* spp. était réputé être très spécifique de ses hôtes intermédiaires. Cependant, en 2002 Yang *et al.* ont montré, grâce à une technique de PCR-RFLP, que certaines espèces (par exemple *S. hominis* et *S. hirsuta*) étaient à la fois parasites chez la vache et chez le buffle (Yang *et al.*, 2002).

I-B Cycles évolutifs

Chez les bovins, la sarcosporidiose musculaire est le fait de trois espèces *Sarcocystis cruzi*, *S. hirsuta* et *S. hominis*, pour lesquelles les bovidés (vache, buffle) (Jehle *et al.*, 2009) servent d'hôtes intermédiaires, et dont les hôtes définitifs sont respectivement les canidés, les félidés et les primates (Desportes-Livage et Datry, 2005). Le cycle évolutif du parasite chez ses différents hôtes est présenté dans la figure 1.

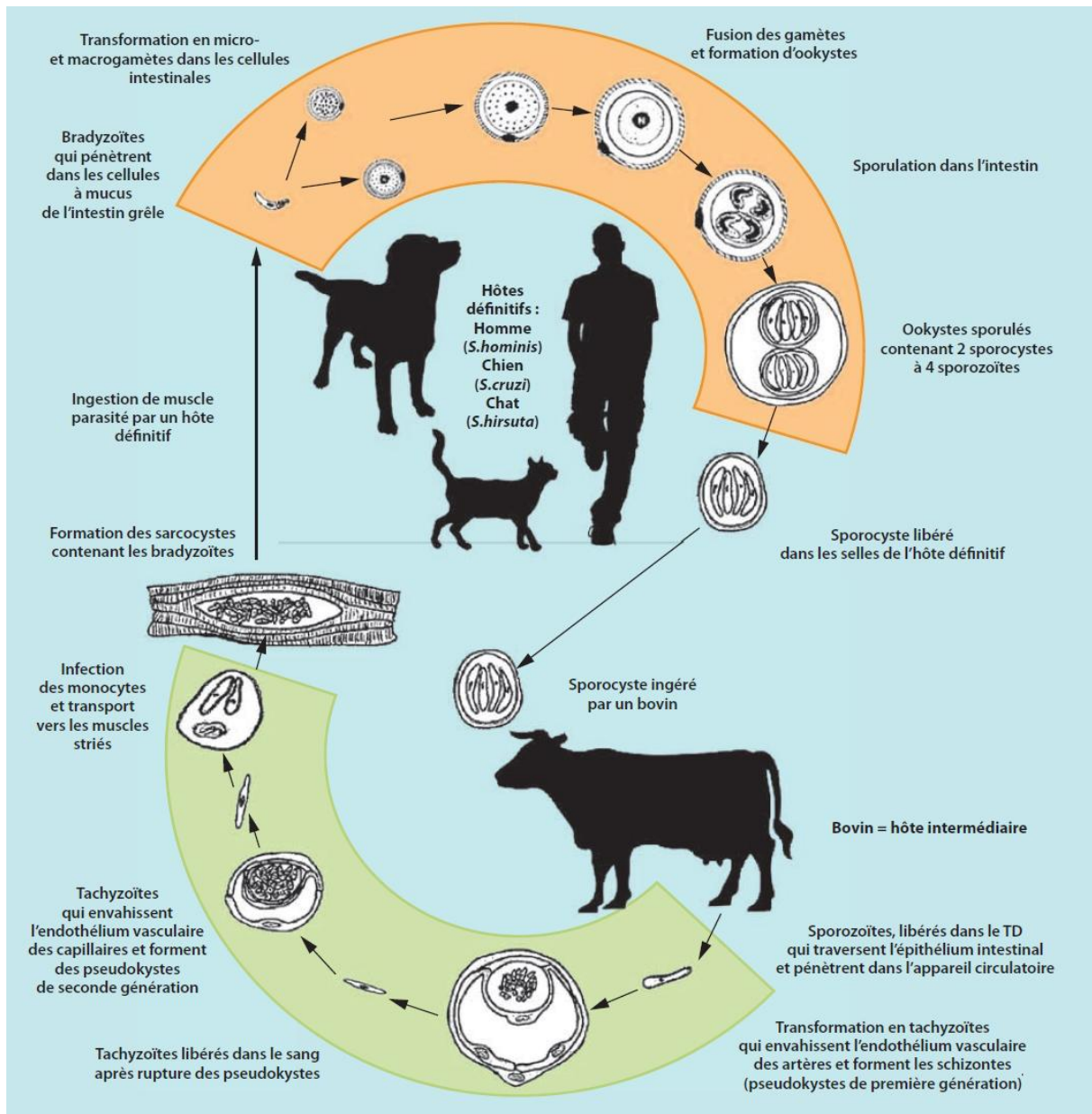


Figure 1 : Schéma du cycle évolutif des espèces de *Sarcocystis* infectant les bovins (Cappelier et Honore, 2012)

- Cycle chez les bovins, hôtes intermédiaires (Desportes-Livage et Datry, 2005; Dubey et al., 1988)

Les bovins s'infectent en ingérant les oookystes ou les sporocystes, libérés dans l'environnement et à proximité de leurs aires d'alimentation ou d'abreuvement par un hôte définitif. Le sporocyste ingéré est ouvert sous l'effet de la digestion et libère les 4 sporozoïtes qu'il contient dans l'intestin grêle.

Les sporozoïtes migrent alors à travers l'épithélium intestinal et envahissent les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins à proximité. C'est dans ces cellules endothéliales qu'ils deviennent schizontes et qu'a lieu la première schizogonie donnant naissance à la première génération de mérozoïtes entre 7 jours et 15 jours après ingestion, puis la seconde génération entre 19 jours et 46 jours après ingestion.

Chaque schizonte peut conduire à la formation d'une centaine de mérozoïtes que l'on peut retrouver dans le sang entre 24 jours et 46 jours post-ingestion. Les mérozoïtes se situent soit en position extracellulaire dans les vaisseaux sanguins, soit en position intracellulaire dans les monocytes circulant ou dans de nouvelles cellules endothéliales. Ils envahissent ainsi l'ensemble du système vasculaire. C'est dans les cellules endothéliales du corps entier, mais en particulier des glomérules rénaux que l'on peut observer la troisième génération qui est constituée de schizontes polynucléaires.

Les schizontes issus de cette génération induisent la formation de kystes musculaires, les sarcocystes, par production de très nombreux mérozoïtes désignés dès lors par le terme de bradyzoïtes ou cystozoïtes. C'est à partir de cette étape que les sarcocystes deviennent infectieux pour les hôtes définitifs, soit au moins deux mois après l'ingestion.

- Cycle chez les hôtes définitifs (Desportes-Livage et Datry, 2005; Dubey *et al.*, 1988; Euzeby, 1997; Euzeby, 1998)

Les hôtes définitifs (chats, chiens, hommes) s'infectent en consommant de la viande bovine crue ou insuffisamment cuite contenant des kystes parasitaires matures.

La paroi des sarcocystes se rompt après l'ingestion, libérant les bradyzoïtes qui deviennent mobiles et se logent dans les cellules de la *lamina propria* de l'hôte définitif. Les bradyzoïtes deviennent alors microgamétocytes ou macrogamétocytes. Le microgamétocyte est à l'origine après des divisions cellulaires de plusieurs microgamètes. Le macrogamétocyte devient directement macrogamète et pourra fusionner avec un microgamète donnant alors l'ookyste.

Après la sporogonie, chaque ookyste contient deux sporocystes et à l'issue de la période prépatente, qui est donc de l'ordre de 10 à 15 jours, les ookystes sont libérés avec les matières fécales et sont infectants. La paroi des ookystes se rompt parfois et on retrouve directement les sporocystes qui contiennent chacun quatre sporozoïtes dans les fèces. La dissémination des ookystes se prolonge pendant au moins un mois.

I-C Morphologie

- Chez l'hôte intermédiaire

Les kystes musculaires apparaissent comme des formations submicroscopiques (0,5-3 mm x 0,3 mm) allongées dans le sens des fibres, voir figure 2. Ils ne sont vraiment visibles que lorsqu'ils sont assez nombreux et coalescents et forment alors de petites tâches ovoïdes de couleur grisâtre, jaunâtre ou verdâtre s'il y a infiltration éosinophilique (Euzeby, 1998).



Figure 2 : Observation macroscopique de kystes sarcosporidiens dans un muscle de l'épaule d'un bovin (animal h15) (Nicolas Oudot, BOVILOIRE, 2012)

En microscopie, on peut observer les sarcocystes. Leur longueur peut varier selon l'espèce et le stade d'évolution du sarcocyste. Les sarcocystes de *S. cruzi* mesurent moins de 500 μm , ceux de *S. hirsuta* moins de 8 mm, et ceux de *S. hominis* moins de 950 μm (Tenter, 1995). L'épaisseur de la paroi est un bon critère de détermination de l'espèce impliquée. *S. cruzi* présente une paroi fine alors que *S. hominis* et *S. hirsuta* ont une paroi épaisse, voir figure 3.

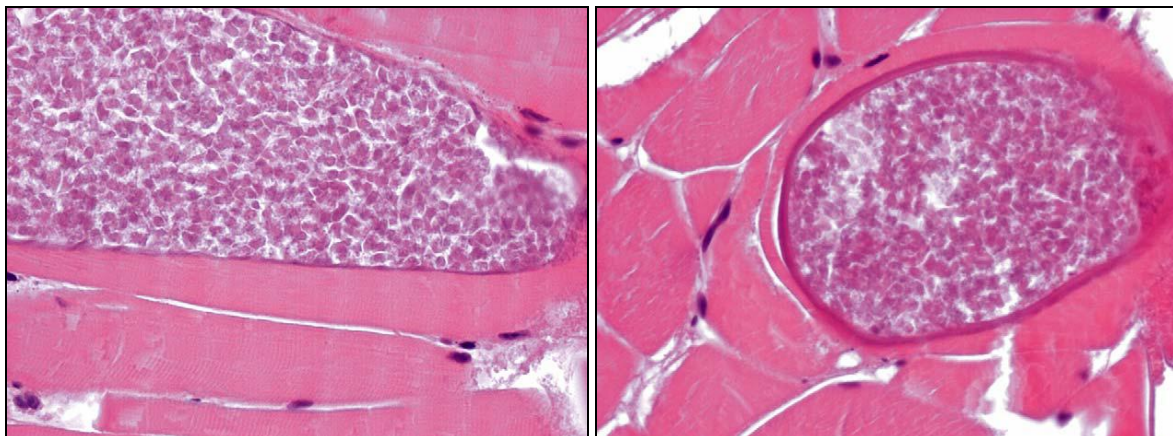


Figure 3 : A gauche un kyste à paroi fine de *S. cruzi*, et à droite un kyste à paroi épaisse de *S. hirsuta* ou *hominis*. Coloration hémalum-éosine. x 600. (Ghisleni *et al.*, 2006)

Pour différencier par microscopie les deux espèces à paroi épaisse, il est nécessaire d'observer en microscopie électronique la structure des villosités pariétales ou microphanères. *S. hominis* présente des villosités en palissade et en forme de doigts, tandis que *S. hirsuta* présente des villosités plus arrondies et plus courtes (voir plus loin tableau 2).

En coupe transversale, les sarcocystes apparaissent cloisonnés en alvéoles, qui contiennent les bradyzoïtes allongés en forme de banane mesurant de 8 à 12 μm de long, voir la figure 4.

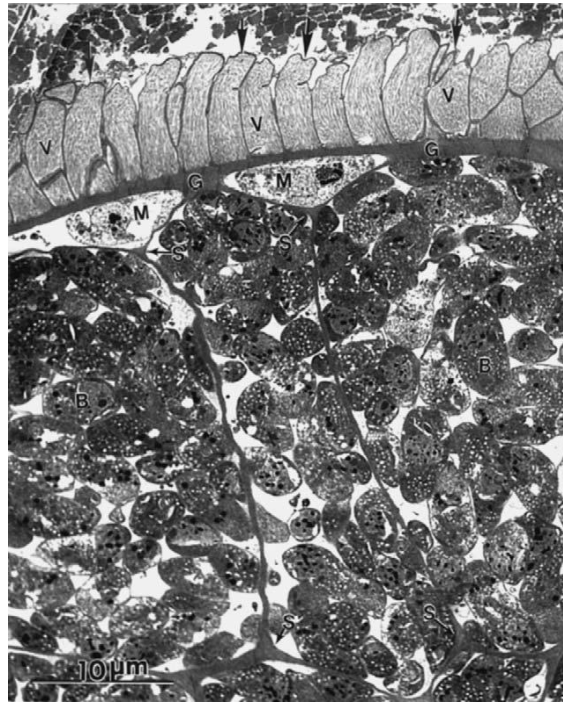


Figure 4 : Coupe transversale de sarcocystes en microscopie électronique, montrant des septa traversant le sarcocyste. (Wouda *et al.*, 2006)
 Bradyzoïtes (B), mérocytes (m).

- Chez l'hôte définitif

On trouve chez l'hôte définitif des ookystes contenant chacun 2 sporocystes, voir figure 5. Chez le chien ces ookystes mesurent en moyenne 16,20 x 10,53 μm (Xiang *et al.*, 2010). Les sporocystes sont ovoïdes, mesurent de 12-16 μm x 8-12 μm et contiennent chacun 4 sporozoïtes (Euzéby, 1998). Cependant, cette structure des ookystes ou des sporocystes qui est souvent utilisée pour déterminer les espèces d'autres coccidies, n'a que très peu d'intérêt dans le cas de l'infection par *Sarcocystis* spp.. En effet, en dehors des variations plutôt mineures de taille, les structures sont fortement similaires ; de plus, les différentes espèces de *Sarcocystis* infectant un hôte définitif donné ont souvent des sporocystes de dimensions similaires. (Dubey *et al.*, 1988)

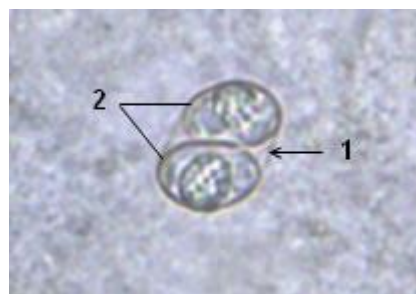


Figure 5: Ookystes de *S. cruzi* isolés à partir de fèces de chien. (Xiang *et al.*, 2010)
 1 : paroi de l'ookyste; 2 : sporocystes

II- Etude clinique

II-A Chez les bovins (Euzeby, 1998; Savini *et al.*, 1996; Tenter, 1995)

II-A-1 Symptômes

La quantité de sporocystes ingérés est déterminante dans l'apparition ou non de signes cliniques, ainsi que l'immunité de prémunition acquise ou non chez l'individu infecté. La plupart du temps, l'infection des bovins par *Sarcocystis* est asymptomatique.

L'infection des bovins par *Sarcocystis* se présente en général sous sa forme chronique qui se caractérise par la formation de kystes intramusculaires sans qu'aucun signe clinique ne soit visible. Cette forme chronique s'installe après 4 mois d'évolution du parasite dans l'organisme. Toutes les masses musculaires peuvent être concernées par cet enkystement, mais certaines sont considérées comme électives : c'est le cas du myocarde, de l'oesophage, de la langue et du diaphragme. Des symptômes musculaires de type rhumatoïdes peuvent être observés, et sont polymorphiques selon le groupe de muscles atteint avec, par exemple, des difficultés à la préhension ou à la déglutition lorsque la sphère oro-buccale est atteinte. Cependant ces symptômes ne sont pas toujours visibles et très rarement détectés. En revanche la diminution des performances de production (GMQ, poids moyen à l'abattage...) due à l'évolution sub-clinique de la maladie est réelle (Daugschies *et al.*, 2000).

Parfois cependant l'infection peut évoluer sous une forme aiguë conduisant à l'apparition de signes cliniques non spécifiques. Par conséquent elle n'est que rarement suspectée et pratiquement jamais diagnostiquée sur le terrain. L'apparition de cette forme aiguë a lieu notamment lorsqu'une haute dose de sporocystes infectants est ingérée par des bovins naïfs. *S. cruzi* est réputée être la plus pathogène des espèces évoluant chez les bovins. D'après Dubey (1989) les bovins ne développent pas de forme aiguë en dessous de 200 000 sporocystes de *S. cruzi* ingérés en une fois.

La sarcosporidiose aiguë s'exprime par de nombreux signes cliniques non spécifiques tels que fièvre, diarrhée, anorexie, perte de poids, anémie, frissons, alopecie ; des formes nerveuses sont également possibles. Chez les vaches gestantes, l'avortement est possible, avec ou sans lésions foetales et placentaires (Savini *et al.*, 1996; Tenter, 1995). La sarcosporidiose aiguë peut occasionnellement entraîner la mort de l'animal (Dubey *et al.*, 1988).

II-A-2 Diagnostic

II-A-2-a Diagnostic du vivant de l'animal

Du point de vue clinique, le diagnostic est très difficile et on ne peut exprimer qu'une suspicion qui devra être, le cas échéant, étayée par des examens de laboratoire, spécifiques ou non spécifiques :

- des examens sérologiques spécifiques utilisant soit une méthode par immunofluorescence indirecte (IFI), soit une méthode ELISA,
- des examens hématologiques spécifiques (recherche de tachyzoïtes circulants, libres ou inclus)
- des examens biochimiques et hématologiques (lymphocytose) non spécifiques.

En 1987, une équipe chinoise a travaillé sur un test ELISA utilisant des antigènes de bradyzoïtes, démontrant une sensibilité de 99% et une spécificité de 91% (Shi et Zhao, 1987).

Dix ans plus tard, Savini *et al.* (1997) ont comparé deux méthodes ELISA, l'une mise en place à l'aide d'antigènes provenant de bradyzoïtes (ELISA brady) et l'autre mise en place à l'aide d'antigènes issus de mérozoïtes (ELISA méro). Ils comparèrent la sensibilité et la spécificité de chaque test, pour un individu et pour un troupeau, sachant qu'un troupeau est considéré négatif si au moins 5 animaux issus de ce cheptel se sont révélés négatifs à l'ELISA. Ils ont fait l'hypothèse préalable d'une prévalence de l'ordre de 50 %.

Ils obtiennent les valeurs suivantes :

Tableau 1 : Résultats obtenus par Savini *et al.* en terme de sensibilité et spécificité de deux tests ELISA.

		Individu	Troupeau
Sensibilité	ELISA brady	95%	100%
	ELISA méro	98%	100%
Spécificité	ELISA brady	84%	67%
	ELISA méro	97%	100%

Cette étude permet donc de conclure à la haute spécificité et sensibilité des tests ELISA basés sur les antigènes issus de mérozoïtes. Ce test rapide et peu cher peut donc être utilisé pour des études épidémiologiques, aussi bien à l'échelle du troupeau, que des individus.

Cependant, l'intérêt des méthodes sérologiques dans le cas de la sarcosporidiose est limité dans la pratique, aussi bien en tant que méthode diagnostique de routine, que lors d'études épidémiologiques. Tout d'abord parce qu'un grand nombre d'animaux porteurs de mérozoïtes circulants seront porteurs d'antigènes sans être encore porteurs de kystes musculaires et donc éventuellement positifs en ELISA. Enfin parce que cette méthode ne permet pas l'identification des espèces impliquées (Savini *et al.*, 1997), ce qui est une information essentielle dans le cadre d'études épidémiologiques.

II-A-2-b Diagnostic post mortem

Après la mort de l'animal, l'accès direct aux muscles qui sont le siège des kystes sarcosporidiens, est possible. Ceci permet d'une part, l'observation des éventuelles lésions et d'autre part, l'application de plusieurs méthodes diagnostiques.

- ELISA sur coupe

Un test ELISA basé sur les antigènes des bradyzoïtes est réalisable sur les coupes de muscles, aussi bien en phase aiguë qu'en phase chronique. En phase chronique, l'ELISA reste positive jusqu'au taux de dilution de 1/1280 (Euzeby, 1998).

- coupe histologique

Les prélèvements de muscles sont fixés dans le formol 10%. On réalise des coupes d'épaisseur 3-4µm qui sont ensuite colorées à l'hématoxyline-éosine (Vercruyse *et al.*, 1989).


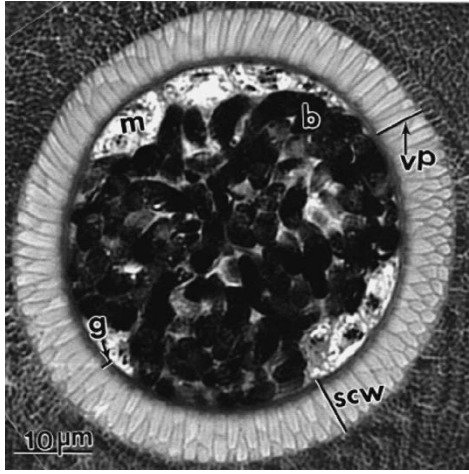
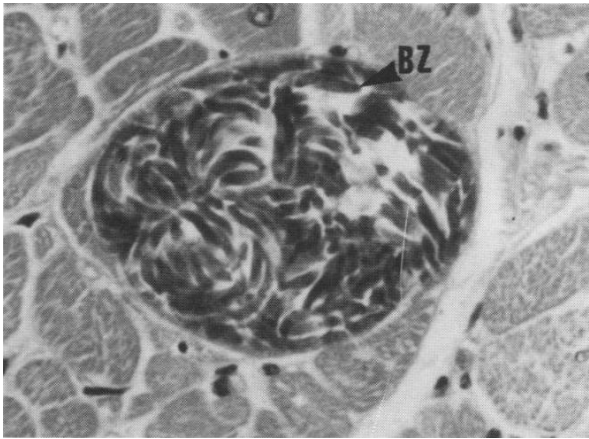
- microscopie

L'observation au microscope peut se faire sur des prélèvements fixés et coupés comme vu ci-avant (Vercruyse *et al.*, 1989), sur des sarcocystes obtenus après une digestion enzymatique préalable (Mary, 2005), sur des sarcocystes énucléés à l'aide de micro-forceps et d'aiguilles (Odening *et al.*, 1996).

Elle permet d'une part, de faire le diagnostic de sarcosporidiose par mise en évidence des sarcocystes et d'autre part, par l'observation de la morphologie de la paroi, d'identifier les espèces impliquées. A l'heure actuelle 37 types de parois différentes ont été décrits (Chen *et al.*, 2007).

Dans le cas des espèces infectant les bovins, *Sarcocystis cruzi* qui possède une paroi fine (<1 µm), peut facilement être différencié de *Sarcocystis hominis* et *Sarcocystis hirsuta* qui possèdent une paroi plus épaisse (2 - 7 µm) et qui ne sont pas différenciables l'un de l'autre en microscopie photonique, voir le tableau 2 (Wouda *et al.*, 2006).

Tableau 2 : Présentation des deux types de paroi de sarcocystes observables chez les bovins au microscope photonique.

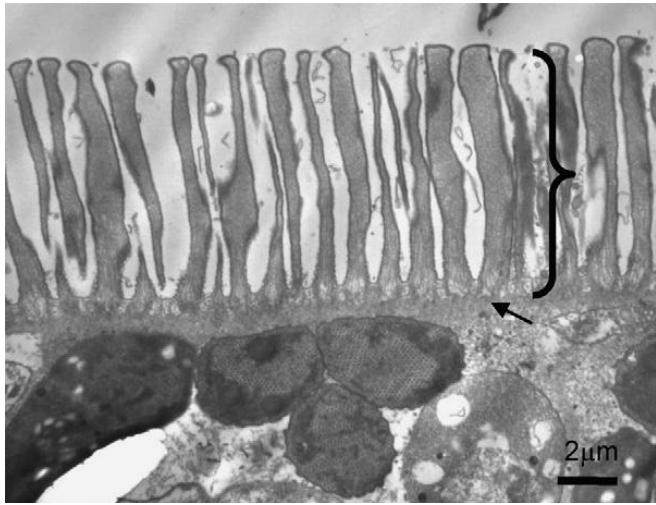

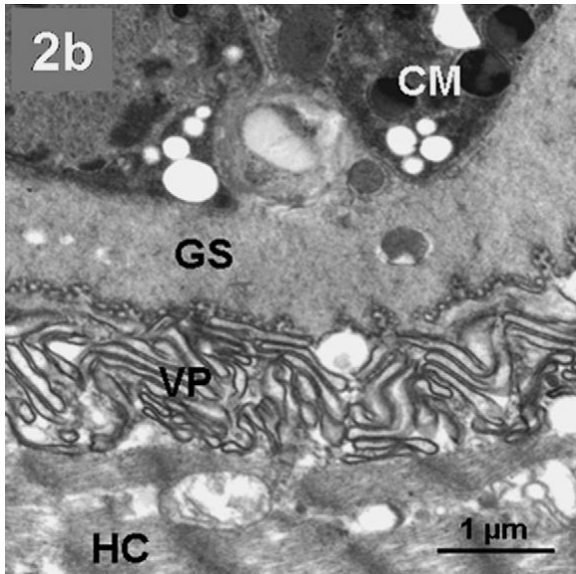
<p>TYPE I, Paroi épaisse <i>Sarcocystis hirsuta</i> ou <i>Sarcocystis hominis</i></p>	<p>Photo a. Sarcocyste de <i>Sarcocystis hominis</i> au microscope photonique, coloré à l'hématoxyline-éosine. (Wouda <i>et al.</i>, 2006)</p>	<p>Sarcocyste contenant des bradyzoïtes. On observe des villosités en forme de doigts (vp). Autour du sarcocyste, de nombreux éosinophiles et des myocytes (m) dégénérés.</p>	
	<p>Photo b. Sarcocyste de <i>Sarcocystis hominis</i> au microscope photonique, coloré au bleu de toluidine. (Wouda <i>et al.</i>, 2006)</p>	<p>Sarcocyste contenant des bradyzoïtes (Granstrom <i>et al.</i>) des mérozoïtes (m). On note bien l'épaisseur de la paroi et la présence des villosités (vp)</p>	
<p>TYPE II, Paroi fine, <i>Sarcocystis cruzi</i></p>	<p>Photo c. Sarcocyste de <i>Sarcocystis cruzi</i> au microscope photonique, coloration H & E, grossissement x 800. (Gajadhar et Marquardt, 1992)</p>	<p>Sarcocyste contenant de nombreux bradyzoïtes (bz). Pas de réaction éosinophile sur cette image. On note la finesse de la paroi quasi non visible, et l'absence de protrusions vraiment visibles.</p>	

Cette méthode est utilisable pour l'identification de certaines espèces, même après congélation des échantillons (Chen *et al.*, 2007), et même si ceux-ci ont effectivement perdu leur caractère infectieux.

Cependant cette méthode présente un certain nombre d'inconvénients : c'est une méthode très longue et coûteuse nécessitant un personnel compétent (More *et al.*, 2010), en outre, elle ne permet pas de différencier toutes les espèces de *Sarcocystis* (Wouda *et al.*, 2006), et sa sensibilité est relativement peu élevée puisqu'on ne peut analyser qu'une faible proportion de muscle pour chaque prélèvement (Tenter, 1995).

La microscopie électronique permet, quant à elle, de différencier les deux espèces de *Sarcocystis* à paroi épaisse, que sont *S. hominis* et *S. hirsuta*. On étudie alors la morphologie des microvillosités. Les villosités des sarcocystes de *S. hirsuta* ont une base étroite puis sont étendues latéralement et effilées distalement, alors que les sarcocystes de *S. hominis* présentent des microvillosités cylindriques, très proches les unes des autres, avec une base large et une extrémité distale émoussée (Wouda *et al.*, 2006).

Tableau 3 : Parois des trois types de sarcocystes présents chez les bovins, vues au microscope électronique.

<p>Paroi de <i>Sarcocystis hominis</i> au microscope électronique. (More et al., 2010)</p>	<p>Paroi de sarcocyste montrant des microvillosités en palissade soutenues par une couche dense aux électrons.</p>	
<p>Paroi de <i>Sarcocystis hirsuta</i> au microscope électronique. (More et al., 2010)</p>	<p>Paroi de sarcocyste montrant des microvillosités en forme dite de langue, à base étroite (flèche jaune), plus larges au milieu et effilées distalement. La flèche noire indique des microfilaments et des granules denses aux électrons.</p>	
<p>Paroi de <i>S. cruzi</i> microscopie électronique à transmission. (Jehle et al., 2009)</p>	<p>Paroi fine, présentant des microvillosités filamenteuses et sans microtubules VP = villosités, HC = cellule hôte, CM = mérozoïtes</p>	

Cependant, la microscopie électronique présente également des inconvénients majeurs, tels que le coût, une sensibilité assez faible et la nécessité d'avoir un personnel compétent en taxinomie.

- Diagnostic moléculaire

Les méthodes de diagnostic moléculaire ont connu une forte évolution ces 20 dernières années. Elles apparaissent dès lors, comme un outil essentiel en recherche épidémiologique et notamment en ce qui concerne la sarcosporidiose (More *et al.*, 2010).

La PCR est une technique d'amplification de l'ADN. Elle peut faire intervenir diverses séquences d'ADN. En 2007, Vangeel *et al.* utilisent une méthode PCR avec des amorces spécifiques du rARN 18S. L'amplification a lieu indifféremment pour les 3 espèces de *Sarcocystis* en cause, sans réaction croisée possible avec *Toxoplasma* ou *Neospora*. Le séquençage *a posteriori* permet de déterminer l'espèce en cause (Honoré, 2011). Dans notre cadre, diverses méthodes comme la RAPD-PCR qui amplifie de façon aléatoire certaines séquences, ou la PCR-RFLP qui utilise l'ADN ribosomal 18S (Xiang *et al.*, 2009) peuvent également être employées. L'amplification aboutit, dans ce dernier cas, à des séquences de longueurs différentes qui permettent de définir l'espèce impliquée après séparation des segments obtenus sur gel d'électrophorèse. Ces techniques autorisent la détection du parasite et la caractérisation de son espèce, de façon fiable et en accord avec les résultats donnés par l'analyse morphologique (Yang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2001).

En 2004, Güclü *et al.*, étudient différentes amorces qui permettent, pour certaines, d'obtenir par une méthode RAPD-PCR, un nombre de fragments différents et/ou des fragments de tailles différentes selon l'espèce de *Sarcocystis* en cause. Ces amorces permettent après amplification et migration sur gel, de connaître immédiatement la positivité de l'échantillon et l'espèce en cause (Güclü *et al.*, 2004).

La PCR, en général, présente plusieurs avantages majeurs : elle est rapide, relativement peu coûteuse, ne nécessite pas de personnel qualifié dans l'identification taxinomique. Elle permet donc d'analyser une grande quantité d'échantillons (Yang *et al.*, 2002).

Pour certaines espèces de protozoaires appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa*, des PCR multiplex ont été mises en place. C'est le cas par exemple pour *Neospora* chez la vache (Al-Qassab *et al.*, 2010), *Cryptosporidium* chez la vache (Santin et Zarlenga, 2009), et *Eimeria* chez le lapin (Yan *et al.*, 2013). Ces PCR permettent de déterminer simultanément, si le parasite est présent, et de l'identifier, après une amplification et une migration par électrophorèse. C'est sur cette méthode que se basera une partie de notre étude expérimentale. Nous nous appuyons pour cela sur la méthode mise en place en 2011 par Chiesa et son équipe (Chiesa *et al.*, 2011).

II-A-3 Traitement chez les bovins

Même si on considère à l'heure actuelle qu'il n'existe aucune thérapeutique spécifique de la sarcosporidiose bovine (Bucca *et al.*, 2011), on peut, en cas de sarcosporidiose aiguë suspectée ou avérée, utiliser les traitements anticoccidiens habituels des bovins. Selon les médicaments commercialisés, les molécules possibles sont (Euzeby, 1996) :

- l'amprolium (10 à 20 mg/kg/jour pendant 5 jours),
- l'oxytétracycline (20mg/kg/jour per os en 2 fois pendant 5 à 6 jours ou 10 mg/kg/jour en IV lente pendant 5 à 6 jours),
- l'association sulfamides-triméthoprim (72 mg/kg/jour pendant 5 jours),
- la sulfaquinoxaline (50mg/kg/jour pendant 3 jours),
- le totrazuril (10mg/kg/jour pendant 3jours) dans BAYCOX ® (DMV, 2012) par exemple,
- l'halofuginone (1,5 mg/kg/jour pendant 2 jours) par exemple dans HALOCUR®, (DMV, 2012)
- la salinomycine,
- les hydroxynaphtoquinones.

II-B Chez l'homme, hôte définitif

Le portage intestinal chez l'homme de coccidies zoonotiques est relativement fréquent, souvent compris entre 6% et 10% quelles que soient les régions du monde observées (Acha et Szyfres, 2005). En ce qui concerne la sarcosporidiose, l'homme peut être l'hôte définitif de deux espèces de *Sarcocystis*, *S. hominis* et *S. suihominis* dont l'hôte intermédiaire est le porc. Des études ont démontré que le portage intestinal pouvaient être de 10,4% chez des enfants en Pologne et jusqu'à 32% chez l'homme en France, et touchait même des individus très jeunes (enfants de 9 mois) (Euzeby, 1998; Fayer, 2004). Les données concernant les autres hôtes définitifs sont moins fournies, cependant, la symptomatologie, les méthodes diagnostiques et les principes généraux du traitement sont généralisables.

II-B-1 Symptômes

La maladie est généralement asymptomatique, mais chez des individus volontaires ayant ingéré de la viande bovine ou porcine contenant des sarcocystes, on observe un premier syndrome d'allure toxinique dès 3 à 8 heures après le repas et qui se prolonge pendant 24 à 36 heures. Ce syndrome se manifeste par des nausées, des douleurs abdominales, de la diarrhée, de l'anorexie. Et pour les volontaires ayant ingéré de la viande de porc, infestée par *S. suihominis*, des symptômes plus dramatiques avec notamment oedème, détresse respiratoire, pouls rapide. La toxine mise en cause est la sarcocystine. (Acha et Szyfres, 2005; Euzeby, 1998)

Dix à 15 jours après l'ingestion, ce qui correspond à la période où commence l'excrétion des sporocystes, un syndrome de type coccidiose est observé. Une simple entérite diarrhéique passant le plus souvent inaperçue est alors observable. (Euzeby, 1998)

En Thaïlande, des cas très graves auraient été jusqu'à une entérite nécrosante, nécessitant une résection chirurgicale. (Fayer, 2004)

Les stades de développement chez l'hôte définitif étant très peu immunogènes, la réinfestation est tout à fait possible et même fréquente (Euzeby, 1998).

II-B-2 Diagnostic

La cause de cette coccidiose chez l'homme est rarement identifiée dans la pratique. Le diagnostic de présomption est fait à partir de la symptomatologie et les commémoratifs d'ingestion de viande crue ou peu cuite. Le diagnostic de certitude peut être fait par la mise en évidence dans les selles d'ookystes ou de sporocystes ovoïdes et mesurant de 12 à 16 µm sur 8 à 12 µm, soit par examen direct, soit à l'aide de techniques d'enrichissement (Desportes-Livage et Datry, 2005).

II-B-3 Traitement

Dans la pratique, la cause précise de l'entérite observée n'étant pas déterminée et les cas peu graves, les traitements mis en place sont le plus souvent simplement symptomatiques. Cependant, on peut aussi utiliser les thérapeutiques médicales classiques des coccidioses (Euzeby, 1998). Cela dit, l'hôte définitif ne s'immunise pas et la réinfection est toujours possible.

II-C Chez les carnivores, hôtes définitifs

De la même façon que chez l'homme, les autres hôtes définitifs de *Sarcocystis* présentent rarement des symptômes visibles. Les études sont assez rares sur le sujet, quelques chiens et coyotes à qui il avait été distribué de la viande crue ont présenté des vomissements et de l'anorexie ; ces signes non spécifiques peuvent être dus au changement de régime alimentaire imposé à ces animaux (Dubey *et al.*, 1988). Le diagnostic et le traitement des carnivores hôtes définitifs sont encore plus rares que chez l'homme et peuvent utiliser les mêmes méthodes.

III- Pathogénie et immunologie

III-A Pathogénie (Euzeby, 1998)

La pathogénicité des *Sarcocystis* s'exerce chez les hôtes définitifs sous forme de coccidiose intestinale et chez les hôtes intermédiaires sous forme de sarcosporidiose musculaire.

Leur pouvoir pathogène est lié :

- d'une part, à une action phlogogène et nécrosante : elle est le fait de la synthèse de divers facteurs chimiotactiques agissant sur les leucocytes et les granulocytes, et de la synthèse de certaines cytokines élaborées par les macrophages. La nécrose est le résultat de la destruction des cellules présentes sur le site inflammatoire, conduisant à l'apparition des pétéchies et des lésions légèrement suppuratives parfois observées ;

- d'autre part, à une action toxique et antigénique. La sarcocystine est une protéine thermolabile, résistant néanmoins aux températures inférieures à 50°C, toxique et même létale si on l'injecte à des lapins. Elle est à l'origine d'une élévation du taux de somatostatine et d'une diminution du taux d'IGF-1. Elle exerce une action à la fois chez les hôtes définitifs et chez les hôtes intermédiaires. Les antigènes sarcosporidiens peuvent être classés en différentes catégories : les antigènes de surface, (polypeptides communs à différents stades de développement du parasite : les sporozoïtes, les tachyzoïtes et les bradyzoïtes) ; les antigènes cytoplasmiques (isolés à partir des tachyzoïtes) ; les antigènes issus des micronèmes. Les différents types d'antigènes conduisent à la formation d'IgG, d'IgM et d'IgE.

III-B Immunologie (Euzeby, 1998)

III-B-1 Chez les hôtes intermédiaires

Il existe, chez les hôtes intermédiaires que sont les bovins, deux types d'immunité qui se mettent en place. La première est une immunité humorale, composée d'IgG, d'IgE et d'IgM, qui s'exerce sur les tachyzoïtes, stades circulants du parasite. Il existe également une immunité cellulaire visant à détruire les kystes musculaires et à l'origine de la formation de granulomes. L'immunité cellulaire fait intervenir une infiltration lymphocytaire et macrophagique, avec cytotoxicité des lymphocytes T et phagocytose par les macrophages.

L'immunité conférée est une immunité dite de co-infection ou immunité de prémunition. Une fois mise en place, une telle immunité empêche l'apparition de symptômes de sarcosporidiose aiguë. Des bovins à qui on avait déjà fait ingérer des sporocystes, se sont vus résister à une infection, à une dose létale, de sporocystes (Tenter, 1995).

III-B-2 Chez les hôtes définitifs

Chez l'hôte définitif, les stades sexués de *Sarcocystis* spp. sont peu immunogènes contrairement aux schizontes. En conséquence, une réinfection lors de consommation de viande crue entraînera à nouveau l'apparition d'une phase d'excrétion de sporocystes dans les fèces des hôtes définitifs, sinon de signes cliniques souvent discrets (Euzéby, 1998).

IV- Lésions chez les bovins

La plupart des bovins porteurs de sarcocystes ne développent aucune lésion macroscopiquement visible. Pourtant, certains animaux atteints de sarcosporidiose développent une myosite éosinophilique (ME). Cela représenterait de 0,002% à 0,013% dans différentes régions du monde (Vangeel *et al.*, 2011) et jusqu'à 0,086% des bovins abattus en Pays de la Loire en 2011. Le schéma pathogénique conduisant à l'apparition de ce type de lésions est encore mal connu et seules des hypothèses ont été avancées le concernant.

En 1986 Jensen *et al.*, supposent que l'augmentation du nombre et de la taille des bradyzoïtes ainsi que l'accumulation des déchets métaboliques, comprenant des facteurs chimiotactiques pour les granulocytes éosinophiles, des antigènes et des cytotoxines, conduisent à l'ouverture de la paroi du sarcocyste libérant ainsi les facteurs précités.

En 1989, Granstrom remet en cause cette hypothèse. D'après lui, si c'était bien la lyse de la paroi et la libération de facteurs chimiotactiques qui étaient responsables des lésions de myosite éosinophilique, la prévalence de ME devrait être beaucoup plus importante du fait de la forte prévalence de portage de *Sarcocystis* et du fait que les sarcocystes commencent à dégénérer en 3 mois environ. D'après lui, ce serait plutôt une réponse anormale de l'hôte à la présence du parasite, de type hypersensibilité de type I, qui est à mettre en cause. Il suppose de plus qu'il pourrait y avoir une prédisposition de certaines vaches à déclencher ce type de réaction comme cela a été montré chez d'autres espèces. Il évoque d'autres facteurs prédisposants possibles tels que la dose antigénique, le parasitisme simultané par des helminthes ou une infection virale (Granstrom *et al.*, 1989).

Gajadhar en 1987 observe une ME sur une vache infectée par une espèce de *Sarcocystis* jamais observée chez le bovin. Il suppose alors que c'est cette espèce inhabituelle, du fait d'une moins bonne adaptation hôte-parasite, qui est à l'origine de la ME chez cette vache (Gajadhar *et al.*, 1987).

En revanche les lésions ont été très bien décrites sur des carcasses saisies pour ME (Jensen *et al.*, 1986) et il est possible de créer des lésions similaires par injection d'antigènes de *Sarcocystis* en intramusculaire (Vangeel *et al.*, 2011).

Macroscopiquement, on observe 2 types de lésions.

-Le premier type de lésions se caractérise par des lésions assez larges de 5 à 15 cm de diamètre, irrégulières, globuleuses, plus ou moins fermes et fibreuses (figure 6 a). Elles sont jaune pâle, plus ou moins grisâtres ou verdâtres, et présentent éventuellement des traces rouges. Leurs bordures suivent le plus souvent les aponévroses musculaires. Elles représentent environ 7,5% des carcasses observées par Jensen *et al.*

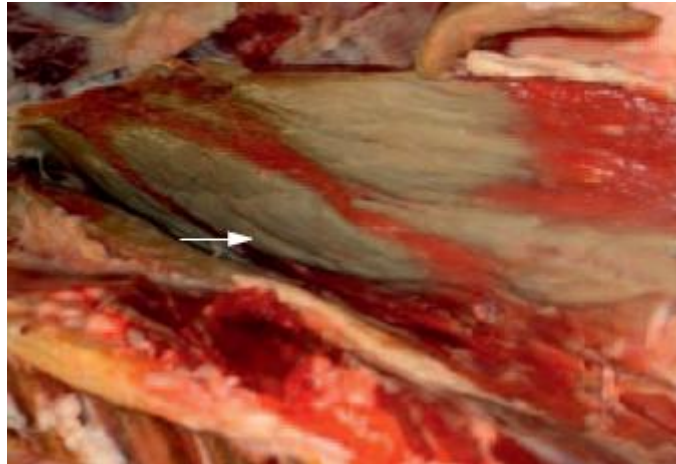


Figure 6 a : Lésions diffuses et étendues de myosite éosinophilique, observées dans un muscle de bovin (Cappelier et Honore, 2012).

-Le deuxième type décrit (voir figure 6 b), et le plus commun (92,5% d'après Jensen *et al.*), présente des lésions multifocales, fusiformes à rondes, beaucoup plus petites (0,5 à 5 mm x 0,5 à 2 mm) et discrètes. Elles sont allongées dans le sens des fibres musculaires. Leur couleur dépend de la durée d'évolution. Les plus récentes sont vertes et les plus anciennes grises, éventuellement verdâtres, surtout en périphérie. Les lésions cicatricielles sont grises à jaunâtres avec des foyers verdâtres et parfois des nodules marron énucléables, de 0,1 à 0,5 mm de diamètre. Les zones où les lésions sont coalescentes, les lésions de 1 à 4 mm de diamètre prennent un aspect ferme, et des zones verdâtres plus larges peuvent irradier le long des périmyssiium du muscle concerné, irradiant parfois jusqu'à 30 mm des lésions primaires observées.



Figure 6 b : Lésions multifocales disséminées de myosite éosinophilique, avec centre suppuré, sur une section de muscle de bovin (Wouda *et al.*, 2006).

Microscopiquement, Jensen *et al.* discernent les lésions, de type granulomateux, selon la durée d'évolution de celles-ci:

-Tout d'abord, la lésion est caractérisée par une masse nécrotique qui contient de nombreux granulocytes éosinophiles et quelques macrophages ; ces cellules sont d'ores et déjà dégradées, par pycnose ou chromatolyse.

- Au fur et à mesure du vieillissement de la lésion, le centre se dégrade de plus en plus, on observe des fragments de myocytes ayant perdu tout noyau et toute striation, et bien que la plupart des cellules restent identifiables, en dehors des zones calcifiées, la plupart des granulocytes éosinophiles sont morts ou dégranulés. En périphérie, de nouveaux granulocytes éosinophiles interviennent encerclant la paroi du granulome constituée de cellules pâles, épithélioïdes formant une palissade. A l'extérieur du granulome, formant une frontière entre celui-ci et les cellules musculaires saines, se trouvent de nombreuses cellules immunitaires telles que des lymphocytes, des granulocytes éosinophiles, mais aussi des macrophages, des mastocytes et quelques hématies, comme on peut le voir sur la figure 7.

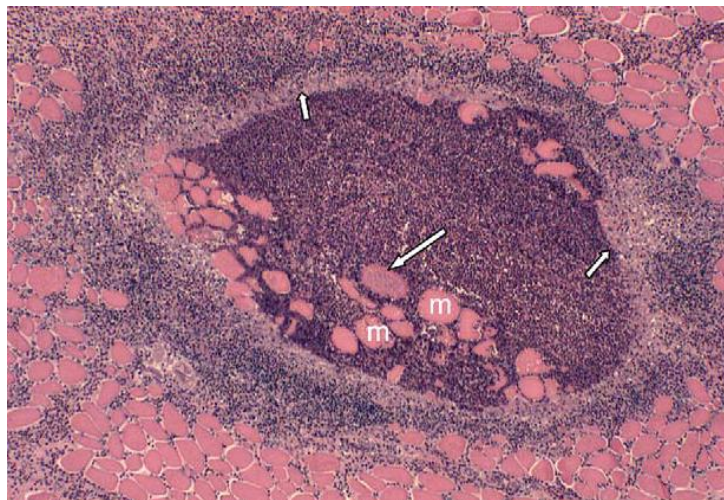


Figure 7 : Lésion microscopique de granulome éosinophilique dans un muscle de bovin. (Wouda *et al.*, 2006)

Noter la présence d'un sarcocyste (grande flèche) entouré de myocytes dégénérés (m), de granulocytes éosinophiles, de cellules épithélioïdes (petites flèches) et de fibrocytes.

-Enfin, le tissu est fortement dégénéré et modifié, le centre ne contient plus que des débris cellulaires. La paroi du granulome est formée de cellules polynucléaires géantes, de lymphocytes et de tissu fibreux. Le granulome est entouré d'un tissu fibrosé contenant quelques cellules modifiées telles que des myocytes, des lymphocytes et des granulocytes éosinophiliques dégradés. Les cellules entourant ces lésions sont également modifiées, d'autant plus qu'elles sont proches de la lésion.

Certaines carcasses présentent des noeuds lymphatiques régionaux également touchés par les transformations ; ils sont grisâtres et de taille augmentée.

Ces différentes lésions macroscopiques, étendues ou focales, conduisent à la saisie des carcasses concernées, impropres à la consommation humaine.

V- Importance de la sarcosporidiose

V-A Prévalence

La prévalence de *Sarcocystis* spp. chez les animaux de rente (herbivores) est très élevée, et ce, dans de nombreuses régions du monde, comme le montre le tableau suivant (tableau 4), qui récapitule les données de prévalence disponibles dans la littérature.

Tableau 4 : Prévalence dans diverses régions du monde de l'infection par *Sarcocystis* spp. chez des animaux de rente.

Région/Pays		Prévalence totale obtenue	Echantillonnage	Méthodes employées		Date de prélèvement	Référence
				Microscop.	Bio.moléculaire		
Europe	Belgique	94%	67 échantillons de viande bovine hachée	TEM	PCR (18S rRNA)	01-2006 à 03-2006	Vangeel <i>et al.</i> , 2007
		97%	100 bovins – 300 prélèvements (cœur, diaphragme, œsophage)	Digestion + MP		07-1987 à 11-1987	Vercruyssen <i>et al.</i> , 1989
	Italie (Sicile)	96%	50 vaches - 1100 prélèvements (22 muscles)			09-2008 à 02-2009	Bucca <i>et al.</i> , 2011
Asie	Iran	83,60%	250 chameaux	Histologie		04-2002 à 03-2005	Valinezhad <i>et al.</i> , 2008
	Vietnam	79%	502 buffles asiatiques- 2510 prélèvements (5 muscles)			01-1996 à 10-1997	Huong, 1999
		90%	30 buffles asiatiques = 208 échantillons			PCR+RFLP (18S rDNA)	10-2003 à 12-2003
	63%	101 vaches = 541 échantillons	TEM				
	Mongolie	90%	30 vaches	Ecrasement entre lames		06-1998 à 07-1999	Fukuyo <i>et al.</i> , 2002
		93,30%	30 yacks				
		100%	30 hainag*				
96,90%		777 moutons					
Japon	6,31%	317 bovins					
Océanie et continent américain	USA (import)	36,78%	87 bovins	Histologie		02-1996 à 02-1998	Ono et Ohsumi, 1999
	Australie (import)	29,49%	78 bovins				
	Australie (ouest)	52%	714 bovins (œsophage)	Digestion + MP		05-1989 à 12-1990	Savini <i>et al.</i> , 1992
	Brésil	6,25%	64 boîtes de conserve (beg)	Histologie		01-2003 à 06-2004	Ghisleni <i>et al.</i> , 2006
	Argentine	23,40%	64 boîtes de conserve (beg)				
99,7 % (379/380)		390 bovins (cœur, muscle psoas et sang)	TEM	PCR IFAT			More <i>et al.</i> , 2010

* Hainag = croisement d'une vache et d'un yack ; IFAT = indirect fluorescent antibody technique ; MP = microscopie photonique ; TEM = microscopie électronique à transmission ; PCR = polymerase chain reaction ; RFLP = restriction fragment length polymorphism, (beg) = bœuf en gelée

On observe que les prévalences sont très élevées de façon cosmopolite, notamment en Europe et en Asie. En ce qui concerne le continent américain, les données semblent moins concordantes, mais des prévalences également très élevées ont été trouvées.

Le parasite peut se rencontrer dans l'ensemble des groupes musculaires, même s'il semble avoir des sites électifs (Bucca *et al.*, 2011). Des prévalences élevées sont notamment observées dans le cœur et le diaphragme chez les bovins ce qui en fait des sites électifs à privilégier pour des analyses. Pour un site donné des variations modérées de prévalence peuvent être observées lorsque l'espèce de mammifère considérée n'est pas la même. Des espèces de *Sarcocystis* différentes pourraient donc avoir des sites électifs différents (tableau 5).

Tableau 5 : Prévalence de *Sarcocystis* spp. selon l'espèce de mammifère en jeu et le site musculaire étudié.

Référence		(Bucca <i>et al.</i> , 2011)	(Vercruyse <i>et al.</i> , 1989)	(Fukuyo <i>et al.</i> , 2002)				
Méthode		Histologie	Histologie	Digestion enzymatique + MP	Ecrasement entre lames + MP			
Espèce étudiée		bovin	bovin	bovin	bovin	mouton	yack	chameaux
Muscle étudié	cœur	74 % (37/50)	81 % (81/100)	89 % (48/54)	100 % (26/26)	94,2 % (660/701)	86,7 % (26/30)	20 % (1/5)
	diaphragme	60 % (30/50)	55 % (30/54)	75 % (40/53)	61,1 % (11/18)	93,2 % (482/517)	56,7 % (17/30)	100 % (5/5)
	langue	60 % (30/50)	-	-	90 % (27/30)	100 % (82/82)	76,7 % (23/30)	33,3 % (1/3)
	oesophage	-	67 % (67/100)	97 % (97/100)	-	-	-	80 % (4/5)
	masséter	66 % (33/50)	-	-	-	-	-	-
	autres muscles étudiés	32-52 % 18 muscles étudiés sur l'ens. de la carcasse (16 - 26/50)	-	-	-	-	-	66,70% région inter-costale

MP = microscopie photonique.

V-B Épidémiologie

Nous allons énumérer ici les raisons pour lesquelles la prévalence de ce parasite est actuellement si élevée (Dubey *et al.*, 1988). Ainsi que les raisons pour lesquelles le cycle de *Sarcocystis hominis* serait très performant, permettant une bonne transmission entre hôtes et des prévalences très élevées (Vangeel *et al.*, 2007).

- Un hôte peut être porteur de plusieurs espèces de *Sarcocystis* (Yang *et al.*, 2001). Cela a été démontré par (Jehle *et al.*, 2009) dans une étude réalisée sur 63 vaches positives pour la sarcosporidiose. On observe que le plus grand nombre (51/63) des animaux est infecté par plusieurs espèces de *Sarcocystis*. En effet, 23 d'entre eux sont porteurs des 3 espèces connues chez les bovins et 28 sont porteurs de 2 des 3 espèces connues. L'étude également menée sur 27 buffles asiatiques, également positifs pour la sarcosporidiose, montre que 22 d'entre eux sont contaminés par au moins 2 espèces de *Sarcocystis*.

- Plusieurs hôtes définitifs peuvent être impliqués dans la transmission du parasite. Par exemple, pour *Sarcocystis cruzi*, les chiens, les coyotes, les renards, les loups et les rats laveurs peuvent intervenir en tant qu'hôte définitif ce qui permet l'adaptation du cycle dans de nombreuses régions géographiques (Dubey *et al.*, 1988). De même pour *Sarcocystis hominis* qui peut parasiter l'homme mais également le babouin et le macaque rhésus (Desportes-Livage et Datry, 2005).

- La longévité des sporocystes est très grande, elle peut aller jusqu'à 1 an en milieu humide alors qu'elle est réduite à 2 ou 3 mois en milieu sec (Euzeby, 1997). Les ookystes et sporocystes peuvent, de plus, être dispersés et protégés par des animaux invertébrés intervenant de façon indirecte dans le cycle (Dubey *et al.*, 1988). Ces mécanismes permettent la contamination d'un grand nombre d'hôtes intermédiaires.

- Les sporocystes possèdent une très grande résistance à la plupart des antiseptiques quand ceux-ci sont utilisés selon les concentrations recommandées pour leur utilisation. Seul l'ammoniaque 10% est capable de tuer les sporocystes (Euzeby, 1997), limitant ainsi les possibilités d'assainissement de l'environnement des hôtes intermédiaires.

- De la même façon, les sarcocystes restent infectieux pendant plusieurs mois voire pendant toute la vie de l'hôte intermédiaire, même si beaucoup d'entre eux commencent à dégénérer 3 mois après inoculation (Desportes-Livage et Datry, 2005; Dubey *et al.*, 1988). Les formes enkystées survivent jusqu'à 15 jours après la mort de leur hôte. Elles survivent à la réfrigération et ne sont tuées que par une congélation longue ou une cuisson à cœur importante (Euzeby, 1997).

- Les ookystes et sporocystes se développent, à partir des gamètes, dans la *lamina propria* de l'intestin grêle et peuvent en être relargués pendant plusieurs semaines contrairement à ce qui est observé dans l'infestation par d'autres coccidies (Euzeby, 1997).

-Un grand nombre d'ookystes et de sporocystes peuvent être disséminés à partir d'un seul hôte définitif. Par exemple, un chien nourri avec environ 250 g de bœuf contaminé excrète 100 à 6 000 sporocystes par gramme de matière fécale. A la fin de la période d'excrétion cela peut correspondre à l'excrétion de millions de sporocystes (Dubey *et al.*, 1988).

- Chez l'hôte définitif, aucune immunité ne se met en place (Euzeby, 1998) et, de ce fait, chaque repas contaminé peut être à l'origine d'une nouvelle période d'excrétion.

- Contrairement à d'autres coccidies, *Sarcocystis* est libéré par les hôtes définitifs directement sous sa forme infectante, comme l'étude du cycle l'a montré. Il ne dépend donc pas des conditions extérieures pour son développement (Dubey *et al.*, 1988).

L'ensemble de ces caractéristiques permet donc au parasite de se développer et de conduire à bien la totalité de son cycle qui se montre particulièrement efficace.

V-C Importance économique

Le coût global de la sarcosporidiose est le fait de plusieurs types de pertes :

- Les pertes dues aux saisies totales ou partielles et la dépréciation de certaines carcasses parfois de grande valeur. Elles sont à l'origine de pertes de l'ordre de dizaines de millions de dollars par an aux Etats-Unis (Dubey *et al.*, 1988).

En France, le retrait des viandes de la consommation humaine suit les règles définies dans le règlement communautaire (CE) n°854/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004. L'ensemble des motifs permettant de déclarer une viande impropre à la consommation humaine est défini dans son annexe I, section II, chapitre V. L'alinéa h de cette partie, précise qu'une infestation parasitaire doit conduire à la saisie de la viande, tandis que l'alinéa p précise que des altérations physiopathologiques, des anomalies de consistance, ou des anomalies organoleptiques doivent également conduire au retrait de la viande (Parlement Européen et Conseil, 2004). Ce sont ces 2 alinéas qui conduisent donc au retrait des viandes contaminées par *Sarcocystis*. En 2011, 3 907 000 gros bovins ont été abattus en France, soit 1 442 000 tonnes équivalent carcasse (téc) (Département Economie de l'Institut de l'Elevage, 2013). Selon Fradin, en 2002 le taux de saisie est de l'ordre de 0,42 % du tonnage, soit 6 056 téc en France en 2011. Une part de ces saisies sont des saisies de carcasses dans leur totalité et la sarcosporidiose représenterait 2,3 % de ces saisies totales (Fradin, 2003).

D'après les chiffres produits pendant l'année 2011 par BOVILOIRE dans les abattoirs des Pays de la Loire, 585 181 bovins ont été abattus et parmi eux, 462 bovins ont été saisis en totalité pour myosite éosinophilique. En 2011, le poids moyen des carcasses de gros bovins finis était de 360 kg environ. Avec un prix moyen de 3,21 euros par kg de carcasse en 2011 (Département Economie de l'Institut de l'Elevage, 2013), le prix moyen de carcasse est donc de 1 155 euros. Ce qui représenterait 533 610 euros pour les seuls Pays de la Loire et sans prendre en compte les saisies partielles (38 animaux). La qualité des carcasses n'est pas non plus prise en compte ici, puisque nous avons utilisé un poids moyen et un prix moyen de carcasse, alors qu'*a priori* les carcasses les plus touchées sont celles de bonne conformation. On peut donc supposer que dans le cadre des saisies pour motif de sarcosporidiose le poids moyen des carcasses serait plus élevé encore et que le prix au kg serait également plus élevé. En réalité donc ce coût dépasse sans doute encore notre estimation. Aux Etats-Unis, durant les années 1982 et 1983, 4 455 bovins ont été saisis en totalité et 24 293 ont fait l'objet de saisies partielles, pour lésions de myosite éosinophilique ou de sarcosporidiose. En considérant qu'une saisie partielle équivaut à 1/4 de la carcasse saisie et qu'une carcasse a une valeur de 700 dollars, le coût total de ces saisies est de l'ordre de 7,4 millions de dollars (Fayer et Dubey, 1986).

La sarcosporidiose revêt donc un enjeu économique tout particulier dans la filière viande.

- La maladie subclinique serait à l'origine d'une diminution des performances de croissance des animaux. Il a été montré que des veaux infectés par *S. cruzi* présentaient une diminution significative du GMQ et que le poids final au moment de leur abattage était donc significativement diminué. En revanche, aucune modification de la qualité de la viande n'a pu être mise en évidence dans cette étude (Dauguschies *et al.*, 2000). Ce facteur est très difficile à évaluer au niveau économique.

- La maladie clinique serait également à l'origine de pertes économiques, mais son incidence extrêmement faible, la rareté de la suspicion clinique et l'impossibilité de faire un diagnostic de certitude à l'heure actuelle sur le terrain rend l'évaluation de ces pertes impossible.

Aux Etats-Unis à nouveau, pour l'année 1984, une estimation a été faite de 10 dollars par tête pour seulement 10% du cheptel américain, incluant à la fois les manifestations cliniques et subcliniques telles que défaut de croissance, diminution de production laitière..., ce qui conduit à une estimation de 81 millions de dollars pour la maladie subclinique (Fayer et Dubey, 1986).

- Les pertes économiques associées à la maladie intestinale chez l'homme ne sont pas évaluables du fait que le diagnostic est rarement fait, et sont probablement assez faibles du fait de la discrétion des symptômes. En effet, la maladie étant bénigne, les traitements mis en place sont non spécifiques, peu chers et de durée assez courte.

VI- Moyens de lutte

Chez l'homme, il n'existe aucun traitement spécifique de la coccidiose intestinale sarcosporidienne, qui est très rarement diagnostiquée en tant que telle (Desportes-Livage et Datry, 2005; Fayer, 2004).

Chez les bovins plusieurs traitements (voir page 40) sont possibles. Ils sont issus des traitements utilisés en cas de coccidiose intestinale chez l'animal et aucun d'entre eux n'est spécifique de la sarcosporidiose (Euzeby, 1996). La seule réelle méthode de lutte envisageable est la mise en place de mesures de prophylaxie sanitaire. En effet, c'est le portage et la dissémination des ookystes et des sporocystes par les hôtes définitifs qui permettent l'entretien du cycle dans les élevages bovins actuels (Bucca *et al.*, 2011). Par conséquent, la prophylaxie sanitaire doit viser à diminuer ce portage ou à interdire l'accès des hôtes définitifs à la zone d'élevage. L'exclusion des carnivores domestiques ou sauvages est donc à envisager dans la zone d'élevage et des bonnes pratiques d'hygiène doivent être mises en place pour éviter la contamination des aliments, de l'environnement et de l'eau par les fèces des chiens, des chats et de l'homme (Fayer, 2004).

Il apparaît clairement que le type d'alimentation fournie aux hôtes définitifs est primordial pour limiter le portage et l'excrétion des hôtes définitifs ayant accès aux zones d'élevage, et notamment de l'homme. Pour les carnivores domestiques, il faut proscrire toute consommation de viande bovine crue et préférer un aliment sec de type industriel. Pour l'homme, il faut conseiller de cuire correctement la viande ou de la congeler. En effet, les sarcocystes, éléments infectieux présents dans la viande des bovins, vont être inactivés par une cuisson à cœur de 60°C pendant 20 minutes à 70°C pendant 15 minutes ou 100°C pendant 5 minutes, ou lors d'une congélation à -4°C pendant 48 heures ou -20°C pendant 24 heures (Desportes-Livage et Datry, 2005).

Etude expérimentale

Ce travail a été effectué de mars à septembre 2013 au sein de l'unité HQA-Secalim (UMR 1014 INRA) et avec le soutien technique d'Albert Rossero, Ingénieur de Recherche INRA.

Nous avons vu dans la première partie que *Sarcocystis* semble être impliqué dans l'apparition de lésions de myosite éosinophilique. De plus, les connaissances concernant le lien entre myosite et présence du parasite sont actuellement incomplètes. Enfin, nous avons vu que s'il existe des données sur la prévalence de *Sarcocystis* dans plusieurs régions du monde, les données concernant la prévalence de chacune des trois espèces présentes chez les bovins sont assez peu fournies.

Nous avons voulu dans cette étude approfondir les connaissances concernant le lien entre myosite éosinophilique et présence de *Sarcocystis*. Nous avons voulu pour cela atteindre plusieurs objectifs :

- Etablir la prévalence de l'infection des bovins par *Sarcocystis* spp.
- Connaître les espèces incriminées chez les bovins atteints de myosite éosinophilique et chez les bovins non atteints.
- Etablir à partir de ces prévalences d'espèces parasitaires, si la présence d'une des espèces ou si l'association de deux espèces différentes étaient plus fréquemment associées à la présence de lésions.
- Montrer, le cas échéant, que les espèces parasitaires peuvent présenter des sites électifs propres à leur espèce.
- Explorer des effets liés aux animaux (race, âge, sexe...)

I-Matériels et méthodes

I-A Echantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés par le vétérinaire de BOVILOIRE sur 106 bovins abattus entre juin 2012 et juin 2013, dans les Pays de la Loire. Parmi ces bovins, 75 ont fait l'objet d'une saisie pour motif de sarcosporidiose et 31 bovins témoins ne présentaient pas de lésions.

Sur chaque animal, 3 prélèvements d'environ 200 grammes ont été effectués :

- un **prélèvement du muscle lésionnel** (L) observé à l'abattoir et ayant conduit à la saisie quelque soit le ou les muscles concernés ;
- un **prélèvement de hampe** (H), qui correspond au diaphragme ;
- un **prélèvement de myocarde** (C).

Pour les 31 animaux témoins, prélevés en atelier de découpe, le prélèvement de muscle lésionnel est remplacé par le prélèvement d'une partie du caparaçon (prélèvements également notés L). En boucherie, le caparaçon désigne une partie de la carcasse comprenant la poitrine, les côtes et les muscles abdominaux. Pour certains animaux un prélèvement pouvait manquer (le cœur dans la majorité des cas) notamment du fait des circuits différents que suivent la carcasse et les abats dont le cœur. C'est le cas notamment des bovins témoins dont les cœurs n'ont pas pu être prélevés. Malgré tout, 33 prélèvements de myocardes ont été réalisés sur des cœurs non identifiés provenant d'animaux de type allaitant et dont les carcasses n'avaient pas été saisies.

L'identification des bovins se fait comme suit :

- Si le bovin est un animal témoin, il est noté t, suivi de son numéro d'ordre. Par exemple le premier bovin témoin prélevé sera noté t1.
 - Si le bovin est un animal saisi, il est noté h lorsqu'il a été traité par PCR et par histologie, ou bien p si ses prélèvements n'ont subi que la PCR.
- On discerne ainsi le bovin h1, du bovin p1 et du bovin t1.

L'identification des prélèvements reprend cette nomenclature mais sera complété par la lettre majuscule (H, L ou C) correspondant au type de muscle prélevé. Le bovin h12 par exemple a été prélevé en 3 sites, le prélèvement de myocarde sera noté hC12, le prélèvement de diaphragme sera noté hH12 et le prélèvement de muscle lésionnel sera noté hL12.

Tableau 6 : Nombre de prélèvements par catégorie de muscles (hampe = H, lésion = L, cœur = C) en fonction de la saisie ou non de la carcasse pour motif de sarcosporidiose, et analyses pratiquées.

Animaux abattus et prélevés	Qualité de la carcasse	Analyses pratiquées	Nomenclature personnelle des animaux	Type de prélèvement			
				H	L	C	Total
	Carcasse saisie	PCR uniquement	p	28	28	25	81
		PCR + histologie	h	47	48	34	129
	Carcasse non saisie		t	31	31	33	95

P = population d'animaux saisis, traitée en PCR uniquement, h = population d'animaux saisis, traitée à la fois en PCR et en histologie, t = population d'animaux sans lésions, les témoins. Attention, les 33 cœurs témoins (tC) n'appartiennent pas aux mêmes animaux que les prélèvements témoins tH et tL.

I-B Digestion enzymatique des échantillons

Nous avons utilisé une technique mise au point dans le laboratoire d'Hygiène et Qualité des Aliments à Nantes (Honoré, 2011). Les échantillons sont mis à décongeler au réfrigérateur à 4°C la veille de leur traitement par digestion enzymatique. Le protocole détaillé est présenté dans l'annexe 1.

Pour chaque échantillon, 200 grammes sont pesés et broyés à l'aide d'un mixeur électrique ménager. Vingt grammes de cette viande hachée sont alors mélangés avec 100 mL d'une solution de digestion enzymatique. Cette solution contient de l'acide chlorhydrique, de la pepsine Merck®, de l'eau distillée et du sel. Le mélange est agité au bain-marie à 37°C pendant 30 minutes.

A l'issue de cette période de 30 minutes, le broyat obtenu est filtré à l'aide d'un filtre métallique de 400 µm. Le filtrat est mis à décanter dans une ampoule de décantation pendant 30 minutes.

Le culot de décantation est récupéré dans 5 tubes de 1,5 mL qui sont congelés à -20°C en attente des étapes suivantes.

I-C Extraction de l'ADN

Un tube de 1,5 mL pour chaque échantillon est mis à décongeler avant le début des manipulations. Nous avons utilisé pour cette étape un kit " NucleoSpin® Tissue" (Macherey-Nagel). Le protocole détaillé est présenté en annexe 2.

L'objectif de cette étape est d'extraire l'ADN présent dans l'échantillon, et notamment l'ADN de *Sarcocystis*. Les premières étapes du protocole permettent la lyse des constituants cellulaires ainsi que l'optimisation des conditions pour l'étape suivante qui consiste à fixer l'ADN sur une membrane de silice. Les étapes suivantes servent à laver la membrane de silice de tout constituant n'étant pas de

l'ADN. La dernière étape est une étape d'éluion qui permet de détacher l'ADN de la membrane de silice.

Les quelques μL finaux sont placés dans un tube eppendorf identifié et congelé à -20°C en attente de l'étape de PCR.

I-D PCR multiplex et électrophorèse

Cette étape est primordiale, elle permet l'amplification de l'ADN de *Sarcocystis* spp. et sa détection. Les 3 espèces de *Sarcocystis* présentes chez les bovins peuvent être mises en évidence en utilisant une méthode PCR multiplex mise au point par Chiesa *et al.*, 2011. Le détail du protocole est donné en annexe 3.

Tous les réactifs nécessaires à la PCR sont mélangés dans le Master mix qui contient, notamment la Taq polymérase, les nucléotides libres et les amorces spécifiques des espèces de *Sarcocystis*. Quatre amorces différentes sont utilisées : 1 amorce anti-sens commune aux 3 espèces de *Sarcocystis*, et 3 amorces sens, chacune étant spécifique d'une des 3 espèces de *Sarcocystis* (tableau 7).

Tableau 7 : Localisation des amorces et taille des amplicons obtenus, (Chiesa *et al.*, 2011).

Espèces	Position de l'amorce sens (taille)	Position de l'amorce anti-sens (taille)	Taille de l'amplicon
<i>S. hirsuta</i>	250-268 (18 pb)	342-380 (18 pb)	108 pb
<i>S. hominis</i>	165-182 (17 pb)	342-380 (18 pb)	182 pb
<i>S. cruzi</i>	50-74 (24 pb)	342-380 (18 pb)	284 pb

Vingt μL du Master mix et $5\mu\text{L}$ de chaque échantillon sont répartis dans des tubes à PCR.

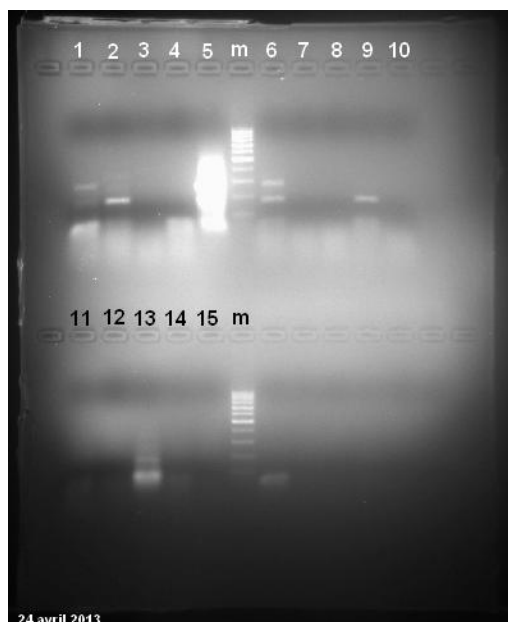
Les échantillons sont introduits dans un thermocycleur iCycler de BIORAD®. On réalise le programme suivant :

94 °C pendant 4 minutes	} 35 cycles
94 °C pendant 1 minute	
56 °C pendant 1 minute	
72 °C pendant 30 secondes	
72 °C pendant 10 minutes	
Refroidissement et maintien à 14°C	

Finalement, une électrophorèse est réalisée pour l'analyse des produits de PCR. Elle est réalisée sur un gel d'agarose 2% dans du TBE 0,5X. Dans chaque puits sont déposés $25\mu\text{L}$ de produits de PCR et $5\mu\text{L}$ de solution de dépôt. La migration a lieu à 100 Volts, 400 mA, pendant 50 minutes, dans du TBE 0,5X.

La lecture du gel d'électrophorèse se fait sous lumière UV et à l'aide du logiciel Quantity One® grâce à une caméra reliée à l'ordinateur. Les échantillons positifs présentent au moins une bande blanche entre 100 pb (paire de bases) et 300 pb. La présence d'une ou plusieurs bandes indique la présence du parasite dans l'échantillon testé. Les poids moléculaires sont repérés à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire. Les espèces du parasite sont facilement différenciées par l'observation des bandes obtenues à l'électrophorèse, chaque espèce étant à l'origine d'une bande de poids moléculaire différent et spécifique.

Un exemple de gel obtenu est donné dans la figure 8. L'ensemble des gels est visible en annexe.



24 avril 2013			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = C9	positif	11 = C13	négatif
2 = H10	positif	12 = H15	négatif
3 = H11	négatif	13 = L15	positif
4 = L11	négatif	14 = C15	négatif
5 = C11	positif	15 = t-	négatif
6 = H12	positif	m = marqueur de poids moléculaire 100 pb	
7 = L12	négatif		
8 = C12	négatif		
9 = H13	positif		
10 = L13	négatif		

Figure 8 : Exemple de gel d'électrophorèse et sa grille de lecture.

Pour vérifier le bon fonctionnement de notre PCR et l'absence de contamination technique des différents prélèvements, nous avons utilisé un témoin négatif et un témoin positif. Le témoin négatif était composé d'eau filtrée et autoclavée. Le témoin positif était au départ un échantillon ayant déjà été trouvé positif lors d'une PCR précédente. Cette méthode étant peu satisfaisante de par l'inconstance de la qualité de la bande obtenue, nous avons réalisé un clonage de la séquence d'intérêt, à partir d'un extrait d'ADN fiable, L16. Nous avons utilisé le kit de clonage de chez promega, pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Le détail de notre protocole de clonage se trouve en annexe 4.

I-E Etude histologique

Les prélèvements histologiques ont été réalisés sur les mêmes muscles que ceux ayant servis à l'exécution de la PCR. Des pièces d'environ 1 cm de côté ont été isolées à partir des muscles ayant été prélevés. Ces pièces étaient alors conservées dans du formol 10%. Deux cent vingt-quatre prélèvements ont été traités, 95 prélèvements témoins et 129 prélèvements provenant des carcasses saisies (tableau 6).

Pour le traitement par histologie, les pièces sont découpées au niveau des lésions en bloc de quelques millimètres d'épaisseur. Cette recoupe des prélèvements permet de sélectionner et d'orienter les sites à observer. Les blocs ainsi recoupés et orientés sont à nouveau laissés en fixation dans du formol pendant deux jours. Les pièces sont ensuite traitées par un automate permettant leur déshydratation complète et leur inclusion en paraffine. La section au microtome permet ensuite d'obtenir des coupes de l'ordre de 3 à 4 µm d'épaisseur, déposées sur lame. La coloration est faite à l'hématoxyline, éosine et safran. Après l'apposition d'une lamelle, la lecture a lieu à l'aide d'un microscope optique. L'analyse des échantillons a consisté en une observation au faible, moyen, et fort grossissement. Olivier Albaric du LHA s'est occupé de l'observation des lames.

Après observation histologique, sont notés, pour chaque bovin et pour chaque prélèvement, le type de réaction inflammatoire observée, la présence ou l'absence de parasites au sein et/ou à l'extérieur des lésions inflammatoires et le type de paroi observé lorsque le parasite est visible. Le nombre de kystes observés sur chaque prélèvement est également noté.

I-F Interprétation des résultats

En PCR, un prélèvement était déclaré positif pour le portage du parasite si au moins une fois, à l'électrophorèse, une bande apparaissait pour l'une ou l'autre des espèces parasites. Il était en même temps déclaré positif pour l'espèce ou les espèces identifiées à cet instant. Un bovin était donc déclaré infecté par le parasite dès lors que l'un de ses prélèvements était déclaré positif.

En histologie, un prélèvement était déclaré positif dès lors qu'au moins un kyste y était observé. Un bovin était donc déclaré infecté dès lors qu'au moins un kyste avait été observé sur l'ensemble des prélèvements issus de ce bovin.

De manière générale, un bovin était déclaré infecté si au moins un prélèvement issu de ce bovin était déclaré positif par l'une ou l'autre des méthodes employées.

Les tests statistiques employés ont été réalisés avec le logiciel Excel[®] pour les tests de khi deux et avec le site internet BioStaTGV[®] utilisant le logiciel R[®], pour les tests exacts de Fisher. Le seuil de significativité des tests a été fixé à 0,05.

I-G Etude de population

Nous avons comparé la population des animaux abattus avec la population des bovins abattus et saisis pour motif de sarcosporidiose.

-La première population, nommée P_{ab} , correspond à l'ensemble de la population des bovins abattus en Pays de la Loire, de début janvier 2012 à fin décembre 2012.

-La deuxième population, nommée P_{abs} , est une sous-population de P_{ab} . Elle correspond à l'ensemble des bovins abattus en Pays de la Loire en 2012 et ayant été saisis pour lésions de myosite éosinophilique (chaque fois que nous parlerons de bovins saisis, il s'agira de saisie pour myosite éosinophilique).

P_{ab} comporte 536 740 bovins abattus. P_{abs} comporte 400 bovins saisis (voir figure 9).

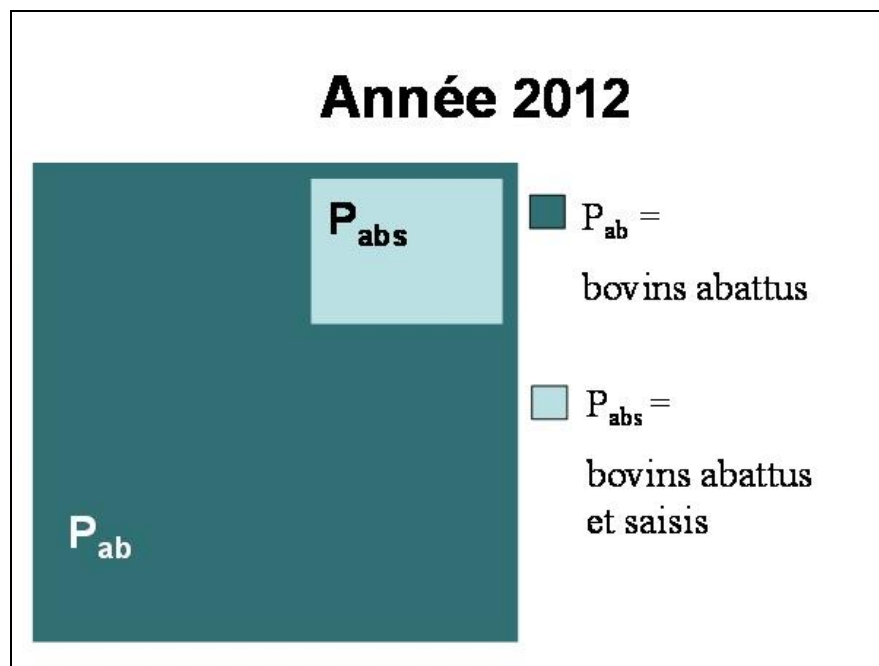


Figure 9 : Représentation des différentes populations de notre étude.

II-Résultats

II-A Etude de population

II-A-1 Caractéristiques épidémiologiques des bovins abattus et des bovins saisis pour myosite éosinophilique

- Race

La race des bovins a été renseignée pour les bovins abattus et pour les bovins saisis. Les figures 10a et 10b présentent la répartition des bovins selon leur race dans les deux populations P_{ab} et P_{abs} . Les 5 races prédominantes sont, dans l'ordre d'importance en nombre de bovins dans P_{ab} , la Prim'Holstein, la Charolaise, la Blonde d'Aquitaine, la Limousine et la Normande. Les autres races et les animaux issus de croisements sont regroupés dans une dernière catégorie.

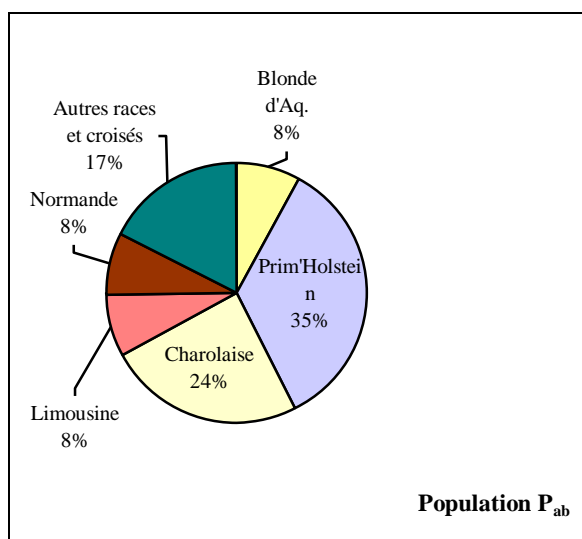


Figure 10 a : Répartition des bovins dans P_{ab} selon leur race.

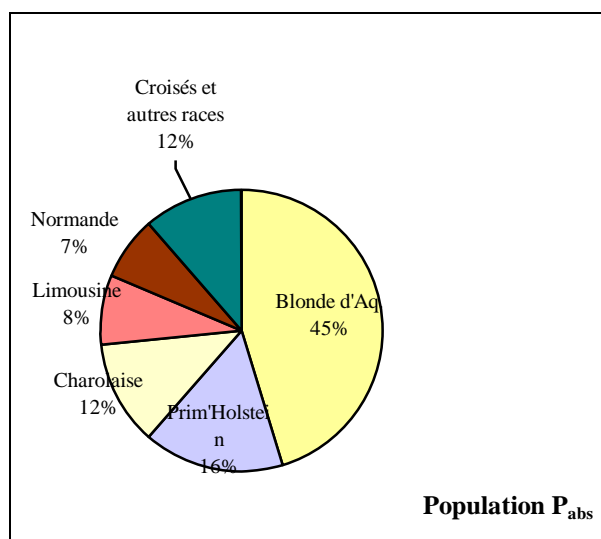


Figure 10 b : Répartition des bovins dans P_{abs} selon leur race.

Dans la population d'animaux abattus, les races Prim'Holstein et Charolaise représentent à elles seules près de 60% des animaux. En revanche dans la population des animaux dont la carcasse a été saisie pour myosite éosinophilique, elles représentent moins d'un tiers de la population. C'est la race Blonde d'Aquitaine qui est la race prédominante dans cette population avec 45% des animaux (181 individus).

Pour pouvoir comparer les races entre elles, les taux de saisie de chacune des races sont calculés. Il s'agit du nombre de bovins saisis dans chaque race divisé par le nombre de bovins de cette race, abattus sur la même période. Pour la Prim'Holstein (tableau 8a) par exemple, taux de saisie = $65/184\ 931 = 0,035\%$.

Les tableaux 8a et 8b présentent les effectifs réels et théoriques nécessaires à la réalisation du test de khi deux.

Tableau 8 a : Effectifs réels - Test de khi deux "Existe-t-il une différence significative entre races ?"

<u>Réels</u>	Prim Holstein	Charolaise	Blonde d'Aquitaine	Limousine	Normande	Parthenaise	autres races
Saisi	65	47	181	32	29	17	29
Non saisi	184931	130458	43067	42171	41994	8117	85602

Tableau 8 b : Effectifs théoriques - Test de khi deux "Existe-t-il une différence significative entre races ?"

<u>Théoriques</u>	Prim Holstein	Charolaise	Blonde d'Aquitaine	Limousine	Normande	Parthenaise	autres races
Saisi	137,87	97,26	32,23	31,45	31,32	6,06	63,82
non saisi	184858,13	130407,74	43215,77	42171,55	41991,68	8127,94	85567,18

Le taux de saisie pour motif de myosite éosinophilique et la race sont significativement corrélés (p-value de $1,58.10^{-167}$).

Les taux de saisies par race (figure 11) montrent que la Blonde d'Aquitaine ainsi que la Parthenaise ont les taux les plus importants. L'observation de ces taux et la réalisation de tests de khi deux pour chacune des races montrent que la Blonde d'Aquitaine et la Parthenaise sont significativement surreprésentées dans la population d'animaux saisis, alors que la Charolaise et la Prim'Holstein sont significativement sous-représentées.

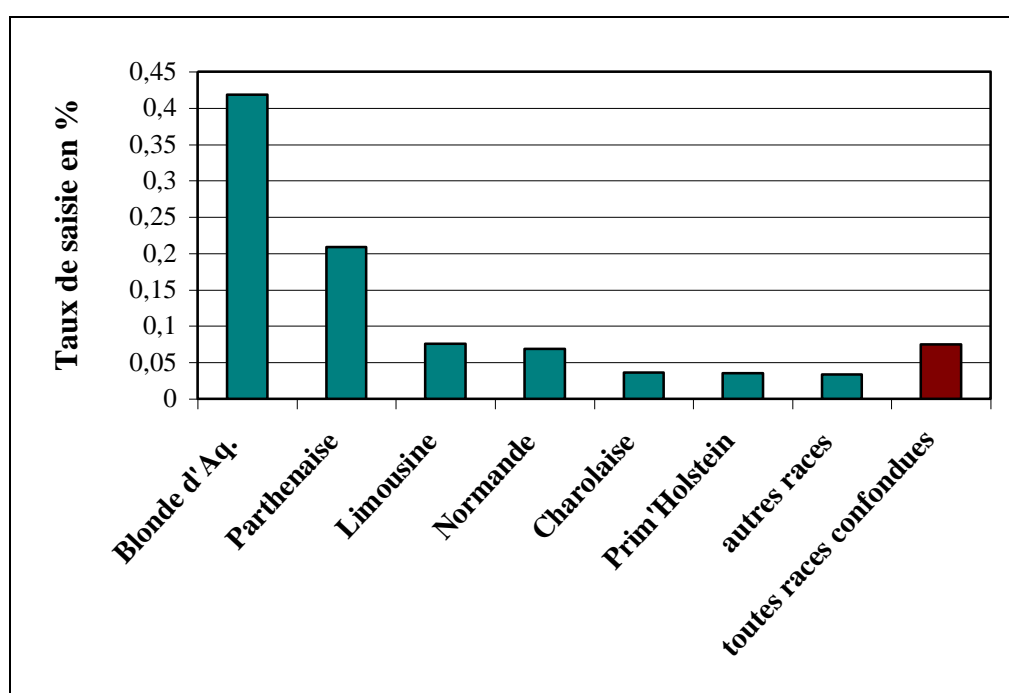


Figure 11 : Taux de saisie en fonction de la race.

La myosite éosinophilique est donc significativement plus fréquemment observée chez les bovins de races Blonde d'Aquitaine et Parthenaise.

Il est également intéressant de calculer le risque relatif (tableau 9) de saisie pour sarcosporidiose en fonction de la race.

Les odds ratio suivants (tableau 9) ont été calculés par rapport à une modalité de référence. La modalité de référence est ici "autres races", c'est la modalité qui présentait la prévalence la plus faible. Chaque odd ratio (OR) a ensuite été testé par rapport à 1, la référence. Les effectifs de P_{abs} étant faibles par rapport à ceux de P_{ab} , le risque relatif associé à une des modalités est proche de OR.

Tableau 9 : Risque relatif de saisie pour myosite éosinophilique en fonction de la race.

Races	Effectifs dans P_{ab}	Effectifs dans P_{abs}	Prévalence de saisie pour ME (%)	OR [Intervalle de confiance IC, 5%]
Autres Races	85631	29	0,3387	1,000
Prim'Holstein	184996	65	0,3514	1,037 [0,670 ; 1,607]
Charolaise	130505	47	0,3601	1,063 [0,669 ; 1,548]
Normande	42023	29	0,6901	2,038 [1,218 ; 3,237]
Limousine	42203	32	0,7582	2,239 [1,354 ; 3,701]
Parthenaise	8134	17	2,0900	6,171 [3,390 ; 11,119]
Blonde d'aquitaine	43248	181	4,1852	12,358 [8,349 ; 20,329]

La Blonde d'Aquitaine et la Parthenaise sont bien les races les plus à risques pour la myosite éosinophilique, avec un risque 12 fois plus important environ pour la Blonde d'Aquitaine et 6 fois plus important environ pour la Parthenaise, lorsque ces races sont comparées à la classe d'animaux de race non précisée. Pour les 4 autres races, le risque relatif est moins important, notamment au regard des intervalles de confiance.

- Catégories, sexe et classes d'âges

Dans P_{ab} , les vaches représentent près de deux tiers des animaux abattus, et les jeunes bovins (JB) près d'un tiers (figure 12). En revanche dans la population d'animaux saisis pour myosite éosinophilique, ces proportions ne sont pas conservées, et les femelles représentent 97 % des animaux saisis. Les vaches représentent 86 % des animaux saisis et les génisses 11 %. Les femelles, génisses et vaches, ont les taux de saisie (nombre de femelles saisies / nombre de femelles abattues) significativement les plus importants (khi deux, p value = $4,82 \cdot 10^{-47}$). Voir la figure 13.

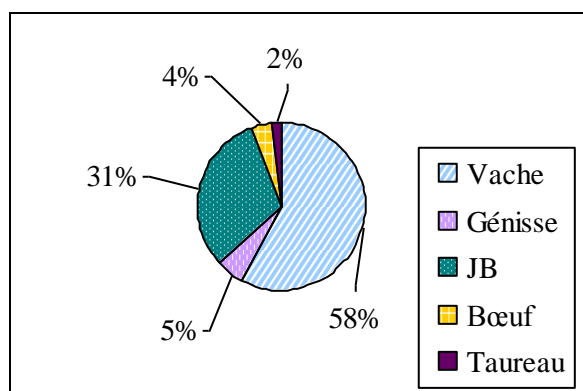


Figure 12 : Répartition des animaux selon leur catégorie dans P_{ab} .

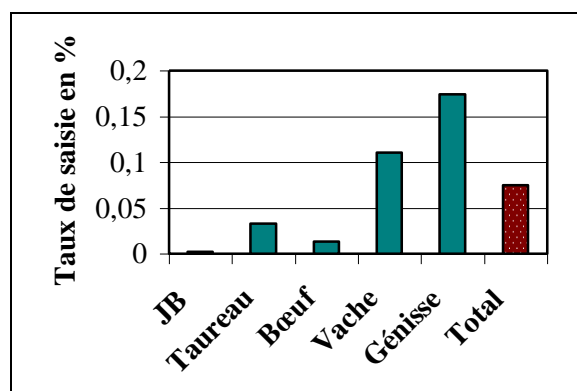


Figure 13 : Taux de saisie selon la catégorie.

Selon la race observée, la part relative de chaque catégorie zootechnique varie (figure 14), mais ces parts ne sont pas conservées dans la population des animaux saisis pour myosite éosinophilique (figure 15). Les femelles sont plus fréquemment saisies pour ce motif dans chacune des races.

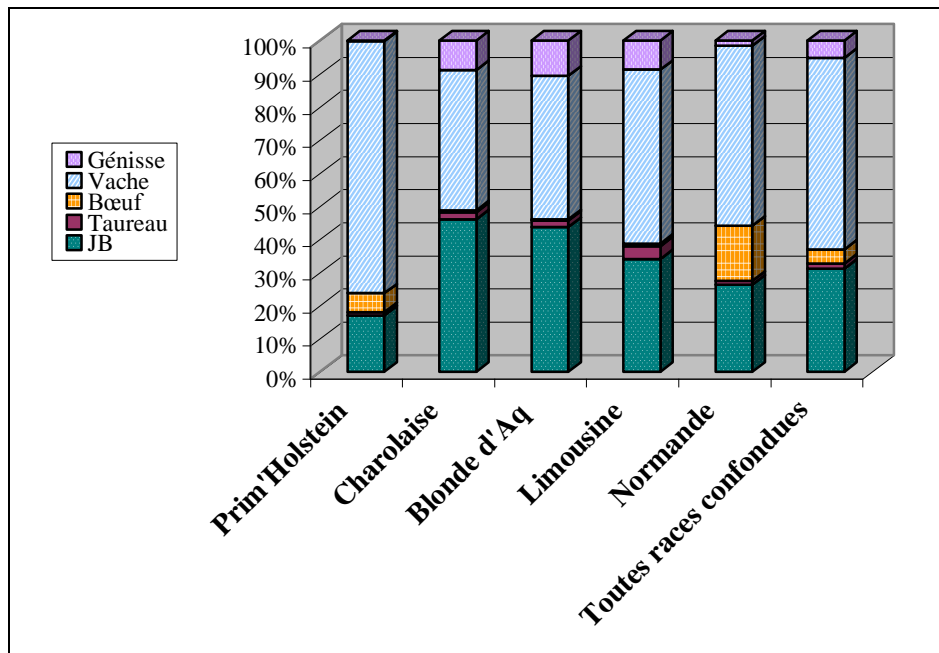


Figure 14 : Parts relatives des catégories zootechniques parmi les bovins abattus en fonction de leur race.

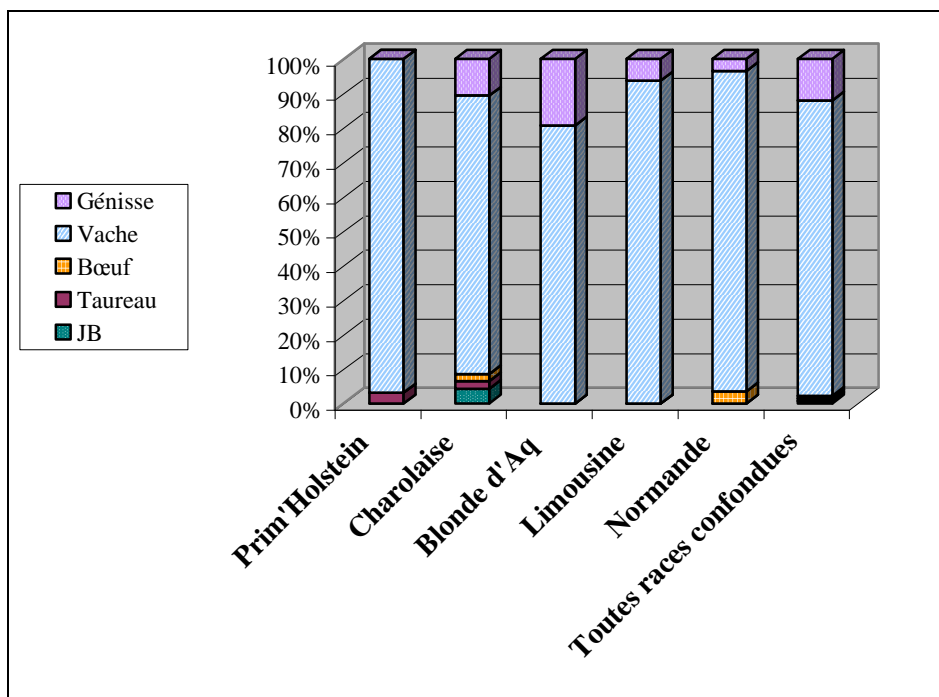


Figure 15 : Parts relatives des catégories zootechniques parmi les bovins dont la carcasse a été saisie pour myosite éosinophilique en fonction de leur race.

Le critère catégorie est dépendant des critères sexe et classe d'âge. Les femelles représentent une part majoritaire des animaux saisis et un test de khi deux permet de montrer que la différence est significative entre mâles et femelles ($p \text{ value} = 4,60.10^{-47}$). Les classes d'âge peuvent être définies de la manière suivante ; d'une part les jeunes bovins et les génisses représentent les animaux jeunes adultes, et d'autre part les taureaux, les bœufs et les vaches représentent les animaux adultes âgés. Les animaux appartenant à cette deuxième classe sont significativement ($p \text{ value} = 1,63.10^{-22}$) plus fréquemment saisis pour myosite éosinophilique que ceux de la première classe. Ceci peut être expliqué par la part très importante des vaches de réforme dans cette classe d'âge. Les critères zootechniques observés sont donc fortement corrélés les uns avec les autres.

II-A-2 Caractéristiques des carcasses saisies et non saisies

- Type de saisie

Les saisies de la carcasse dans sa totalité (saisies totales) représentent 88 % des saisies en 2012 et les saisies partielles ne concernent que 12 % des animaux dont la carcasse a été saisie. Cette répartition est retrouvée dans les différentes races et les différentes classes EUROP même si la proportion de saisies totales est légèrement plus élevée pour les races bien conformées et donc pour les classes E, U, R le plus souvent associées à ces races.

- Classement EUROP

Les carcasses des animaux abattus en 2012 sont réparties de façon relativement homogène selon les classes EUROP, en dehors de la classe E (excellente conformation) qui est largement moins représentée comme le montre la figure 16. Les classes E et U ne représentent que 22 % des carcasses de P_{ab} . Le taux de saisie des carcasses en revanche est le plus important pour les carcasses classées U (très bonne conformation) (figure 18). Cette différence du taux de saisie des carcasses classées U est significative ($p \text{ value} = 1,42.10^{-21}$). En effet, la classe U représente, 40 % des carcasses saisies. Et les classes U et R représentent ensemble 70 % de ces carcasses (figure 17).

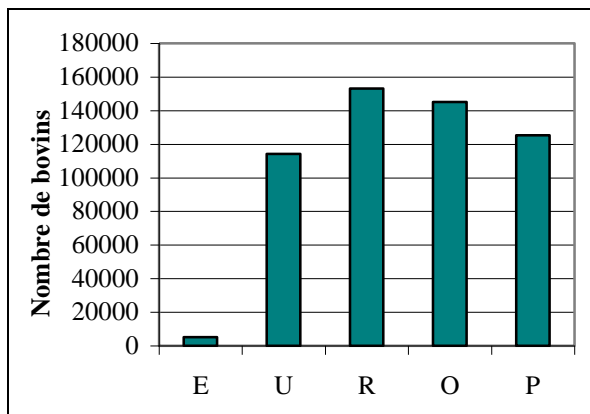


Figure 16 : Répartition des carcasses (P_{ab}) en fonction de leur conformation selon le classement EUROP.

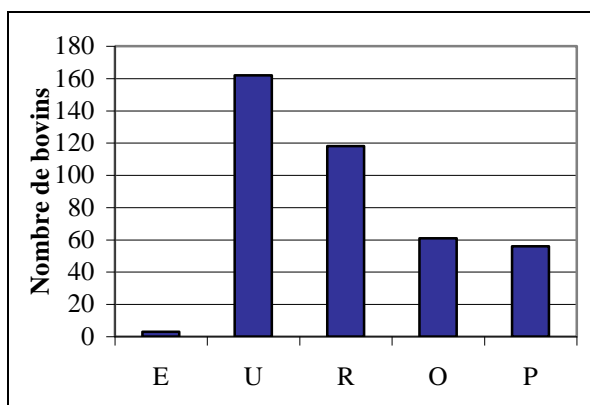


Figure 17 : Répartition des carcasses saisies en fonction de leur conformation selon le classement EUROP.

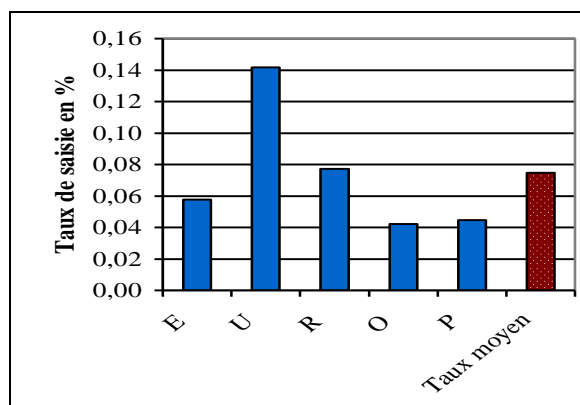


Figure 18 : Taux de saisie en fonction de la conformation des carcasses selon le classement EUROP.

Ces données montrent que les carcasses bien conformées présentent un risque plus élevé d'être saisies pour myosite éosinophilique que les autres carcasses. Ceci peut être expliqué par la forte proportion de Blonde d'Aquitaine dans les animaux saisis ; cette race étant réputée pour la très bonne conformation de ses carcasses.

- Répartition des poids de carcasses

La répartition des poids des carcasses suit approximativement une loi normale aussi bien dans la population des animaux abattus que dans la population des animaux saisis (figures 19 et 20). Cependant, la courbe est nettement plus aplatie dans la figure 20 et elle présente également un pic décalé à la catégorie 500-550 contre 400-450 dans P_{ab} . Ceci s'explique par un taux de saisie plus important dans une partie des classes extrêmes. Il est notamment le plus élevé pour les classes 150 à 200 kg, 500 à 550 kg et 550 à 600 kg, respectivement 0,56 %, 1,01 % et 0,78 % alors que le taux moyen de saisie est de 0,07 %.

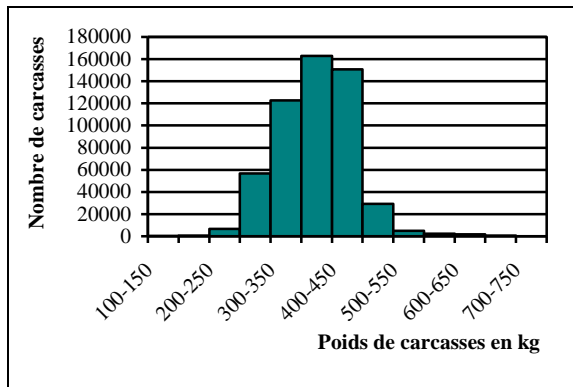


Figure 19 : Répartition des carcasses selon leur poids dans P_{ab}.

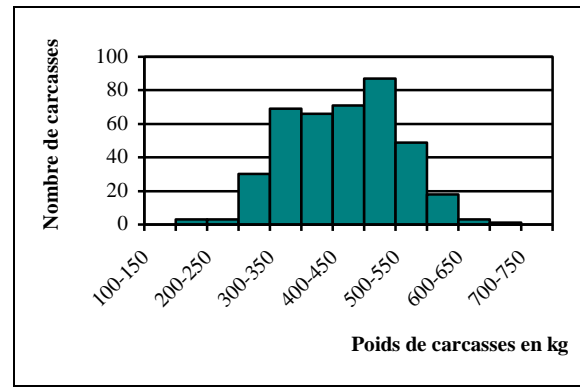


Figure 20 : Répartition des carcasses selon leur poids dans P_{abs}.

Résumé :

Au sein de cette étude, les trois critères individuels observés influant sur le taux de saisie pour myosite éosinophilique sont :

- la race ;
- le sexe ;
- la classe d'âge.

Les deux derniers critères peuvent être regroupés sous le terme de catégorie.

Les races les plus fréquemment saisies pour myosite éosinophilique sont la Blonde d'Aquitaine et la Parthenaise, les races les moins fréquemment saisies sont la Prim'Holstein et la Charolaise.

Les femelles sont plus souvent saisies que les mâles.

Les animaux âgés sont plus fréquemment saisis que les animaux jeunes.

Les carcasses concernées par les saisies sont plutôt des carcasses de bonne conformation et ayant un poids se situant dans la fourchette haute.

Les saisies sont le plus souvent totales.

II-B Résultats de l'étude des prélèvements

II-B-1 Myosite éosinophilique

- Rappels de la structure histologique des muscles observés en microscopie optique

Les types musculaires observés dans notre étude peuvent être séparés en deux types, les muscles striés squelettiques et le muscle strié cardiaque. Pour chacune de ces deux catégories, les images obtenues en coupe transversale et en coupe longitudinale sont présentées ci-dessous dans la figure 21. Les photos présentées ci-contre ont été obtenues à partir des échantillons de notre étude.

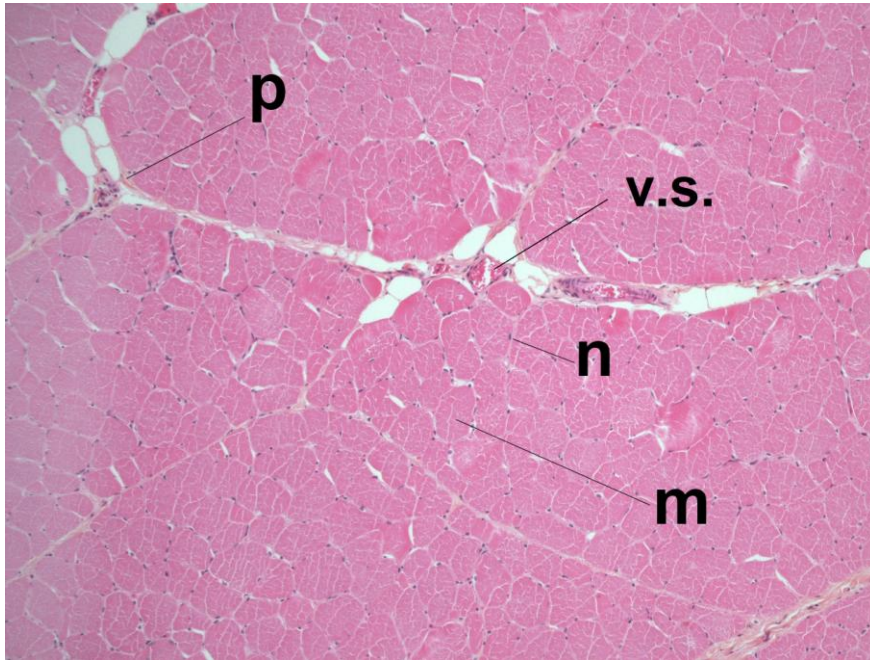


Figure 21 a : Coupe transversale de muscle strié squelettique, coloration HES, x100 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).

m : myocyte, n : noyau périphérique, p : pérymissium, v.s. : vaisseau sanguin

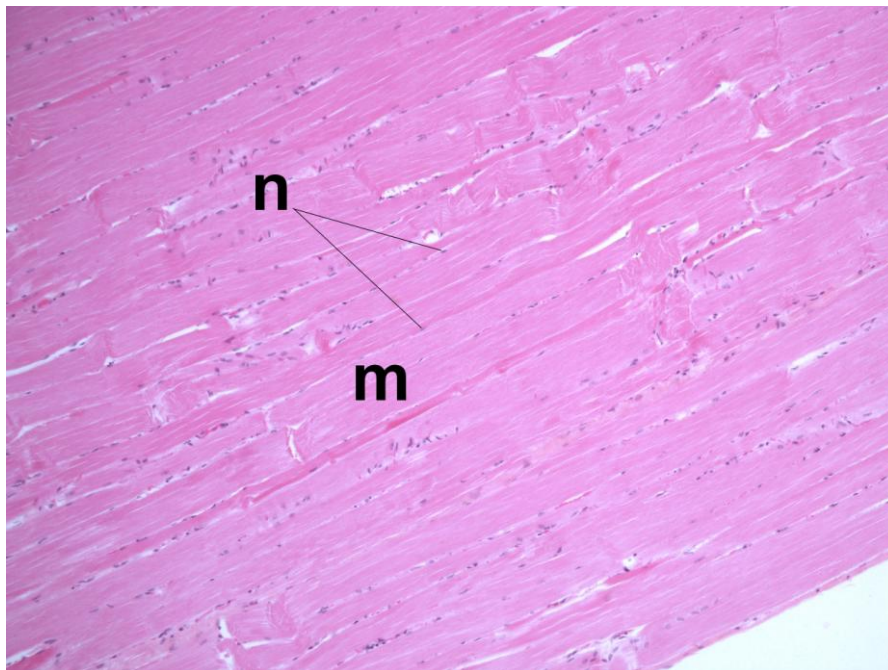


Figure 21 b : Coupe longitudinale de muscle strié squelettique, coloration HES, x200 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).

m : myocyte, n : noyaux périphériques

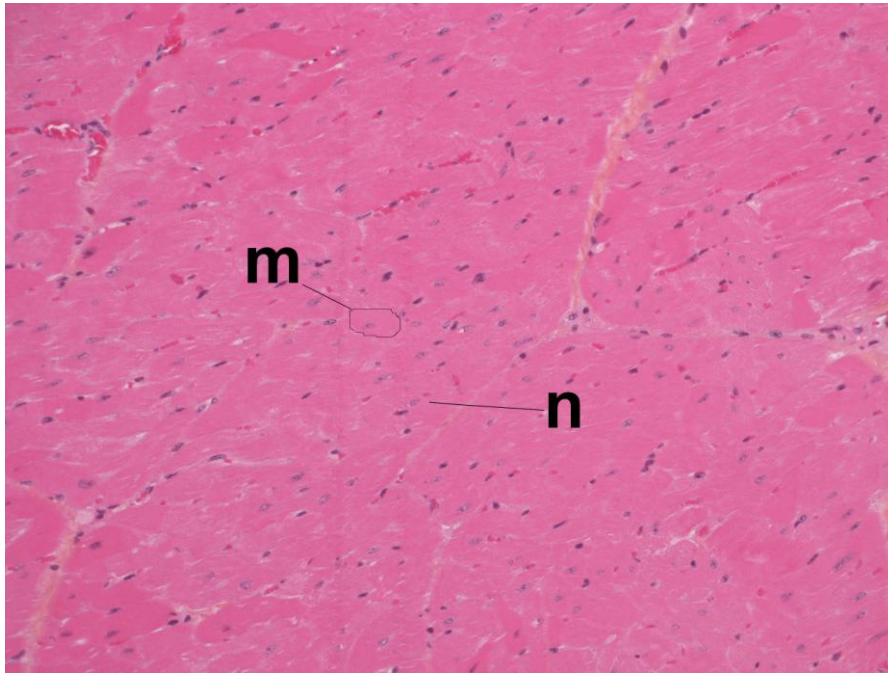


Figure 22 a : Coupe transversale de muscle strié cardiaque, coloration HES, x200 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).
m : myocyte, n : noyau central

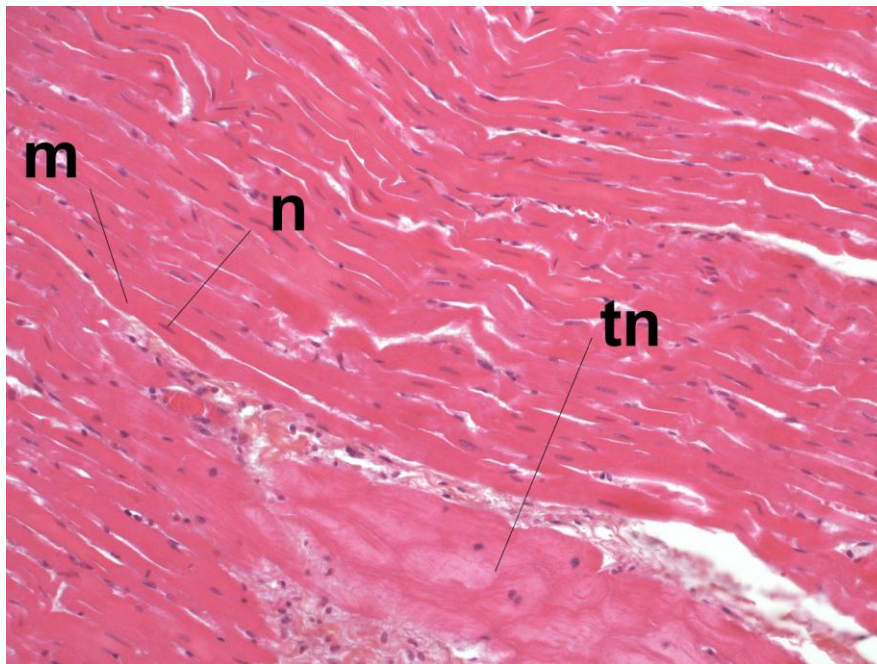


Figure 22 b : Coupe longitudinale de muscle strié cardiaque, coloration HES, x100 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).
m : myocyte, n : noyau central, tn : tissu nodal

- Lésions observées

Macroscopiquement, les lésions observées le plus souvent étaient de la forme et de la taille d'un grain de riz. Elles étaient fermes, plus ou moins bien circonscrites et de couleur jaune pâle à vert pistache. La figure 23 en est une bonne illustration (animal h9, prélèvement du caparaçon).



Figure 23 : Observation d'une lésion macroscopique sur un muscle strié squelettique de bovin (Nicolas OUDOT, BOVILOIRE, 2012).

En microscopie (voir la figure 24), la lésion présente une forme similaire. Elle est entourée à distance d'une infiltration interstitielle de cellules inflammatoires. Au centre de la lésion, des fibres musculaires nécrotiques sont entourées par un amas de débris cellulaires et de granulocytes éosinophiles dégénérés. Autour de cette zone nécrotique se trouve une importante densité de cellules inflammatoires, basophiles et acidophiles.

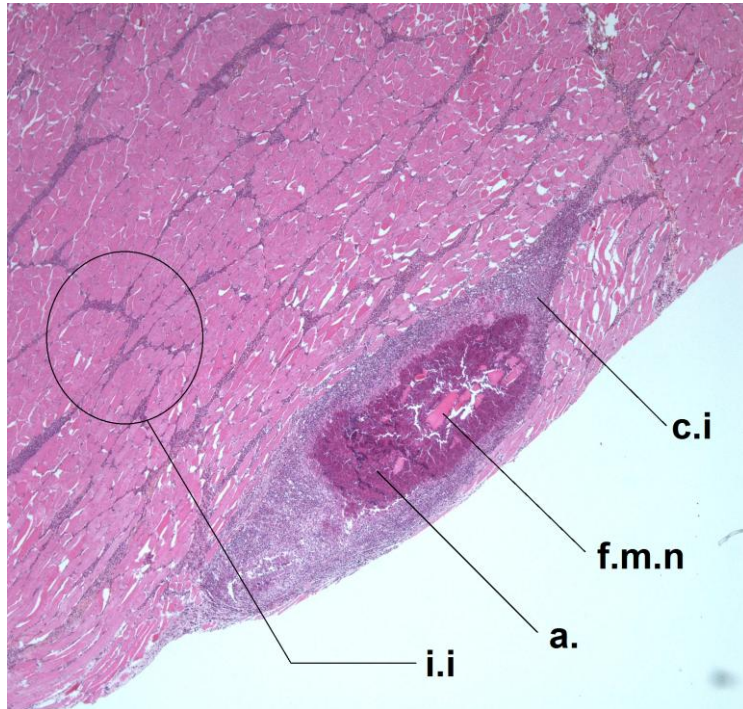


Figure 24 : Lésion microscopique. Lésion d'aspect caractéristique, en grain de riz. Coloration HES, grossissement x20 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).

i.i : infiltration interstitielle de cellules inflammatoires, a. : amas de cellules inflammatoires dégénérées, f.m.n : fibre musculaire nécrotique, caractérisée par son extrême acidophilie, c.i : cellules inflammatoires basophiles (macrophages et surtout lymphocytes) et quelques cellules éosinophiles.

Les lésions observées sont plus ou moins récentes. Les lésions aiguës (figures 25a, 25b et 25c) peuvent être différenciées de lésions plus anciennes, chroniques (figure 26).

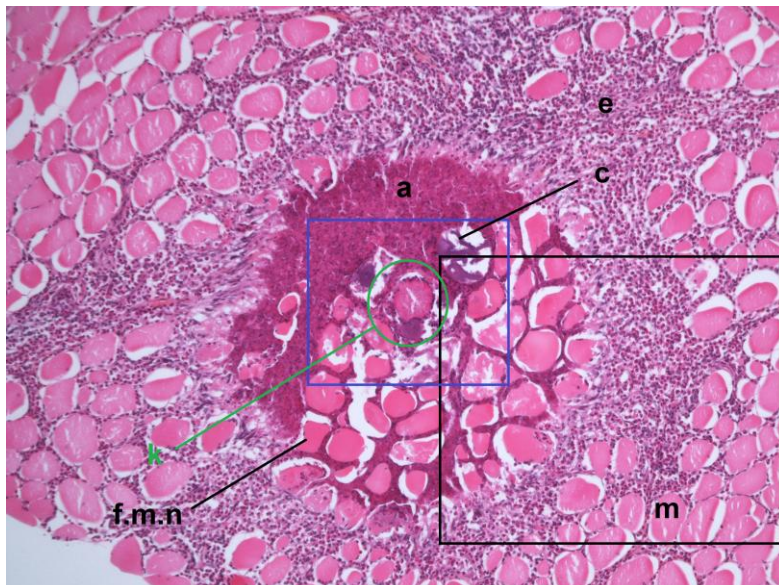


Figure 25 a : Lésion aiguë. Coloration HES, grossissement x100 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).

m : myocyte d'aspect normal, a. : amas de cellules inflammatoires dégénérées, f.m.n : fibre musculaire nécrotique, caractérisée par son extrême acidophilie, k : kyste parasitaire, e : granulocytes éosinophiles, c : fibre musculaire complètement dégénérée, nécrosée et calcifiée, cercle vert = kyste, carré noir à droite = figure 25 b, carré central, bleu = figure 25 c

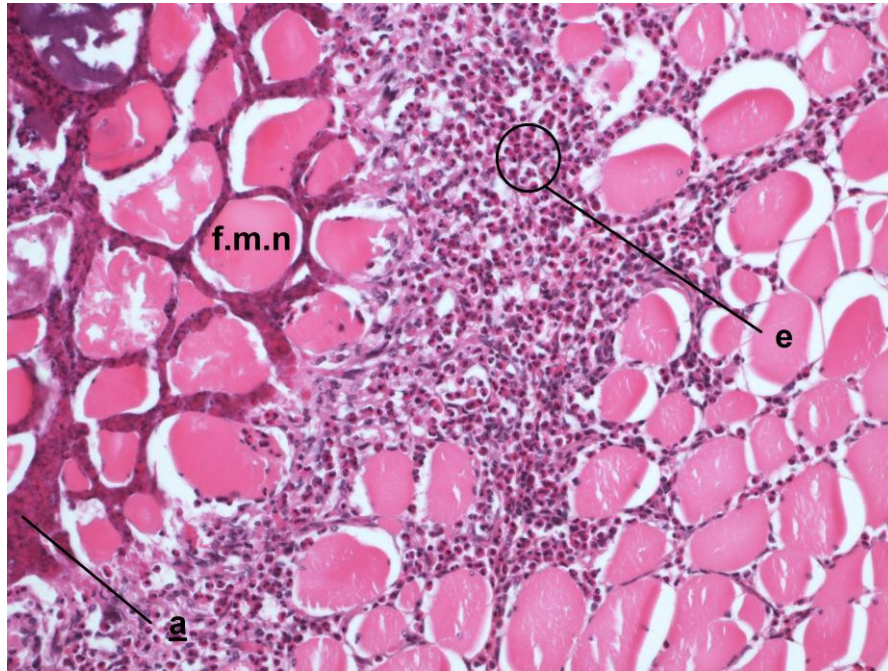


Figure 25 b : Lésion aiguë-détail. Coloration HES, grossissement x200 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).

a. : amas de cellules inflammatoires dégénérées, f.m.n : fibre musculaire nécrotique, caractérisée par son extrême acidophilie, e : granulocytes éosinophiliques

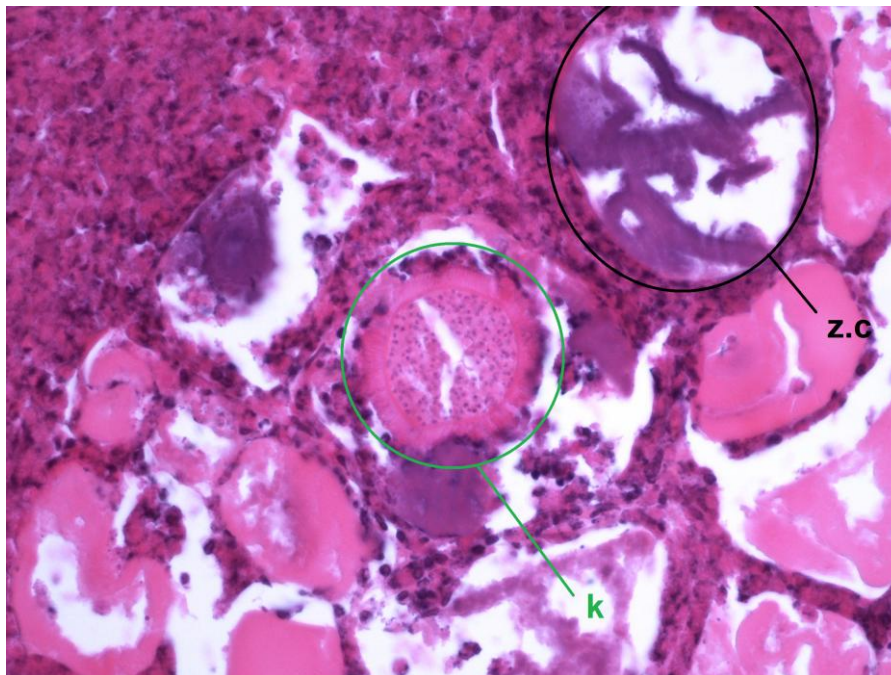


Figure 25 c : Lésion aiguë et kyste parasitaire à paroi épaisse-détail. Coloration HES, grossissement x400 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).

z.c : amas zone calcifiée et nécrosée, k : kyste à paroi épaisse, noter ici la présence des bradyzoïtes et leur taille. Noter également la présence de cellules inflammatoires au contact des villosités pariétales

Sur cette lame, le kyste est central à la lésion. Sur l'ensemble des lames observées, il est fréquent de constater la présence de kystes en dehors de toute lésion, ou à distance de lésions existantes.

La figure suivante (figure 26) présente une lésion plus ancienne. Aucun kyste n'est ici visible. Noter l'évolution des types cellulaires présents et l'évolution des fibres musculaires atteintes. La forme générale de cette lésion est assez caractéristique, rappelant celle observée en figure 24.

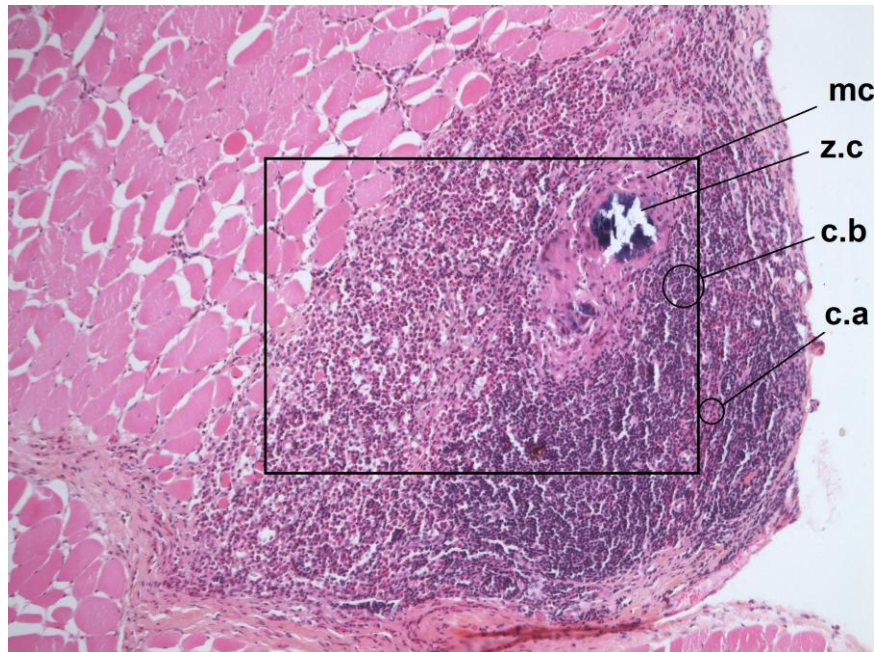


Figure 26 a : Lésion chronique. Coloration HES, grossissement x100 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).

z.c : amas zone calcifiée et nécrosée, mc : macrophages, c.b : cellules basophiles, lymphocytes, c.a : cellules acidophiles, granulocytes éosinophiles

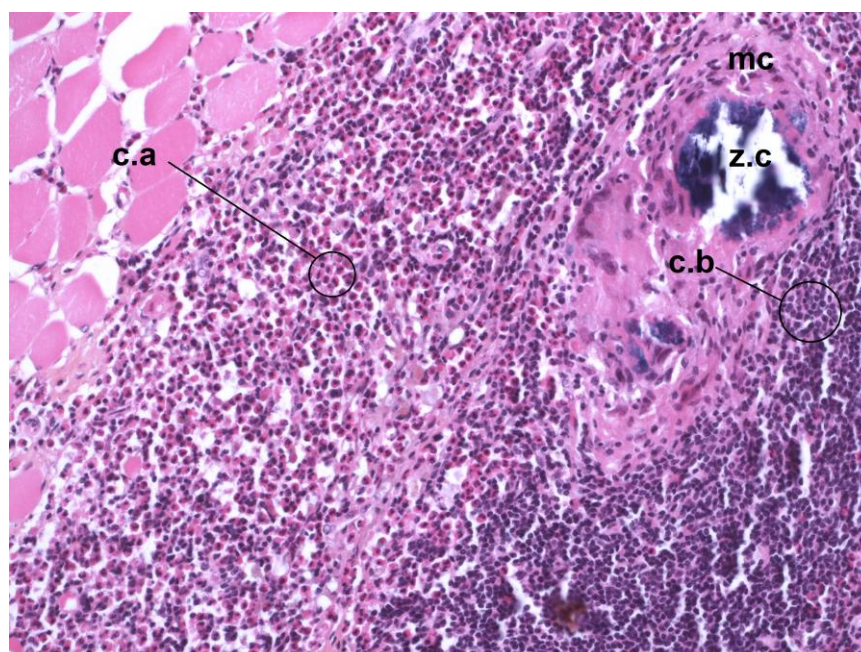


Figure 26 b : Lésion chronique-détail. Coloration HES, grossissement x200 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).

z.c : zone calcifiée et nécrosée, mc : macrophages, c.b : cellules basophiles, lymphocytes, c.a : cellules acidophiles, granulocytes éosinophiles

Ici, les cellules musculaires nécrotiques ne sont plus visibles et sont remplacées par des zones calcifiées entourées de cellules de type macrophages visant à isoler et éliminer ce corps étranger. L'amas acidophile de cellules dégénérées n'est également plus visible ici. La population de granulocytes éosinophiles représente une plus faible proportion des cellules présentes sur le site et la proportion de lymphocytes est augmentée, par rapport aux images de lésion plus récente.

Les prélèvements témoins ne présentent pas de lésions visibles macroscopiquement, même en présence de kystes parasitaires. La majorité des prélèvements ne présente pas non plus de lésions microscopiques (figures 27a et 27b). Seuls 4 prélèvements présentent une infiltration cellulaire, lymphocytaire ou éosinophilique.

II-B-2 Prévalence de la sarcosporidiose

Les résultats de l'observation de la présence ou de l'absence du parasite dans les différents types de muscles sont regroupés et synthétisés dans le tableau 10. Les bovins saisis et témoins sont séparés.

Tableau 10 : Synthèse des résultats de l'étude histologique en fonction du type de prélèvements.

		Histologie			
		Positifs	Négatifs	Total	Prévalence
Bovins saisis	H	15	32	47	31,9 %
	L	15	32	47	31,9 %
	C	11	24	35	31,4 %
Bovins témoins	H	11	20	31	35,5 %
	Caparaçon (L*)	10	18	28	35,7 %
Cœurs témoins	C	27	6	33	81,8 %

H = hampe, L = lésion, C = cœur

Remarque : 3 prélèvements L* n'ont pu être traités de façon satisfaisante. Ceci est dû au mode de prélèvement.

Les valeurs de prévalence sur échantillons, obtenues avec cette méthode, sont relativement faibles. Ceci est dû à la sensibilité de la méthode employée. Il en est de même avec les valeurs de prévalence sur individus du tableau 11.

Tableau 11 : Synthèse des résultats de prévalence obtenus par histologie au niveau des individus.

	Positifs	Négatifs	Prévalence
Bovins saisis	28	19	59,6 %
Bovins témoins	14	17	45,2 %
Cœurs témoins	27	6	81,8 %

La sensibilité peut être augmentée en multipliant le nombre de prélèvements réalisés et/ou le nombre de coupes observées. Il faut donc être prudent lors de l'interprétation des résultats du tableau 11. En effet, les bovins saisis ont eu chacun 3 prélèvements observés alors que les bovins témoins n'en ont eu que 2. Les cœurs témoins, provenant d'animaux sans lésions, n'ont eu qu'un prélèvement analysé, pourtant la valeur de prévalence observée pour ces prélèvements est très élevée.

- PCR multiplex

Les résultats de positivité des échantillons sont résumés dans le tableau 12. Ils ont été obtenus en utilisant les critères décrits dans la partie Matériel et Méthodes.

Tableau 12 a : Synthèse des résultats de l'étude par PCR en fonction du type de prélèvements, toutes analyses comprises.

		PCR			
		Positifs	Négatifs	Total	Prévalence
Bovins saisis	H	59	16	75	78,7 %
	L	57	19	76	75 %
	C	43	16	59	72,9 %
Bovins témoins	H	27	4	31	87 %
	Caparaçon (L*)	29	2	31	93,5 %
Cœurs témoins	C	29	4	33	87,9 %

H = hampe, L = lésion, C = cœur. En italique, les valeurs qui seront corrigées dans le tableau 12 b.

Les valeurs de prévalence obtenues dans l'ensemble des catégories de prélèvements sont élevées, autour de 75 à 95 %. On observe également que les prévalences sont plus faibles chez les animaux saisis que chez les animaux témoins. Ceci est à modérer fortement du fait de la difficulté à mettre en place la technique pour les premiers prélèvements traités, qui appartiennent tous au groupe des animaux saisis. Si on écarte ces animaux (testés avant le 30 avril) aux résultats douteux, on obtient le tableau 12 b. En effet, après le 30 avril le protocole d'extraction d'ADN et la Taq polymérase ont été changés pour obtenir des extraits d'ADN de meilleure qualité et des résultats plus fiables.

Tableau 12 b : Synthèse des résultats corrigés de l'étude par PCR en fonction du type de prélèvements.

		PCR			
		Positifs	Négatifs	Total	Prévalence
Bovins saisis	H	52	5	57	91,2 %
	L	51	7	58	87,9 %
	C	38	6	44	86,4 %
Bovins témoins	H	27	4	31	87 %
	Caparaçon (L*)	29	2	31	93,5 %
Cœurs témoins	C	28	4	32	87,5 %

H = hampe, L = lésion, C = cœur

On observe alors que l'écart entre les deux catégories d'animaux est beaucoup plus faible. Ces valeurs de prévalence sont plus fiables que les précédentes, même si le nombre de prélèvements inclus est légèrement plus faible. Cette prévalence est une prévalence calculée pour les prélèvements. La prévalence chez les individus est également intéressante et les données sont synthétisées dans le tableau 13.

Tableau 13 : Synthèse des résultats de prévalence obtenus par PCR au niveau des individus.

	Positifs	Négatifs	Prévalence
Bovins saisis	67 (56)	8(1)	89,3 % (98,2 %)
Bovins témoins	31	0	100 %
Cœurs témoins	29	4	87,9 %

() : Valeurs corrigées en excluant les bovins testés avant le 30 avril.

La prévalence chez les individus est très élevée, de l'ordre de 100 %, aussi bien chez les bovins présentant une myosite éosinophilique que chez les bovins jugés sains à l'inspection vétérinaire. La prévalence sur les cœurs témoins paraît artificiellement plus faible puisqu'un seul prélèvement a été traité pour cette catégorie, contre 2 chez les bovins témoins et 3 (en général) chez les bovins saisis.

Le parasite est donc présent de façon quasi systématique chez les bovins adultes de notre région d'étude et il n'existe pas de différence significative de prévalence entre la population d'animaux saisis pour myosite éosinophilique et la population d'animaux ne présentant pas de lésions.

- Comparaison des deux méthodes

Le tableau 14 permet de synthétiser l'ensemble des résultats obtenus, par bovin, avec les deux méthodes employées. Les bovins n'ayant subi qu'une PCR ne sont donc pas pris en compte ici. Ce tableau permet ensuite de comparer la sensibilité des deux méthodes.

La sensibilité de la méthode PCR est plus grande que la sensibilité de la méthode histologique au niveau individuel. Cependant, 4 bovins négatifs en PCR sont positifs à l'histologie. Trois d'entre eux n'ont eu qu'un seul prélèvement traité puisqu'ils appartiennent à la catégorie « cœurs d'animaux non saisis ». Ceci peut être expliqué par le fait que l'histologie permet de détecter des débris de kystes dans les zones très lésionnelles, et notamment les débris des parois, alors que de tels débris sont insuffisants pour permettre la détection par PCR.

Tableau 14 : Comparaison des résultats de prévalence obtenus par les deux méthodes.

	Bovin	Histologie	PCR	Positivité				
Bovins saisis (H, L, C)	h1	0	0	0	t16	0	1	1
	h2	1	1	1	t17	0	1	1
	h3	0	0	0	t18	0	1	1
	h4	0	1	1	t19	0	1	1
	h5	0	0	0	t20	0	1	1
	h6	0	1	1	t21	0	1	1
	h7	0	0	0	t22	1	1	1
	h8	0	0	0	t23	0	1	1
	h9	0	1	1	t24	1	1	1
	h10	0	1	1	t25	1	1	1
	h11	0	1	1	t26	1	1	1
	h12	1	1	1	t27	0	1	1
	h13	1	1	1	t28	1	1	1
	h14	1	1	1	t29	0	1	1
	h15	0	1	1	t30	1	1	1
	h16	1	1	1	t31	1	1	1
	h17	0	0	0	tC2	1	1	1
	h18	1	1	1	tC3	1	1	1
	h19	1	1	1	tC4	1	1	1
	h20	0	1	1	tC5	1	1	1
	h21	1	1	1	tC6	1	1	1
	h22	0	1	1	tC7	1	1	1
	h23	0	1	1	tC8	1	1	1
	h24	1	1	1	tC9	1	1	1
	h25	1	1	1	tC10	0	1	1
	h26	1	0	1	tC11	0	1	1
	h27	1	1	1	tC12	1	0	1
	h28	0	1	1	tC13	1	0	1
	h29	1	1	1	tC14	1	1	1
	h30	0	1	1	tC15	1	1	1
	h31	1	1	1	tC16	1	1	1
	h32	1	1	1	tC17	1	1	1
	h33	1	1	1	tC18	1	1	1
	h34	1	1	1	tC19	1	1	1
	h35	1	1	1	tC20	1	1	1
	h36	1	1	1	tC21	1	1	1
	h37	1	1	1	tC22	1	1	1
	h38	0	1	1	tC23	1	1	1
	h39	1	1	1	tC24	1	1	1
	h40	1	1	1	tC25	1	1	1
	h41	1	1	1	tC26	0	1	1
	h42	1	1	1	tC27	1	0	1
	h43	1	1	1	tC28	1	1	1
	h44	1	1	1	tC29	1	1	1
	h45	1	1	1	tC30	0	1	1
	h46	0	1	1	tC31	1	1	1
	h47	1	1	1	tC32	0	1	1
Bovins non saisis (H, L)	t1	1	1	1	tC33	1	1	1
	t2	1	1	1	tC34	0	0	0
	t3	1	1	1	TOTAUX	69/111	100/111	104/111
	t4	1	1	1	Cœurs d'animaux non saisis (C)			
	t5	0	1	1	t16	0	1	1
	t6	1	1	1	t17	0	1	1
	t7	0	1	1	t18	0	1	1
	t8	0	1	1	t19	0	1	1
	t9	0	1	1	t20	0	1	1
	t10	1	1	1	t21	0	1	1
	t11	0	1	1	t22	1	1	1
	t12	0	1	1	t23	0	1	1
	t13	0	1	1	t24	1	1	1
	t14	0	1	1	t25	1	1	1
	t15	1	1	1	t26	1	1	1

1 = bovin positif pour au moins un prélèvement, 0 = bovin négatif pour tous les prélèvements
 --- = bovin négatif en PCR mais positif en histologie
 h1 = résultats de PCR avant le 30 avril

II-B-3 Détermination des espèces de *Sarocystis*

II-B-3-a Espèces observées

- Histologie

Au cours de l'étude histologique, deux types de kystes ont été observés. Le premier type est à paroi mince (figure 27 a), caractéristique de *S. cruzi*. Le second type est à paroi épaisse (figure 27 b). Il est impossible de différencier *S. hominis* de *S. hirsuta* lorsqu'une paroi épaisse est observée. Les deux photos (figure 27) ne proviennent pas de notre étude. Leur qualité est excellente car la fixation a eu lieu juste après l'euthanasie des bovins. Cette fixation extrêmement rapide a l'avantage de limiter l'apparition de zones de « vide » entre les cellules. L'architecture globale et l'agencement des cellules sont ainsi mieux préservés. Dans notre étude la qualité des images était moins bonne puisqu'il pouvait s'écouler plusieurs jours entre l'abattage et la collecte.

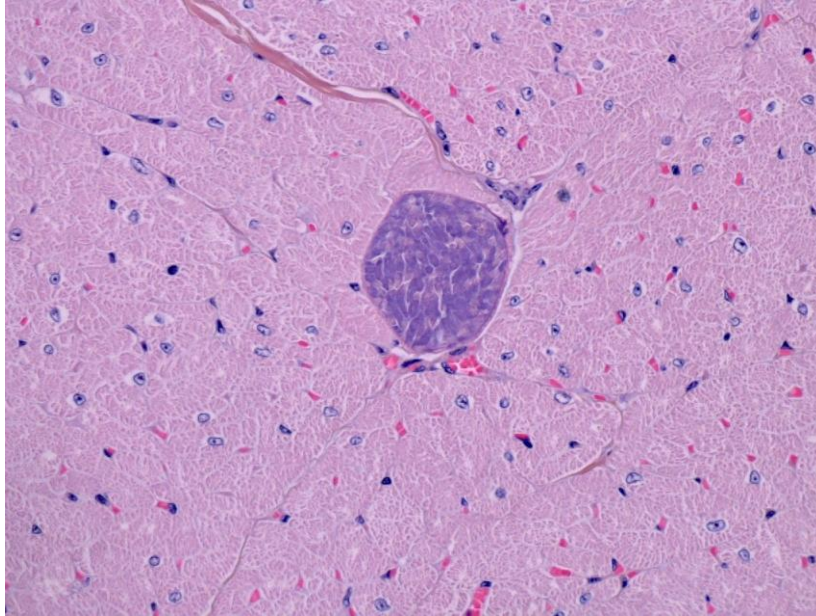


Figure 27 a : Kyste à paroi fine en bordure de myocyte. Coupe transversale de muscle. Histologie, coloration Hémalum-Eosine-Safran, x400 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).

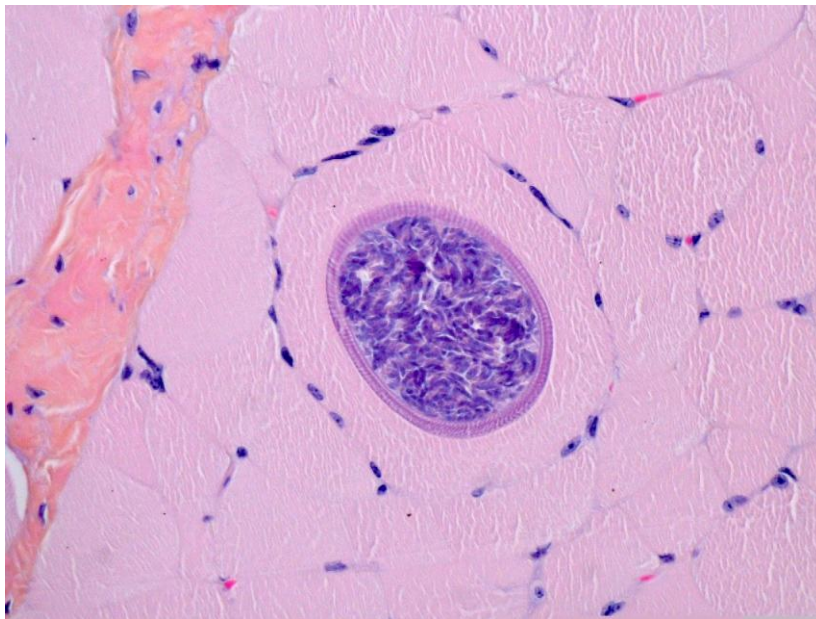
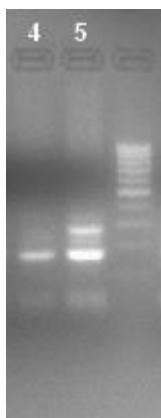


Figure 27 b : Kyste à paroi épaisse, au centre d'un myocyte. Coupe transversale de muscle. Histologie, coloration Hémalum-Eosine-Safran, x400 (Olivier ALBARIC, LHA ONIRIS).

- PCR multiplex

La PCR multiplex est un outil intéressant et performant pour déterminer les espèces de *Sarcocystis* présentes dans les prélèvements positifs. La figure 28 présente les différents types de bandes obtenues dans cette étude.



La bande 4 présente une simple bande de poids moléculaire environ 180 paires de bases (*S. hominis*). La bande 5 présente une double bande, la première également à 180 paires de bases et la seconde à environ 280 paires de bases (*S. cruzi*). La dernière colonne correspond au marqueur de poids moléculaire.

Figure 28 : Exemple de bandes obtenues de différents poids moléculaires.

II-B-3-b Données concernant les espèces

- Sites d'élection

La localisation des kystes est un point important à soulever, voir le tableau 15.

Tableau 15 : Résultats d'identification de parois par histologie, au niveau du prélèvement.

Total=		Bovins saisis pour ME				Bovins témoins			
		H	L	C	Total	H	L*	C	Total
221									
36	Épaisse	12	13	2	27	4	2	3	9
49	Fine	1	1	9	11	7	7	24	38
4	Épaisse + Fine	2	1	0	3	0	1	0	1
89	Positifs	15	15	11	41	11	10	27	48
132	Négatifs	32	32	24	88	20	18	6	44

H = hampe, L = lésion, C = cœur

Parmi les 40 prélèvements positifs sur lesquels sont observés des kystes à paroi épaisse, 35 sont des prélèvements de muscles striés et seulement 5 d'entre eux sont des prélèvements de myocards. Parmi les 27 prélèvements positifs de cœurs témoins, 24 présentent des sarcocystes à paroi fine (*S. cruzi*) et parmi les 11 cœurs saisis positifs 9 présentent également des parasites à paroi fine. *S. cruzi* se situe donc préférentiellement dans le cœur.

Les données issues de l'observation des poids moléculaires sont synthétisées dans le tableau 16. Les différents types de prélèvements ainsi que la provenance (animal saisi / animal témoin) permettent de former différentes catégories.

Tableau 16 : Résultats d'identification d'espèces dans les prélèvements par PCR multiplex.

Total= 305		Bovins saisis pour ME				Bovins témoins			
		H	L	C	Total	H	L*	C	Total
138	<i>S. hominis</i>	47	45	19	111	14	13	0	27
30	<i>S. cruzi</i>	1	2	9	12	0	0	18	18
0	<i>S. hirsuta</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
76	<i>S. hominis</i> + <i>S. cruzi</i>	11	10	15	36	13	16	11	40
244	Positifs	59	57	43	159	27	29	29	85
61	Négatifs	16	19	16	51	4	2	4	10

H = hampe, L = lésion, C = cœur

Parmi les animaux saisis, *S. cruzi* est identifié seul, dans 12 prélèvements. Parmi ces prélèvements, 9 sont des prélèvements de cœur. *S. cruzi* est également présent dans 18 prélèvements chez les témoins et tous sont des échantillons de cœur. A l'inverse, *S. hominis* est identifié essentiellement dans les muscles striés squelettiques. Chez les animaux témoins, les 27 prélèvements positifs pour cette espèce sont des muscles striés squelettiques, et parmi 111 prélèvements porteurs de *S. hominis* chez les animaux saisis, 92 sont des échantillons H ou L.

Les différentes espèces présentent donc des sites d'élection différents. *S. cruzi* se trouve préférentiellement dans le myocarde et *S. hominis* est le plus souvent détecté dans les prélèvements de muscles striés squelettiques, plus rarement dans le cœur. Cependant, les infections doubles sont relativement fréquentes et les prélèvements doublement positifs sont indifféremment des muscles striés squelettiques ou des muscles cardiaques.

Il faut également noter que la hampe, réputée pour être un site privilégié d'infection, n'est ici pas significativement plus représentée que les autres types de muscles.

- Implication des espèces dans l'observation de lésions de myosite éosinophilique

Le tableau 15 présente une synthèse de l'observation histologique des prélèvements. Il indique le type de paroi observé chez les bovins saisis et chez les bovins témoins, dans tous les prélèvements pour lesquels le parasite a pu être observé.

Tableau 17 : Résultats d'identification d'espèces par histologie, en nombre de prélèvements, extrait du tableau 15.

	Animaux saisis		Animaux témoins	
	Nombre de prélèvements	%	Nombre de prélèvements	%
Paroi épaisse	27	65,9 %	9	18,8 %
Paroi fine	11	26,8 %	38	79,2 %
Paroi fine et paroi épaisse sur le même prélèvement	3	7,3 %	1	2,0 %

Trente des 41 prélèvements issus de bovins saisis et positifs en histologie présentent des kystes à paroi épaisse, alors que parmi les prélèvements issus de bovins témoins seuls 10 des 48 prélèvements positifs présentent des kystes à paroi épaisse. En revanche, 39 d'entre eux présentent des kystes à paroi fine. La proportion de prélèvements positifs pour *S. hominis* est significativement (test exact de Fisher, p-value = $3,62 \cdot 10^{-6}$) plus importante chez les animaux dont la carcasse a été saisie pour myosite éosinophilique. En revanche, la proportion de prélèvements positifs pour *S. cruzi* est significativement

plus importante chez les animaux témoins. *S. hominis* semble donc positivement corrélé à l'observation de myosite éosinophilique alors que *S. cruzi* semble négativement corrélé à cette observation.

Tableau 18 : Résultats d'identification d'espèces par PCR multiplex, en nombre de prélèvements, extraits du tableau 16.

	Animaux saisis		Animaux témoins	
	Nombre de prélèvements	%	Nombre de prélèvements	%
<i>S. hominis</i>	111	69,8 %	27	31,8 %
<i>S. cruzi</i>	12	7,5 %	18	21,2 %
<i>S. hominis</i> + <i>S. cruzi</i>	36	22,6 %	40	47,1 %

La différence est significative aussi en PCR (p-value $6.34 \cdot 10^{-8}$, test de khi deux). Cependant il faut être très prudent dans l'utilisation de ces données car elles tiennent uniquement compte de ce que l'on trouve dans chaque prélèvement et pas de ce qui se passe dans le reste de l'organisme.

Pour étudier l'implication éventuelle des différentes espèces chez les individus dans l'apparition des lésions de myosite éosinophilique, les cœurs n'ont pas été pris en compte. En effet, les lésions macroscopiques conduisant à la saisie se situent principalement dans les muscles striés squelettiques. D'autre part, les cœurs témoins n'appartenant pas aux mêmes animaux que les muscles des animaux témoins et quelques animaux saisis n'ayant pas eu de prélèvements cardiaques, la fiabilité de notre étude sera plus grande si les cœurs ne sont pas comptabilisés dans cette partie. Cependant, le retrait des prélèvements cardiaques conduit à retirer un nombre important d'échantillons positifs à *S. cruzi*.

Les données d'histologie sont synthétisées dans le tableau 19 a. et les données de PCR se situent dans le tableau 19 b.

Tableau 19 a : Résultats d'identification d'espèces chez les bovins par histologie.

	Animaux saisis		Animaux témoins	
	Nombre de bovins	%	Nombre de bovins	%
Paroi épaisse	19	40,4 %	1	3,2 %
Paroi fine	2	4,3 %	9	29 %
Parois épaisse et fine	3	6,4 %	4	12,9 %
Négatifs	23	48,9 %	17	54,8 %

Tableau 19 b : Résultats d'identification d'espèces chez les bovins par PCR multiplex.

	Animaux saisis		Animaux témoins	
	Nombre de bovins	%	Nombre de bovins	%
<i>S. hominis</i>	45	60 %	14	45,2 %
<i>S. cruzi</i>	1	1,3 %	0	0 %
<i>S. hominis</i> + <i>S. cruzi</i>	17	22,7 %	17	54,8 %
Négatifs	12	16 %	0	0 %

NB : Aux vues de la prévalence de *S. cruzi* dans les cœurs témoins, il faut envisager très fortement que les bovins témoins, pour lesquels *S. hominis* a été détecté dans les muscles striés squelettiques, soient en grande majorité également porteurs de *S. cruzi* dans le cœur, ce qui n'est pas visible ici.

La différence entre les animaux saisis et les animaux témoins est significative [test exact de fisher, BiostaTGV[®] (Huet *et al.*, 2011) ; p-value 18a = $5,55 \cdot 10^{-5}$, p-value 18b = $1,66 \cdot 10^{-3}$]. Ces résultats

devraient être confirmés à plus large échelle pour plus de fiabilité. *S. hominis* est significativement plus fréquemment observé chez les animaux saisis pour myosite éosinophilique. Cette espèce est positivement corrélée à l'observation d'une myosite éosinophilique.

S. hominis serait donc peut être à l'origine, au moins partiellement, de la déclaration, des myosites éosinophiliques. On peut supposer qu'à l'inverse *S. cruzi* serait moins souvent à l'origine de celles-ci, et les arguments pour une telle hypothèse sont les suivants :

- il est présent en grande densité dans le cœur de bovins n'ayant pas déclenché de lésions ;
- il est plus fréquemment mis en évidence dans le cœur que dans les autres muscles striés ;
- dans les muscles striés squelettiques, il est fréquemment retrouvé en association avec *S. hominis* ;
- il est décrit dans la littérature comme étant le plus pathogène vis-à-vis des formes aiguës ou subaiguës de la maladie.

- Nombre d'espèces impliquées chez les bovins

Il est intéressant de voir par ailleurs si ce sont les bovins doublement infectés, y compris sur 2 prélèvements différents qui déclenchent une myosite éosinophilique. Les résultats par bovin sont donnés dans le tableau 20 suivant.

Tableau 20 : Nombre d'espèces identifiées chez les individus, dans le même prélèvement ou dans des prélèvements différents, PCR multiplex et histologie confondues.

		Aucune espèce identifiée, sur les prélèvements	Une seule espèce identifiée sur l'ensemble des prélèvements	Deux espèces identifiées, au moins une fois sur le même prélèvement	Deux espèces identifiées mais jamais sur le même prélèvement
Bovins saisis	h	6 bovins	19 bovins	17 bovins	5 bovins
	p	0	17 bovins	9 bovins	2 bovins
Bovins témoins	t	0	9 bovins	18 bovins	4 bovins
Total		6 bovins	45 bovins	44 bovins	11 bovins

P = population d'animaux saisis, traitée en PCR seule, h = population d'animaux saisis, traitée à la fois en PCR et en histologie, t = population d'animaux non saisis, les témoins.

Pour un bovin chez lequel 2 espèces de *Sarcocystis* spp. ont été identifiées, il est fréquent de mettre en évidence ces 2 espèces sur le même prélèvement. Plus rarement, les 2 espèces sont identifiées uniquement sur des prélèvements différents. Parmi les animaux témoins 71 % présentent une double infection contre 44 % parmi les bovins saisis.

L'hypothèse selon laquelle il serait nécessaire d'avoir une infection par les 2 parasites simultanément pour développer une myosite éosinophilique peut être rejetée désormais. En effet, de nombreux prélèvements et de nombreux bovins ayant été saisis présentent une seule espèce de *Sarcocystis*. Parmi les bovins témoins, nombreux sont ceux qui sont porteurs de 2 espèces et chez qui aucune myosite éosinophilique n'a été détectée.

II-B-3-c Observation par élevage

Au cours de notre étude, les numéros d'élevage de naissance ainsi que du dernier élevage détenteur ont pu être tracés, pour la grande majorité des bovins intégrés à notre étude. Certains élevages ont vu ainsi plusieurs de leurs carcasses saisies sur la période d'étude. Pour d'autres élevages, un bovin témoin a pu également être intégré. Ces données permettent de voir si les espèces trouvées chez les différents bovins dépendent bien de l'exposition à laquelle les bovins ont été soumis et si des différences ou des similitudes sont remarquables chez les bovins issus des mêmes élevages.

Ainsi, 16 élevages sont concernés, soit 36 bovins. Parmi eux, 15 élevages (34 bovins) sont les élevages derniers détenteurs. Le dernier est élevage naisseur, pour lequel les 2 bovins ont ensuite été élevés dans 2 exploitations différentes.

Les élevages derniers détenteurs des bovins peuvent être séparés en 2 grandes catégories :

- la première correspond aux élevages pour lesquels tous les bovins entrés dans notre étude présentent les mêmes espèces. Ceci concerne 6 élevages : pour 3 d'entre eux, tous les bovins ont été saisis (6 bovins) et seul *S. hominis* est détecté ; dans les 3 autres élevages, les 9 bovins (dont 2 témoins) sont porteurs de *S. cruzi* et de *S. hominis* ;
- la seconde correspond aux élevages (9 élevages) pour lesquels les bovins (2 bovins pour chaque élevage) ne sont pas porteurs des mêmes espèces de *Sarcocystis* spp. Aucun de ces bovins n'est porteur de *S. cruzi* seul ; c'est-à-dire que, pour chaque paire, un des bovins est porteur de *S. hominis* et l'autre de *S. cruzi* et de *S. hominis*.

Le 16ème élevage est l'élevage naisseur (2 bovins), son profil est identique à celui décrit en second ci-dessus.

Pour 2 des élevages présentant le second profil, un animal saisi et un animal témoin ont été intégrés à l'étude. Dans les deux cas, l'animal saisi est porteur uniquement de *S. hominis*, alors que l'animal témoin est porteur à la fois de *S. cruzi* et de *S. hominis*.

Il est envisageable que *S. cruzi*, lorsqu'il infecte le bovin avant *S. hominis*, ait une action sur le système immunitaire qui conduise à diminuer l'expression éosinophilique de l'inflammation dans les muscles striés squelettiques lors de l'infection par *S. hominis*.

Résumé :

- La prévalence de l'infection par *Sarcocystis* spp. est proche de 100 % chez les bovins de notre étude.
- Il n'est pas nécessaire d'avoir une infection par deux espèces de *Sarcocystis* spp. pour observer une myosite éosinophilique.
- *S. hirsuta* n'a jamais été observé dans les prélèvements de notre étude.
- *S. hominis* est significativement plus souvent observé dans la population d'animaux dont la carcasse a été saisie pour myosite éosinophilique, il a pour site électif les muscles striés squelettiques.
- *S. cruzi* est significativement plus représenté dans la population d'animaux témoins, et a pour site électif le myocarde.

III-Discussion

III-A Technique d'analyse des échantillons

Notre protocole global d'analyse par PCR est complexe et les nombreuses étapes de l'ensemble rendent aussi nombreuses les possibilités d'erreurs et d'amélioration.

- **Digestion enzymatique**

Le protocole de digestion enzymatique est un protocole essentiellement manuel, long à réaliser, nécessitant du matériel et de l'espace. Répéter ces étapes sur des prélèvements n'étant pas inclus dans l'étude permet d'atteindre une excellente répétabilité et un rendement relativement important : de 6 prélèvements par jour pour les premières utilisations jusqu'à 16 prélèvements par jour. Ce protocole de digestion enzymatique largement utilisé dans la littérature scientifique (Savini *et al.*, 1992; Vercruyse *et al.*, 1989) est finalement facile à réaliser et peu d'améliorations significatives sont possibles à son niveau.

- **Extraction d'ADN**

Le protocole d'extraction est relativement facile à mettre en place, cependant, il reste délicat d'obtenir des extraits de qualité constante et dont les concentrations en ADN sont peu variables entre échantillons. Pour vérifier la concentration en ADN des échantillons nous avons utilisé le Nanodrop 2000® sur une grande partie de nos extraits ayant été utilisés pour les PCR. L'observation de ces concentrations nous a permis de conclure que notre premier protocole d'extraction n'était pas entièrement satisfaisant. En effet, les concentrations étaient très variables d'un extrait à l'autre. Cela était notamment le cas pour les extraits issus de prélèvements de cœur. En effet, les digestats obtenus à partir de muscle cardiaque étaient très riches en débris cellulaires et ceux-ci rendaient difficiles l'utilisation des membranes de silice, augmentant ainsi les temps de centrifugation. Or il est important de pouvoir enchaîner les différentes étapes du protocole d'extraction, sinon celle-ci perd en qualité. La qualité de cette étape et des extraits obtenus est primordiale car elle influence indirectement la qualité des gels d'électrophorèse. La figure 8 est une très bonne illustration du phénomène, l'échantillon numéroté 5 est peu lisible, la bande surbrillante est trop longue et trop épaisse, on distingue très mal les 2 bandes d'intérêt. En effet, cet échantillon provient d'une pièce de cœur et a subi notre protocole initial. Nous avons donc allongé le protocole en ajoutant une prélyse réalisée à l'aide d'une protéinase K. Pour cette nouvelle étape, peu importait le temps d'exposition de l'échantillon à l'enzyme, de 1 heure à 15 heures de contact, la qualité de l'extraction était ensuite satisfaisante.

La congélation préalable des extraits d'ADN avant la PCR est également un facteur de dégradation de la qualité des échantillons. L'idéal est donc de pouvoir réaliser l'étape de PCR à la suite de l'étape d'extraction.

- Polymérisation

En ce qui concerne la polymérisation, notre principale difficulté a été de trouver une Taq polymérase qui parvienne à réaliser cette étape malgré des extraits d'ADN dans lesquels la proportion d'ADN cible est faible par rapport à la quantité d'ADN musculaire bovin. Cette quantité d'ADN crée un encombrement stérique important et la première Taq que nous avons utilisée conduisait, à partir d'un même extrait d'ADN, à des résultats parfois différents, ce qui nous obligeait à tester plusieurs fois certains échantillons. Nous avons finalement utilisé l'enzyme EUROBIOTAQ® ADN polymérase et les résultats obtenus par la suite ont été cohérents et répétables.

Les amorces ont été designées et fournies par une équipe de chercheurs européens (Chiesa *et al.*, 2011). Elles sont spécifiques de l'ADN des espèces parasitaires recherchées. Néanmoins, lors de nos PCR et de nos migrations sur gel, nous avons pu observer l'apparition de bandes de taille intermédiaire. Par exemple le gel (2) du mercredi 24 juillet disponible en annexe 5 montre :

- en bande 5, les 2 bandes d'intérêt à environ 180 et 280 paires de bases ;
- en bandes 3 et 4, uniquement la bande d'intérêt de 180 paires de bases ;
- en bande 6, les 2 bandes d'intérêt + 2 bandes "parasites" l'une autour de 200 paires de base et l'autre autour de 320 paires de bases ;
- en bande 2, la bande parasite autour de 200 paires de bases est aussi nette que la bande d'intérêt à 180 paires de bases.

Il aurait été intéressant de séquencer ces amplifiats. Leur apparition peut être due à un mésappariement menant à la production de séquences de taille anormale. Elle peut également être le résultat d'une réaction croisée avec un autre protozoaire parasite des viandes bovines, *Toxoplasma* spp. par exemple.

- Prévalence par PCR, sensibilité de la méthode

Les valeurs de prévalence obtenues dans notre étude montrent que la PCR est une méthode sensible. En effet, pour les prélèvements de cœurs, nous avons obtenu une valeur de prévalence de 86,4 % chez les bovins saisis, et de 87,5 % chez les témoins. Or Bucca *et al.* en 2011, par histologie, déterminent des prévalences de 74 %, Vercruyse *et al.* en 1989 publient des valeurs de 89 % et 91 % selon la méthode employée et enfin, Fukuyo *et al.* en 2002, déterminent une prévalence de 90 % chez des bovins par microscopie photonique. Au niveau des individus, dans notre étude, la prévalence obtenue par PCR multiplex atteint 100 % chez les bovins témoins et 98,2 % chez les animaux saisis et ces valeurs sont cohérentes avec les travaux notamment de Vercruyse *et al.*, Bucca *et al.* et More *et al.* qui ont respectivement publié des valeurs de prévalence de 97 %, 96 % et 99,7 %. La valeur de 99,7 %, notamment, est basée sur une étude employant des techniques d'analyse moléculaire (More *et al.*, 2010).

- Histologie

L'analyse histologique présente de nombreuses contraintes. L'histologie est une technique chronophage qui nécessite un personnel formé à la réalisation des coupes et des lames ainsi qu'à leur lecture. L'ensemble des étapes nécessaires à la réalisation des lames d'histologie nécessite, de plus, du matériel spécifique. L'ensemble de ces caractéristiques en fait une méthode longue et coûteuse, difficilement réalisable avec les moyens financiers et techniques inhérents à notre projet. Cette méthode a permis d'observer le type de lésions en cause dans notre étude, ce que ne permet pas la PCR. Elle permet, en outre, avec une sensibilité moindre que la méthode PCR, d'obtenir la positivité/négativité d'un échantillon. Avec l'histologie il est également possible d'avoir une estimation de la quantité de parasites présents dans un prélèvement ou un ensemble de prélèvements. L'exploitation complète des résultats avec cette méthode est compliquée, notamment pour ce qui concerne l'identification d'espèces (voir plus loin "Identification d'espèces").

- Collecte des échantillons

Si les prélèvements réalisés pour la PCR pouvaient être transportés soit congelés, soit avant toute congélation, en sachets individuels, les prélèvements réalisés pour l'histologie devaient être placés très rapidement dans le formol. Ceci est très contraignant. En effet cela nécessite d'avoir préparé à l'avance des flacons de formol individuels, de les avoir transportés jusqu'au lieu de collecte (abattoir ou atelier de découpe) avant de pouvoir faire les prélèvements. De plus, pour des raisons d'hygiène et de sécurité les flacons ne pouvaient pas être ouverts à proximité des carcasses destinées à la consommation. Les prélèvements témoins, réalisés en atelier de découpe sur des pièces de viande destinées à la consommation n'ont, pour cette raison, pas pu être placés immédiatement dans le formol et ont donc été transportés dans les mêmes conditions que les prélèvements destinés à la PCR. Ce délai avant la mise en formol conduit à un dessèchement des échantillons et c'est la raison pour laquelle 3 des prélèvements faits sur les animaux témoins ont rencontré un problème technique à l'histologie et 2 d'entre eux étaient tout à fait inutilisables.

- Prévalence par histologie, sensibilité de la méthode

Il est difficile de comparer les valeurs de prévalence au niveau des individus, obtenues par cette méthode, avec les données bibliographiques. En effet, le résultat est très fortement dépendant du nombre de coupes et du nombre de prélèvements réalisés sur chaque individu. Ceci explique que les valeurs de prévalence obtenues par histologie dans notre étude au niveau des individus, soient inférieures aux valeurs citées précédemment (Bucca *et al.*, 2011; Vercruyssen *et al.*, 1989), obtenues par des méthodes similaires.

En revanche, au niveau des prélèvements, les valeurs devraient se rapprocher des prévalences publiées dans ces études pour des prélèvements similaires. Utilisons ici l'exemple des prélèvements de myocarde ; dans notre étude 68 prélèvements de muscle cardiaque ont été traités et 38 d'entre eux sont porteurs d'au moins un kyste visible à l'histologie. La prévalence sur ce type de prélèvements est donc de 55,9 %, et elle est même de 81,8 % chez les cœurs d'animaux témoins. Vercruyssen *et al.* et Bucca *et al.* obtiennent respectivement, par histologie sur des cœurs d'animaux tout venants, des prévalences de 74 % et 81 %, ce qui est en total accord avec notre étude sur les cœurs témoins.

- Identification d'espèces

La méthode histologique présente l'inconvénient de ne pas pouvoir préciser s'il s'agit de kystes de *S. hominis* ou de *S. hirsuta* lorsque le parasite observé présente une paroi épaisse. Les kystes à paroi fine quant à eux sont nécessairement des kystes de *S. cruzi*. Cependant, en combinant nos résultats obtenus par PCR avec ceux obtenus par histologie, nous pensons, en ce qui concerne les kystes à paroi épaisse, qu'il s'agit ici uniquement de kystes de *S. hominis*. En effet, aucun prélèvement n'a présenté en PCR de bande visible autour de 100 paires de bases, bande caractéristique de *S. hirsuta*. L'absence de cette espèce de *Sarcocystis* spp. peut sembler surprenante du fait du nombre important de chats errants à proximité des exploitations. Nous pouvons supposer d'une part que l'alimentation du chat et du chien domestiques sont légèrement différentes. Culturellement, le chien s'est souvent vu servir les restes de tables alors que le chat de ferme devait plus souvent subvenir par lui-même à ses besoins. Le chat est donc peut être moins en contact avec la viande bovine que le chien. D'autre part, les zones d'alimentation des bovins sont peut être moins superposables avec les zones de déjection du chat qu'avec celles du chien et des animaux de la faune sauvage porteurs de *S. cruzi*. Enfin, le chat est décrit comme étant moins bon excréteur que le chien.

III-B Caractéristiques des populations d'étude

- Animaux témoins

L'objectif initial, en ce qui concernait la sélection des animaux témoins était ici d'obtenir des prélèvements provenant de bovins issus des mêmes élevages que ceux des animaux saisis. Cela devait nous permettre d'étudier des données individuelles, sur des bovins ayant été exposés aux mêmes conditions d'élevage et aux mêmes conditions d'exposition. Malheureusement, devant la difficulté que nous avons rencontrée à obtenir, de la part des éleveurs concernés par une saisie, les dates et les lieux d'abattage des bovins d'intérêt, nous avons été contraints de modifier notre méthode de sélection des témoins. Le prélèvement des témoins en atelier de découpe a eu l'avantage majeur de permettre un nombre très élevé de prélèvements en un laps de temps court, sur des bovins dont les caractéristiques au moment du prélèvement étaient connues grâce à l'identification des carcasses. Cela nous a permis de sélectionner des carcasses dont les profils étaient similaires à ceux des animaux saisis. En revanche, cette méthode a présenté un inconvénient majeur : il était impossible de prélever les cœurs des animaux ainsi sélectionnés. En effet, le cœur et la carcasse des bovins abattus suivent des circuits différents dès l'abattoir, et la traçabilité individuelle n'est pas maintenue pour les cœurs. Ceci pose 2 problèmes dans notre étude, premièrement, le nombre de prélèvements traités entre animaux saisis et témoins n'est plus le même, deuxièmement, nous n'avons aucune information concernant la provenance des cœurs (race du bovin, âge ...)

Initialement, le nombre de bovins saisis et le nombre de bovins témoins, traités à la fois en PCR et en histologie devait être au minimum de 50 individus pour chaque catégorie. Vu le temps imparti à notre étude, les difficultés à obtenir les prélèvements témoins et le temps nécessaire au traitement d'un tel nombre de prélèvements, nous avons dû réduire notre nombre de témoins à une trentaine d'individus. En revanche le nombre d'animaux saisis atteint les 47 individus ce qui est satisfaisant.

- Facteurs de risque

La race Blonde d'Aquitaine est fortement prédominante parmi les animaux saisis. Nous avons souhaité conserver cette proportion parmi les animaux témoins de manière à pouvoir comparer les 2 populations. Les femelles sont également majoritaires. Ceci pourrait être dû à des modes d'élevage légèrement différents pour les mâles et les femelles. En ce qui concerne la race, il est difficile de mettre en cause les méthodes d'élevage. En effet, si certains élevages peuvent présenter des particularités, les élevages de races allaitantes dans notre région d'étude présentent, semble-t-il, dans leur majorité, des conduites d'élevage similaires. Si les facteurs de risque liés à la conduite du troupeau sont écartés, reste alors l'hypothèse d'une sensibilité individuelle, génétique, chez certains bovins. Dans notre étude, certains bovins saisis provenaient des mêmes élevages. Ceci ne nous permet pas pour autant d'incriminer le facteur génétique ou le facteur de conduite d'élevage puisque la sélection génétique et la conduite d'élevage, appliquées pour les différents bovins, sont identiques dans un même élevage. Il serait intéressant de pouvoir remonter la piste génétique, en étudiant sur plusieurs années, les saisies pour myosites éosinophiliques de plusieurs élevages utilisant les mêmes facteurs d'amélioration génétique.

III-C Myosite éosinophilique et présence de *Sarcocystis* spp.

- Sites d'élection

Le parasite présente des sites d'élection pour le développement des kystes intramusculaires : le myocarde, la langue, le diaphragme, l'œsophage et les muscles oculaires (Euzeby, 1998). En 2010, Bucca *et al.* montrent, par histologie, qu'en effet, certains groupes musculaires sont prédominants : myocarde, masseter, diaphragme, langue. Dans notre étude ces sites d'élection, muscles à activité continue ne sont pas significativement plus souvent infectés que les autres sites musculaires.

La hampe (diaphragme) n'est pas un site de développement privilégié dans notre étude. Il faut prendre en compte la sensibilité des méthodes employées. La sensibilité étant assez faible en histologie, les kystes ne sont repérés que lorsqu'ils se trouvent en quantité suffisante (cas des études antérieures). Les muscles dits électifs présentent probablement une plus forte densité de kystes parasites, mais la densité dans les autres groupes musculaires est sans doute suffisante pour rendre les résultats positifs en PCR. Pour étudier l'électivité de ces sites, il faudrait conduire une étude visant à quantifier le nombre de parasites présents dans chaque prélèvement.

En ce qui concerne le myocarde, il s'agit en effet d'un site d'élection, mais d'une espèce en particulier ; *S. cruzi*. En 1989, Vercruysse *et al.* montraient, dans leur étude conduite sur des animaux témoins, une forte prévalence de *S. cruzi* dans le cœur alors que *S. hominis* (paroi épaisse) y était rarement mis en évidence et toujours associé avec *S. cruzi* (paroi fine). Les autres muscles précités n'ont pas été utilisés dans notre étude, mais il pourrait être intéressant de conduire des manipulations, visant ces muscles en particulier, avec identification de l'espèce en cause.

- Intérêt de la PCR multiplex dans la détermination d'espèce et caractéristiques de la méthode

La PCR multiplex est un puissant outil permettant la détermination des espèces incriminées. En effet, il existe peu d'autres méthodes qui le permettent, la RAPD PCR en est une (Güclü *et al.*, 2004), mais la technique est moins facile à mettre en place que la PCR multiplex. L'histologie, quant à elle, ne permet pas d'identifier avec certitude les kystes en fonction de l'aspect de leur paroi. Enfin, les caractéristiques exactes de cette méthode multiplex, très récente en ce qui concerne l'étude de la sarcosporidiose, sont encore à explorer. Il serait intéressant, par exemple, de déterminer pour cette méthode la quantité d'ADN minimale nécessaire à l'apparition de la bande de positivité, et ce pour chaque espèce. Il serait également intéressant dans le cas de prélèvements doublement positifs de savoir si ce seuil est modifié pour chacune des espèces présentes.

Il serait essentiel de déterminer une sensibilité et une spécificité exactes pour cette PCR multiplex. Les spécificités de méthodes similaires ont été déterminées en réalisant ces méthodes sur des mélanges d'espèces. Par exemple dans le cas d'une coccidiose à *Eimeria* du lapin, différentes *Eimeria* spp. étaient utilisées en mélange ; dans le cas de *Toxoplasma gondii* c'est un mélange de différents agents bactériens, parasites et coccidiens qui a été utilisé. Pour déterminer la sensibilité de ces mêmes méthodes PCR multiplex, des dilutions d'extraits d'ADN ont été utilisées et les extraits d'ADN étaient produits à partir d'une quantité connue d'ookystes (Rahumatullah *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2013).

- Lésions et histologie

Les lésions macroscopiques sont surtout visibles dans les muscles striés squelettiques. Parmi les prélèvements provenant d'animaux saisis qui ont été intégrés à notre étude de nombreuses lésions étaient visibles sur les muscles striés squelettiques. La majorité des lésions observées étaient de petite taille, bien circonscrites, vert pistache, assez fermes. Dans quelques cas, des lésions plus étendues étaient observées, avec parfois modification de la couleur et de la consistance de l'ensemble des fibres musculaires prélevées qui étaient grisâtres et avaient perdues leur coloration rouge. Les prélèvements de myocardi ne présentaient pas de lésions aussi nettement visibles macroscopiquement. Les lésions étaient quasiment impossibles à mettre en évidence macroscopiquement. A l'histologie pourtant, un nombre important de lésions a été observé dans les cœurs d'animaux saisis.

- Déclaration d'une myosite éosinophilique

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence que la double infection n'était pas nécessaire pour développer une myosite éosinophilique. Il semblerait même que le nombre de doubles infections soit plus important chez les bovins témoins que chez les bovins saisis, bien que ce résultat soit encore à confirmer.

Un autre résultat qui mériterait également d'être confirmé est la prévalence plus élevée de *S. hominis* que la prévalence de *S. cruzi* chez les animaux saisis, et en comparaison avec les animaux témoins. En effet, dans cette étude, nous avons montré qu'une différence significative (p valeur de $1,66.10^{-3}$) existait entre la population des animaux témoins et la population des animaux saisis en ce qui concerne les espèces impliquées. *S. hominis* retrouvé seul est plus souvent mis en évidence chez les animaux saisis. Audrey Honoré en 2011 avait déjà mis en évidence une prévalence de 96% de *S. hominis* contre 4% de *S. cruzi* parmi les bovins saisis, dont le résultat de PCR était positif et avait permis le séquençage.

S. cruzi est réputé plus pathogène que *S. hominis*. Il est plus fréquemment responsable de forme aiguë de sarcosporidiose, et à des doses d'ingestion plus faibles. Il est envisageable qu'il existe une différence dans la forme de réponse immunitaire selon que l'infection soit due à *S. hominis* ou à *S. cruzi*. Il est connu qu'une immunité de prémunition se met en place lorsque le bovin est exposé à des doses relativement faibles de sporocystes avant d'être exposé à une dose beaucoup plus importante. Il est également connu que la qualité de l'immunité est proportionnelle aux doses auxquelles le bovin est exposé. L'immunité est par ailleurs entretenue par une exposition répétée puisque les kystes dégénèrent après environ 3 mois (Euzéby, 1998).

A l'issue de notre étude, nous sommes en mesure de formuler plusieurs hypothèses :

- La qualité et la forme de cette réponse immunitaire dépendraient de l'espèce de *Sarcocystis* rencontrée par le bovin. Il existerait éventuellement une forme de réponse qui serait plutôt en faveur de l'apparition de symptômes aigus et en défaveur de l'apparition future de myosite éosinophilique, tandis que d'autres formes de réponse seraient plutôt en faveur de l'apparition de myosite éosinophilique.

- *S. hominis* serait le principal responsable de l'apparition des lésions de myosite éosinophilique, néanmoins la probabilité d'apparition de la myosite éosinophilique serait moindre si le bovin a d'abord été exposé à *S. cruzi* puis à *S. hominis*. *S. cruzi* serait à l'origine d'une forme de réponse immunitaire provoquant une sorte de protection contre l'apparition de la myosite lorsque le bovin rencontre *S. hominis* par la suite.

Ceci expliquerait que *S. hominis* soit plus souvent représenté dans la population d'animaux saisis et que *S. cruzi* soit plutôt bien représenté dans la population témoin, y compris en association avec *S. hominis*.

Nous nous sommes donc également intéressés à la densité de l'infection, malheureusement impossible à établir de façon précise et fiable dans notre étude. Cependant, le nombre de kystes visibles dans chaque prélèvement est une information intéressante que fournit l'histologie et que ne peut pas fournir la PCR multiplex. Chez les animaux saisis, les valeurs sont souvent faibles de l'ordre de 1 à 2 kystes par lame (maximum 6 kystes, pour le cœur du bovin h32). Chez les animaux témoins les valeurs sont parfois plus élevées, principalement dans les cœurs. Dans les cœurs témoins, une

dizaine de kystes par lame n'est pas une exception (maximum 30 kystes pour le cœur t34). Le nombre de kystes observés par prélèvement positif en histologie est calculé pour pouvoir comparer les animaux témoins et les animaux saisis. Chez les animaux saisis, 1,44 kystes sont observés en moyenne sur les prélèvements positifs. Chez les animaux témoins la valeur est de 3,96 kystes par prélèvement.

Il est également possible que l'évolution d'un type de réaction plutôt qu'un autre ne dépende pas uniquement ou pas du tout de l'espèce incriminée, mais bien de facteurs individuels, génétiques, qui expliqueraient la prédominance de la Blonde d'Aquitaine parmi les animaux saisis (Granstrom *et al.*, 1989).

- Espèces et mesures préventives

Les mesures de lutte à mettre en place doivent permettre l'interruption du cycle : elles doivent empêcher, d'une part, la rencontre entre l'hôte définitif (l'homme ou le chien) et les sarcocystes et d'autre part, la rencontre entre l'hôte intermédiaire (le bovin) et les sporocystes excrétés par l'hôte définitif.

Si on démontre que *S. cruzi* est plus souvent incriminé, il faudra limiter l'accès des chiens et de la faune sauvage (renards) aux zones d'élevage, y compris les pâtures, ce qui est difficile à réaliser. Pour les chiens appartenant à l'exploitation et/ou y travaillant, il est important de leur éviter tout contact avec les sarcocystes viables et cela passe forcément par la gestion de leur alimentation qui sera de préférence une alimentation de type sec, industriel.

Même si, dans le cas de la sarcosporidiose, il n'a pas été démontré de passage du parasite vers le fœtus, un cas a tout de même été décrit (Dubey et Bergeron, 1982). Par conséquent, il est nécessaire d'empêcher les chiens d'avoir accès à des produits d'avortement et aux placentas, d'autant plus que la contamination par d'autres coccidies serait ainsi empêchée. La contamination des bovins, par *Neospora caninum* par exemple, entraîne des conséquences lourdes au niveau de l'élevage.

En revanche si l'implication de *S. hominis* dans l'apparition des myosites éosinophiliques est confirmée par la suite, les mesures concerneront principalement les pratiques d'épandage, les pratiques d'alimentation des bovins, les installations d'hygiène disponibles sur les lieux d'élevage et la gestion des eaux usées de l'habitation d'une part et de l'exploitation d'autre part. Il faudra également prendre en compte l'irrigation des pâtures par les cours d'eaux, notamment en cas de crues.

Conclusion

L'existence d'un lien entre la présence de *Sarcocystis* spp. et l'apparition d'une myosite éosinophilique, conduisant à la saisie des carcasses concernées n'apparaît pas évidente. En effet, la prévalence de l'infection par le parasite est de l'ordre de 100 % alors que seulement un bovin pour mille environ montre des lésions de myosite éosinophilique. Néanmoins, des études évoquent l'implication du parasite dans l'apparition de ces lésions. Vangeel et ses collaborateurs (2011) ont notamment pu induire des lésions de myosite éosinophilique en injectant, expérimentalement par voie intramusculaire, des antigènes issus de bradyzoïtes de *Sarcocystis* spp..

Notre étude a permis d'avancer sur cette question en combinant une méthode très récente de PCR multiplex avec la méthode histologique, sur 305 prélèvements de muscles striés squelettiques et cardiaques d'un total de 106 bovins. Elle confirme que la prévalence du parasite chez ces bovins est très élevée et proche de 100 %. En outre, les deux espèces, *S. cruzi* et *S. hominis*, ont été identifiées alors que *S. hirsuta* n'a jamais été mise en évidence. Ces 2 espèces possèdent chacune des sites musculaires d'élection différents : *S. cruzi* est plus fréquemment mis en évidence dans le cœur et *S. hominis* dans les muscles striés squelettiques.

En ce qui concerne le lien entre myosite éosinophilique et la présence de *Sarcocystis*, nous montrons une association significative entre la présence de *S. hominis* et la myosite éosinophilique. Si la co-infection par *S. hominis* et *S. cruzi* est fréquemment observée chez les animaux sans lésion comme chez ceux avec lésions, elle n'est pas significativement associée aux lésions de myosite éosinophilique. La séquence chronologique de l'infection du bovin par *S. cruzi* puis par *S. hominis* pourrait atténuer l'effet inducteur par *S. hominis* des lésions de myosite éosinophilique.

Comme décrit dans d'autres études, un effet race et sexe du bovin semble être positivement corrélé à l'apparition d'une myosite éosinophilique, dans l'ensemble de la population des bovins des 6 principales races abattues dans les Pays de la Loire sur l'année 2012. En effet, les femelles de la race Blonde d'Aquitaine, bien conformées, montrent les taux de saisie les plus élevés pour ce motif. Ce même phénomène semble aussi s'exprimer chez la Parthenaise.

Il serait intéressant pour confirmer l'hypothèse du facteur "protecteur" de *S. cruzi*, de poursuivre cette étude avec les mêmes méthodes, sur des animaux ne présentant pas de lésions macroscopiques de myosite éosinophilique. Ces animaux devraient provenir d'élevages n'ayant jamais connu de saisie pour myosite éosinophilique ainsi que d'élevages connus pour avoir subi des saisies pour ce motif. Afin d'identifier les sources de la contamination des bovins, une enquête concomitante concernant la conduite d'élevage devrait être menée, notamment sur les pratiques d'épandage, la proximité de stations d'épuration, la gestion des eaux usées de l'habitation et de l'exploitation, l'alimentation des bovins, la qualité des pâturages...

Annexes

Annexe 1

Protocole de digestion enzymatique

Matériel :

- Flacon 1 L
- Flacon 200 mL avec bouchon
- Eprouvette 100 mL
- Pipette graduée 5 mL
- Eau distillée
- Pepsine 200 FIP U/g
- NaCl
- HCl 25%
- Balance
- Couteau
- Mixeur à viande
- Sachet de congélation pour la viande hachée
- Bain marie 37°C avec agitateur
- Tamis avec maille 400 µm
- Ampoule à décanter
- Tubes de prélèvements 20 mL
- Pipette graduée 2 mL
- Tubes de 1,5 mL pour congélation

Technique :

- Mettre le bain marie à chauffer
- Préparer la solution de digestion enzymatique (S0, 1L permet de traiter 10 échantillons) :
 - Verser dans le flacon de 1L :
 - 1 L d'eau distillée
 - 3 g de pepsine (Pepsine 2000 FIP U/g, Merck)
 - 5 g de NaCl
 - 7 mL de HCl 25% (ou 4,7mL de HCl 37%)La solution peut éventuellement être conservée quelques jours en chambre froide.
- Découper en morceaux et peser 200 g de viande. Broyer les 200 g au mixeur (ici, mixeur Moulinex® 1000W).
- Prélever 20 g et les placer dans un flacon de 200 mL avec 100 mL de S0. (Placer les 180g restants en sachets de congélation et les congeler à -20°C.)
- Placer le flacon au bain marie à 37°C avec agitation pendant 30 minutes.
- Filtrer l'ensemble du contenu au tamis 400 µm. Placer le filtrat dans une ampoule à décanter pendant 30 minutes.
- Récupérer environ 10 mL du culot de décantation dans un tube de prélèvement. Placer 1,5 mL à l'aide d'une pipette graduée dans chaque tube (5 tubes) de congélation. Les placer dans une boîte de stockage.
- Placer la boîte au congélateur à -20°C en attente des étapes suivantes.

Annexe 2

Protocole d'extraction d'ADN

Matériel :

- kit "NucleoSpin[®] Tissue" (Macherey-Nagel)
- micropipettes et cônes
- tube eppendorf 1,5 mL
- bain marie sec 70°C
- vortex
- éthanol 95%
- centrifugeuse
- petits tubes eppendorf pour la congélation des extraits

Technique :

- Faire décongeler un tube de 1,5 mL pour chaque échantillon à traiter.
- Mettre le bain marie sec à chauffer une heure avant le début des manipulations.

-Pré-lyse de l'échantillon

- Vortex
- Prélever 200 µL de l'échantillon et le placer dans un tube eppendorf 1,5ml.
- Ajouter 180µL de Buffer T1
- Ajouter 25µL de protéinase K
- Incuber une heure à 56°C. (Il est possible dans un souci d'organisation de laisser les prélèvements incuber pendant une nuit.)

-Lyse de l'échantillon

- Vortex
- Ajouter 200 µL de B3
- Vortex
- Incubation 10 minutes au bain marie sec 70°C (pendant ce temps là, identifier les colonnes à silice et les petits tubes finaux)

-Précipitation de l'ADN

- Ajouter 210 µL d'éthanol à 95 %
- Vortex

-Fixation de l'ADN à la membrane silice

- Mettre l'ensemble du contenu des tubes dans une colonne à silice elle-même placée dans un tube collecteur
- Centrifuger 1 minute à 11 000 g
- Éliminer le liquide contenu dans le tube collecteur

-Lavage de la membrane de silice

- Lavage 1 : ajouter 500 µL de BW, centrifugation 1 minute à 11 000 g, éliminer le liquide contenu dans le tube collecteur
- Lavage 2 : ajouter 600 µL de B5, centrifugation 1 minute à 11 000 g, éliminer le liquide contenu dans le tube collecteur

-Séchage de la membrane de silice

- Centrifugation 1 minute à 11 000 g

-Elution de l'ADN

- Placer les colonnes dans des tubes eppendorf auxquels on retirera le couvercle

Ajouter 100 μ L de BE à 70 °C (se placer à proximité du bain marie sec pour conserver la température) dans les colonnes à silice
Laisser incuber une minute à température ambiante
Centrifuger 1 minute à 11 000 g
Récupérer le liquide, le placer dans des petits tubes

Placer les tubes identifiés dans une boîtes de stockage au congélateur à -20°C en attente des étapes suivantes.

Annexe 3

Protocole de PCR multiplex *Sarcocystis* spp.

Matériel :

- tubes PCR
- micropipettes et cônes
- tube eppendorf 1,5 mL
- vortex
- réactifs PCR
- thermocycleur
- cuve à électrophorèse
- TBE 0,5 X

Technique :

-Préparation du Master mix

Le master mix est un mélange contenant tous les réactifs nécessaires à la PCR, excepté les échantillons d'extrait d'ADN.

Dans un tube eppendorf stérile, ajouter, dans l'ordre, chacun des réactifs ci dessous :

Les quantités sont données pour le traitement d'un échantillon (multiplier par le nombre d'échantillons à traiter en prenant les témoins en compte).

Réactif	Concentration finale	Volume à ajouter
H ₂ O		12,8 µL
Tampon PCR 10X + MgCl ₂	1 mM	2,5 µL
Amorce 1	1 µM	1 µL
Amorce 2	1 µM	1 µL
Amorce 3	1 µM	1 µL
Amorce 4	1 µM	1 µL
dNTPs 10 mM	0,2mM	0,5 µL
Taq (5u/µL)	1 unité / 25 1 µL	0,2 µL

Amorce 1 : Amorce reverse 3 *S. spp*

Amorce 2 : Amorce sens *Sarcocystis cruzi*

Amorce 3 : Amorce sens *Sarcocystis hominis*

Amorce 4 : Amorce sens *Sarcocystis hirsuta*

5' AACCCCTAATTCCCCGTTA 3'

5' ATCAGATGAAAATCTACTACATGG 3'

5' ACAGAACCAACACTC 3'

5' CATTTCGGTGATTATTGG 3'

-Préparation des échantillons

Vortexer le tube contenant le mix
Répartir 20 µL de Master mix dans chaque tube PCR à paroi fine
Ajouter 5 µL d'échantillon de DNA dans chaque tube PCR

-Amplification

Introduire les tubes dans le thermocycleur, et activer le programme suivant :

94 °C pendant 4 minutes
94 °C pendant 1 minute
56 °C pendant 1 minute
72 °C pendant 30 secondes } 35 cycles
72 °C pendant 10 minutes
Refroidissement et maintien à 14°C

-Analyse des produits de PCR par électrophorèse

Gel d'agarose 2% dans du TBE 0,5X
Introduire dans chaque puit 20 µL de produit de PCR + 4,5 µL de solution de dépôt
Faire migrer dans un tampon TBE 0,5 X, pendant 45 minutes à 100 volts et 400 mA

-Interprétation

Fragments amplifiés selon l'espèce de *Sarcocystis*:

<i>Sarcocystis hirsuta</i>	108 pb
<i>Sarcocystis hominis</i>	182 pb
<i>Sarcocystis cruzi</i>	284 pb

Annexe 4

Protocole de clonage

L'ensemble du protocole demande 5 jours.

Matériel et réactifs :

- milieu LB agar (agar : 12g/L) 500mL autoclavé
- ampicilline 100mg/mL
- solution de Xgal à 40 mg/ml
- solution IPTG à 100mM
- centrifugeuse
- petits tubes eppendorf
- kit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems par promega
- bain marie
- étuve à 37°C
- réfrigérateur à 4°C
- SOC medium
- cellules compétentes
- glace pilée
- tube de centrifugation 15mL
- kit d'extraction de plasmides
- kit de PCR + thermocycleur

Technique :

-Préparation des milieux

Régénérer le milieu LB agar
Refroidir jusqu'à 50°C
Ajouter l'ampicilline (100µL de solution à 100mg/ml dans 100 mL de gélose, pour une concentration finale de 100µg/mL).
Couler 30 boîtes
Stocker à 4°C

-Etape de ligation (jour 1)

Centrifuger le vecteur
Introduire dans un petit tube eppendorf les réactifs suivants

2X Rapid Ligation Buffer T4 DNA ligase	5 µL
PGEM EASY VECTOR	1 µL
PCR product	x µL (25ng)
T4 DNA ligase	1 µL
H2O stérile	10 µL

Mélanger doucement
Incuber une nuit à 4°C

-Etape de transformation (jour 2) et analyse

Préparer un bain marie à 42°C
Préparer 250µL de SOC medium à température ambiante
Placer un tube de cellules compétentes dans de la glace pilée

Ajouter, lorsque le tube des cellules est décongelé, 2 μ L du mélange réactionnel de ligation dans le tube des cellules compétentes
Agiter en tapotant doucement
Incuber sur la glace pilée pendant 30 minutes
Placer le tube au bain marie à 42°C pendant 50 secondes sans agiter, de manière à faire subir un choc thermique aux cellules compétentes
Replacer le tube sur la glace pilée pendant 2 minutes
Ajouter 250 μ L de SOC medium à température ambiante dans le tube
Incuber le tube à 37°C pendant 1h30 en agitation douce (150rpm)

Pendant le temps d'incubation de 1h30 :

Préparer 6 boîtes de LB/ampicilline/IPTG/Xgal:

Etaler sur 6 boîtes de LB/ampicilline préparées précédemment :

-40 μ L de la solution de Xgal (40mg/ml)

-40 μ L de la solution de IPTG (100mM)

Replacer le tube sur glace pilée après incubation
Etaler 50 μ L du produit de transformation sur chacune des 6 boîtes
Incuber à 37°C pendant au moins 18 heures
Placer les boîtes à 4°C pendant 2 à 3 heures pour améliorer la coloration blanc/bleu

-Sélection des clones recombinants (jour 3)

Prélever des colonies blanches et les repiquer en stries, respectivement sur un quart de boîte de LB/ampicilline (numéroter les clones)
Incuber à 37°C pendant 18 heures
Stocker ces boîtes à 4°C dans un sac plastique pour éviter leur dessiccation

-Multiplication des clones recombinants (jour 4)

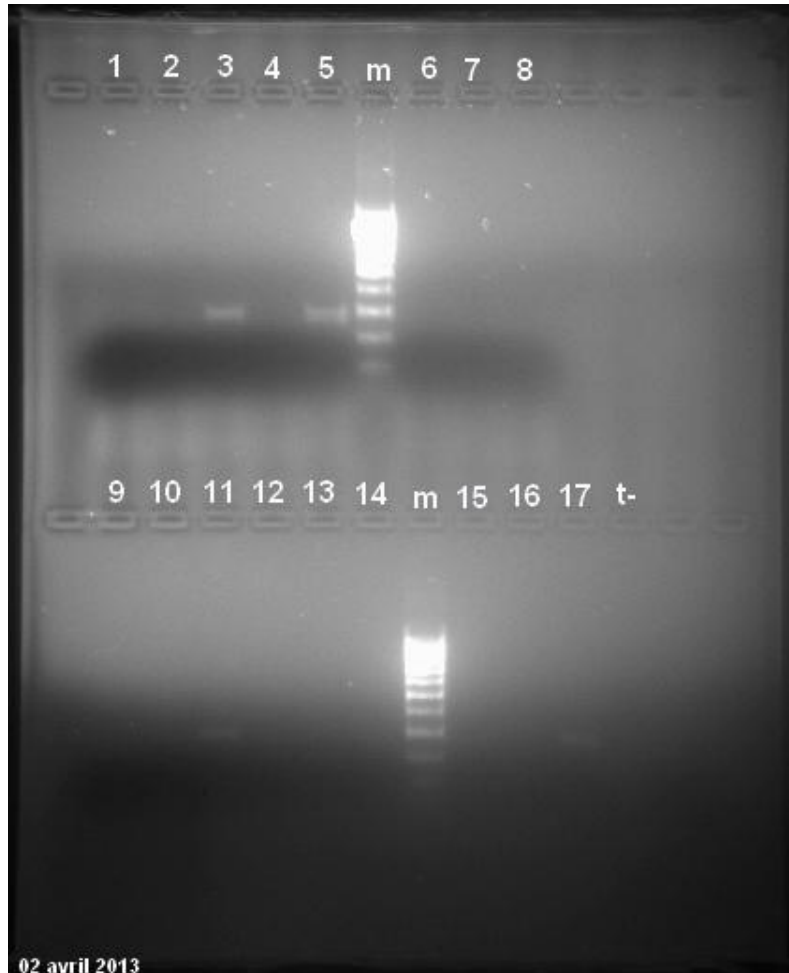
Repiquer quelques clones sélectionnés précédemment respectivement dans des tubes de bouillon Terrific/ampicilline (100 μ g/mL)
Incuber à 37°C pendant 24 heures

-Extraction des plasmides des clones recombinants (jour 5)

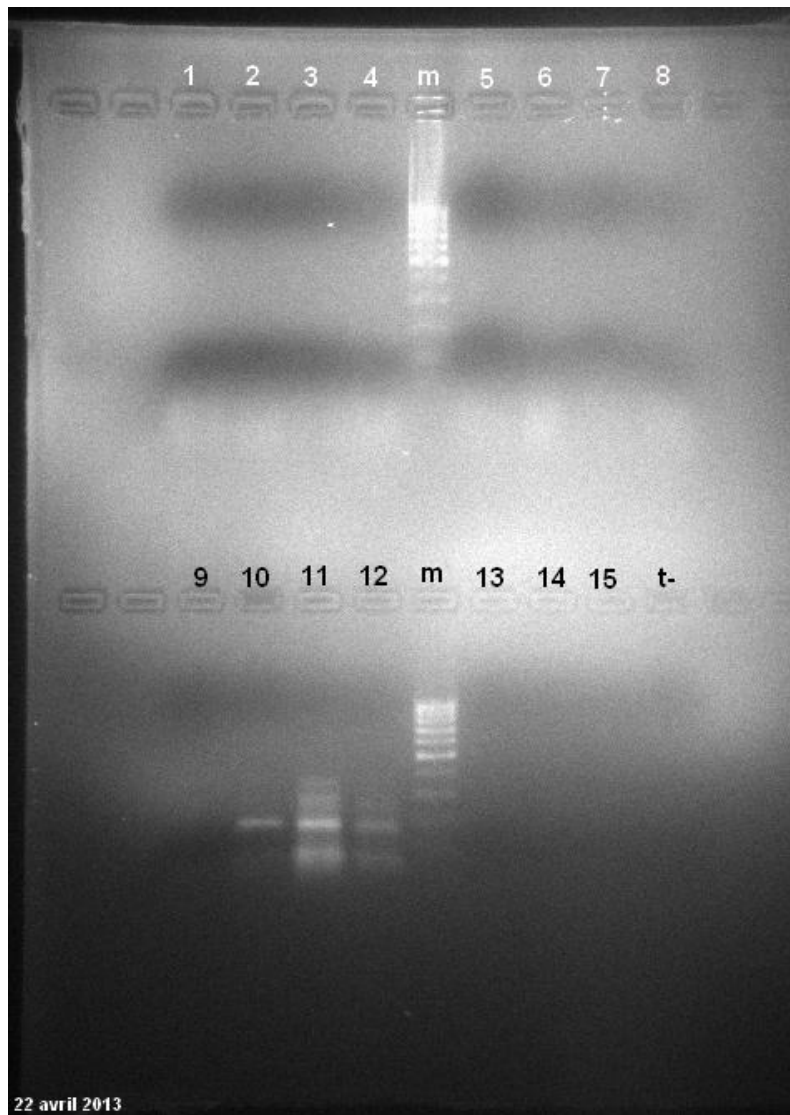
Transférer la culture dans un tube de centrifugation de 15mL
Centrifuger à 8000g pendant 15 minutes
Reprendre le culot dans H₂O stérile ou PBS stérile pour obtenir une suspension dense
Faire l'extraction de plasmides selon le protocole du kit utilisé
Effectuer une PCR avec les amorces spécifiques de l'insert

Annexe 5

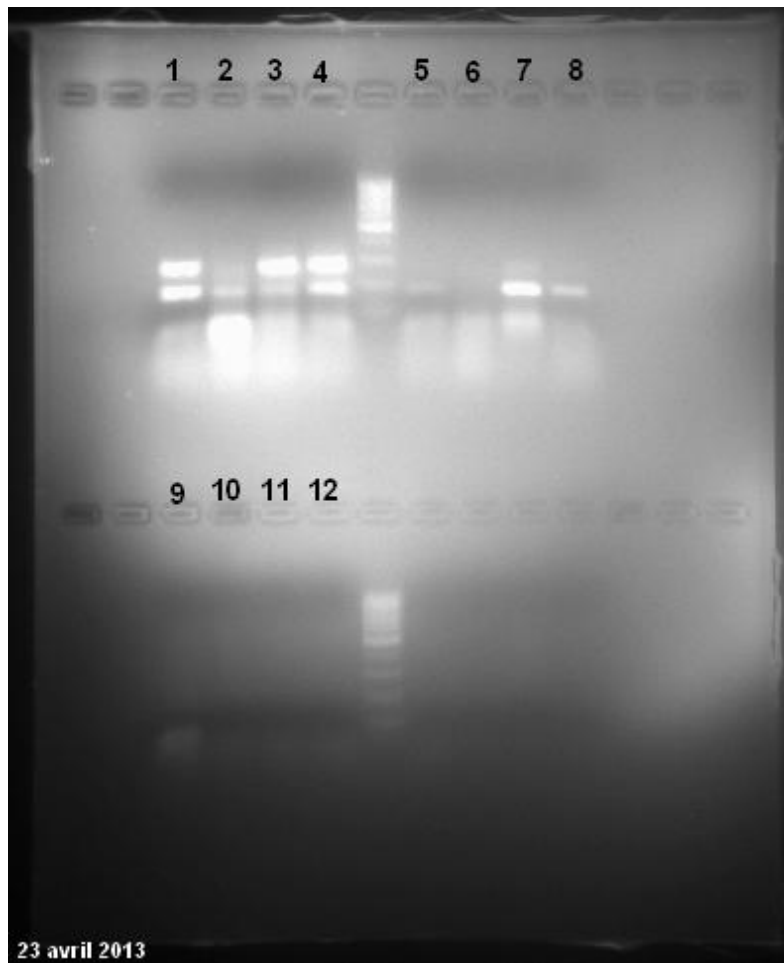
Résultats des gels d'électrophorèse observés à la lumière UV



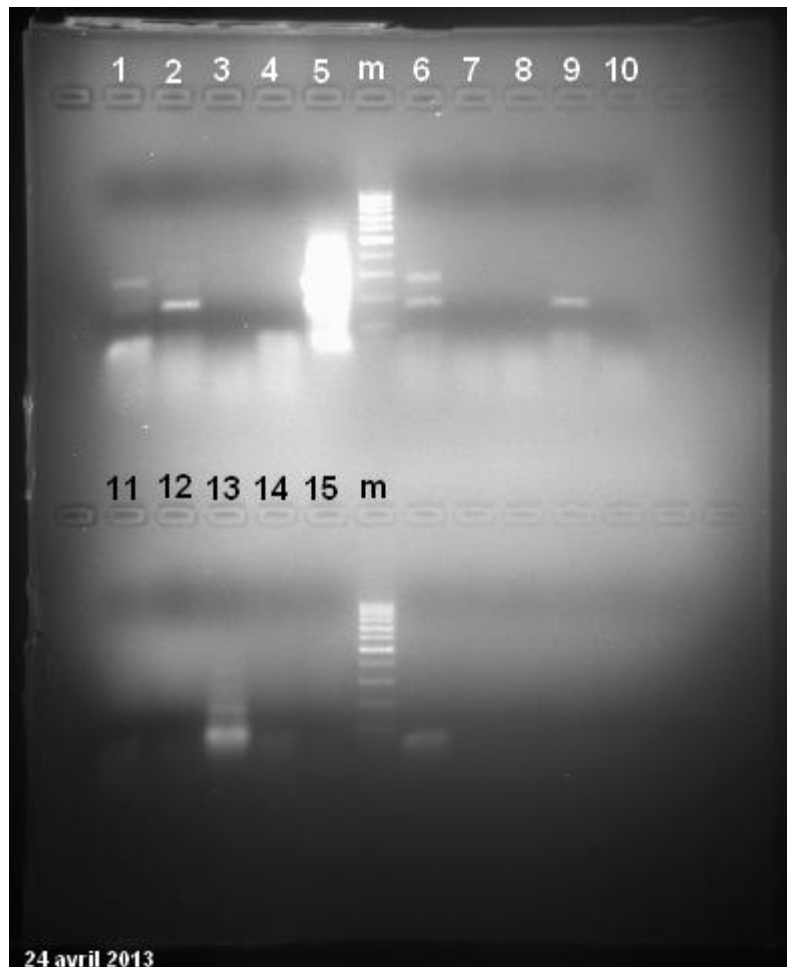
02 avril 2013			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = hH1	négatif	9 = hH4	négatif
2 = hL1	négatif	10 = hL4	négatif
3 = hH2	positif (284 pb)	11 = hC4	positif (284 pb)
4 = hL2	négatif	12 = hH5	négatif
5 = hC2	positif (284 pb)	13 = hL5	négatif
6 = hH3	négatif	14 = hC5	négatif
7 = hL3	négatif	15 = hH6	négatif
8 = hC3	négatif	16 = hL6	négatif
		17 = hC6	positif (284pb)
		t- (témoin négatif)	négatif



22 avril 2013			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = hH2	négatif	9 = hH9	négatif
2 = hL2	négatif	10 = hL9	positif (182 pb)
3 = hC2	négatif	11 = hC9	positif (182 et 284 pb)
4 = hH7	négatif	12 = hH10	positif (182 et 284 pb)
5 = hL7	négatif	13 = hL10	négatif
6 = hC7	négatif	14 = hC10	négatif
7 = hH8	négatif	15 = t+	négatif (qualité insuffisante de l'extrait)
8 = hL8	négatif	t-	négatif



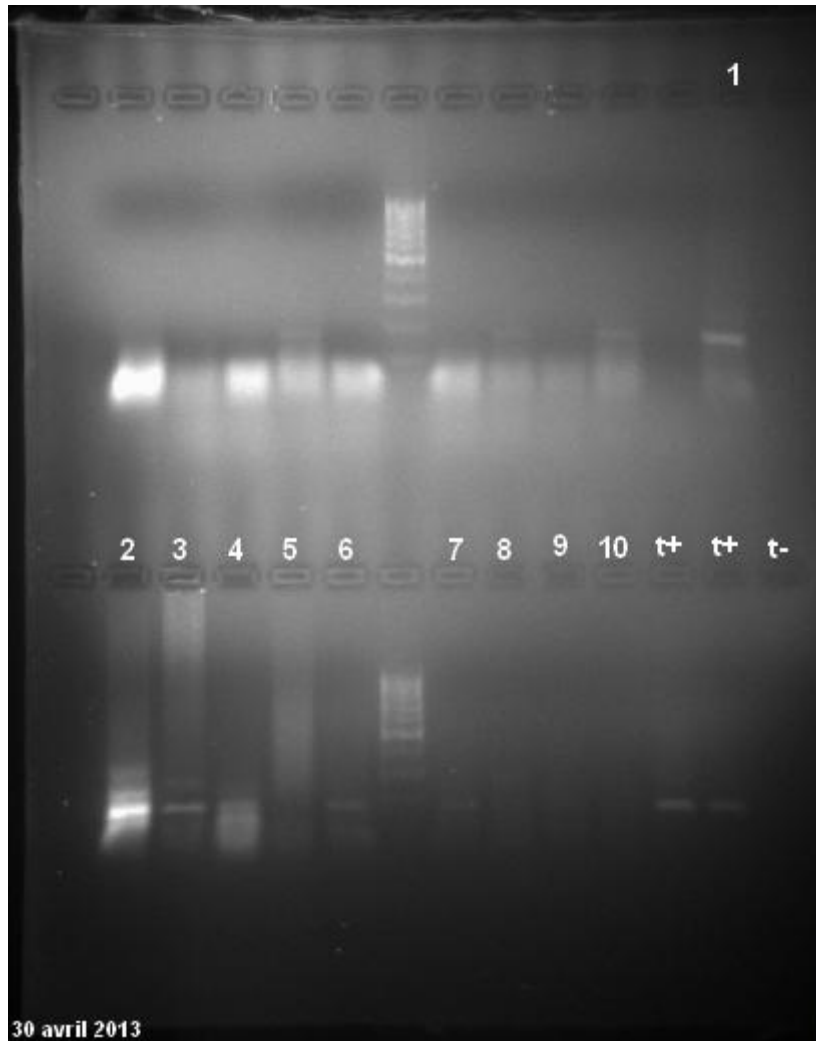
23 avril 2013			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = hH11	positif (182 et 284 pb)	9 = hC13	négatif
2 = hL11	positif (182 et 284 pb)	10 = hH14	négatif
3 = hC11	positif (182 et 284 pb)	11 = hL14	négatif
4 = hH12	positif (182 et 284 pb)	12 = hC14	négatif
5 = hL12	positif (182 et 284 pb)		
6 = hC12	négatif		
7 = hH13	positif (182 et 284 pb)		
8 = hL13	positif (182 pb)		



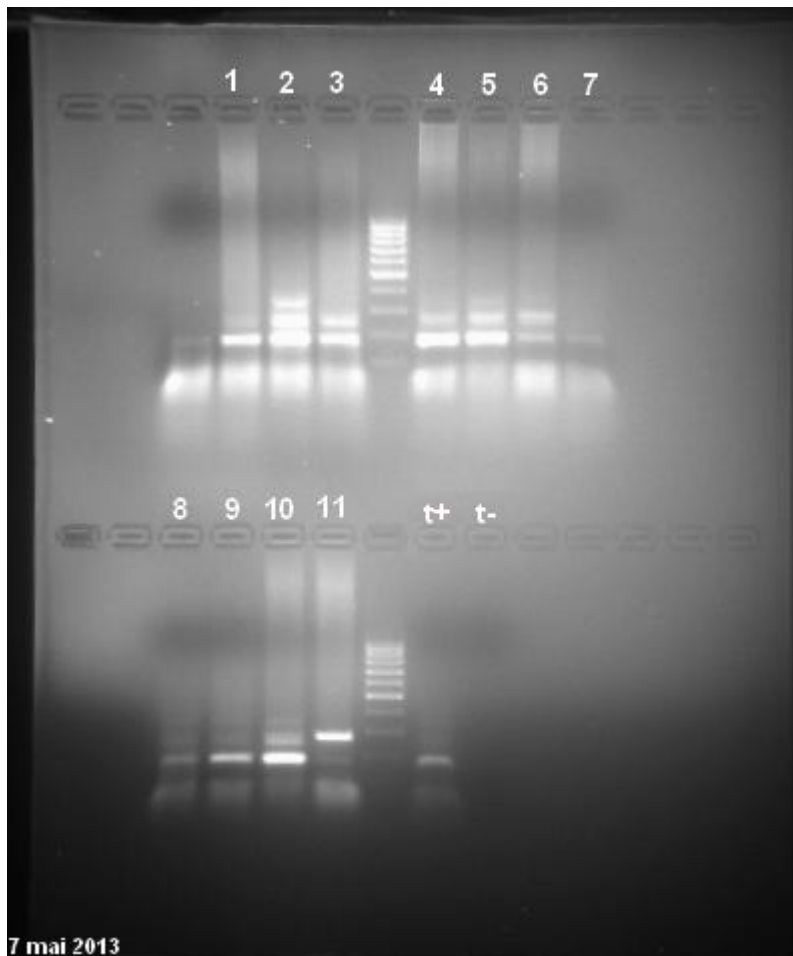
24 avril 2013			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = hC9	positif (182 et 284 pb)	11 = hC13	négatif
2 = hH10	positif (182 et 284 pb))	12 = hH15	négatif
3 = hH11	négatif	13 = hL15	positif (182 pb)
4 = hL11	négatif	14 = hC15	négatif
5 = hC11	positif (182 et 284 pb)	15 = t-	négatif
6 = hH12	positif (182 et 284 pb)		
7 = hL12	négatif		
8 = hC12	négatif		
9 = hH13	positif (182 pb)		
10 = hL13	négatif		



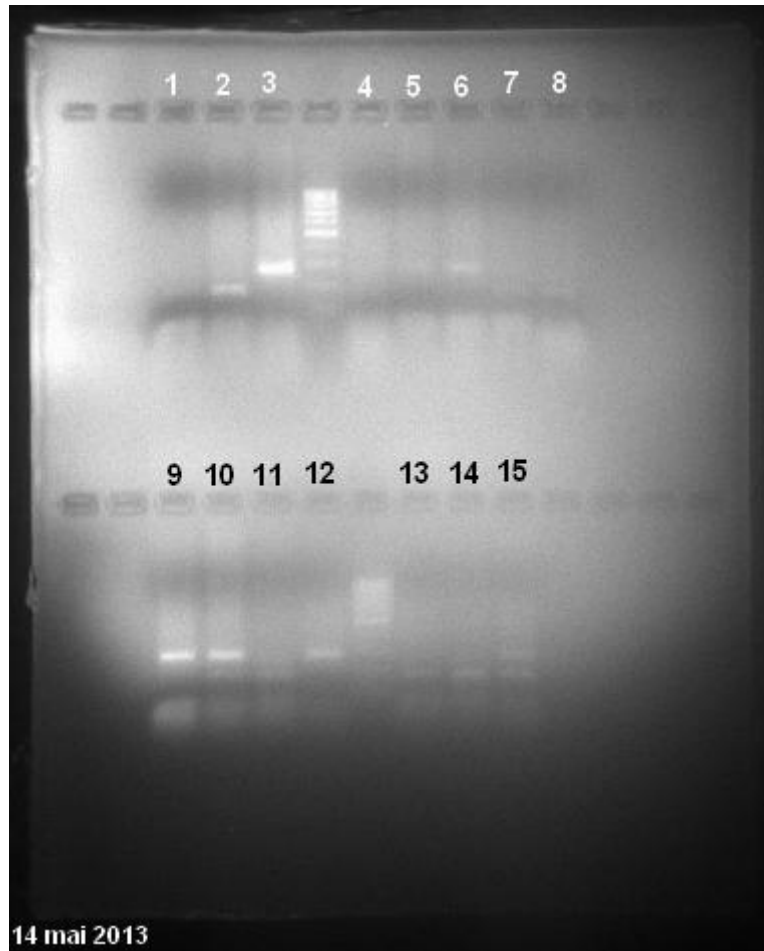
26 avril 2013			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
		2 = hL16	positif (182 pb)
		3 = hH17	négatif
		4 = hL17	négatif
		5 = hC17	négatif
		6 = hH18	positif (182 pb)
		7 = hL18	négatif
		8 = hC18	douteux
		9 = hH19	positif (182 pb)
		10 = hL19	positif (182 pb)
		t+	positif
1 = hH16	positif (182 pb)	t-	négatif



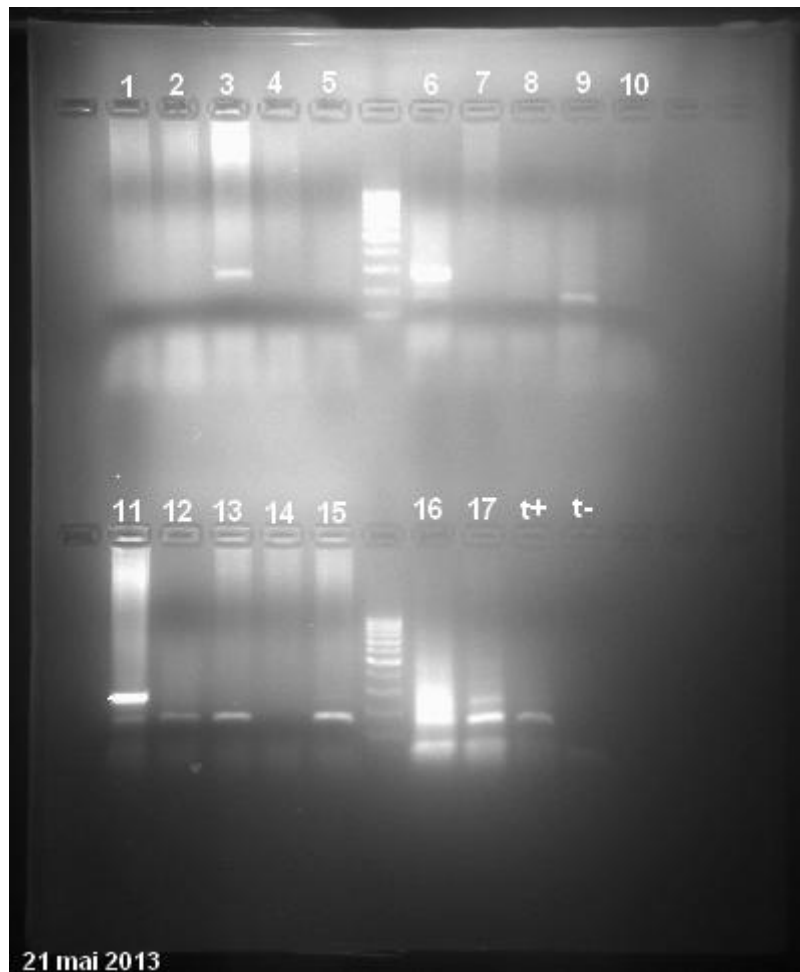
30 avril 2013			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
		2 = hL20	positif (182 et 284 pb)
		3 = hH21	positif (182 et 284 pb)
		4 = hL21	positif (182 pb)
		5 = hC21	douteux
		6 = hH22	positif (182 pb)
		7 = hL22	positif (182 pb)
		8 = hC22	positif (182 et 284 pb)
		9 = pH10	positif (182 pb)
		10 = pL10	positif (182 pb)
		t+	positif
1 = hH20	positif (182 pb)	t-	négatif



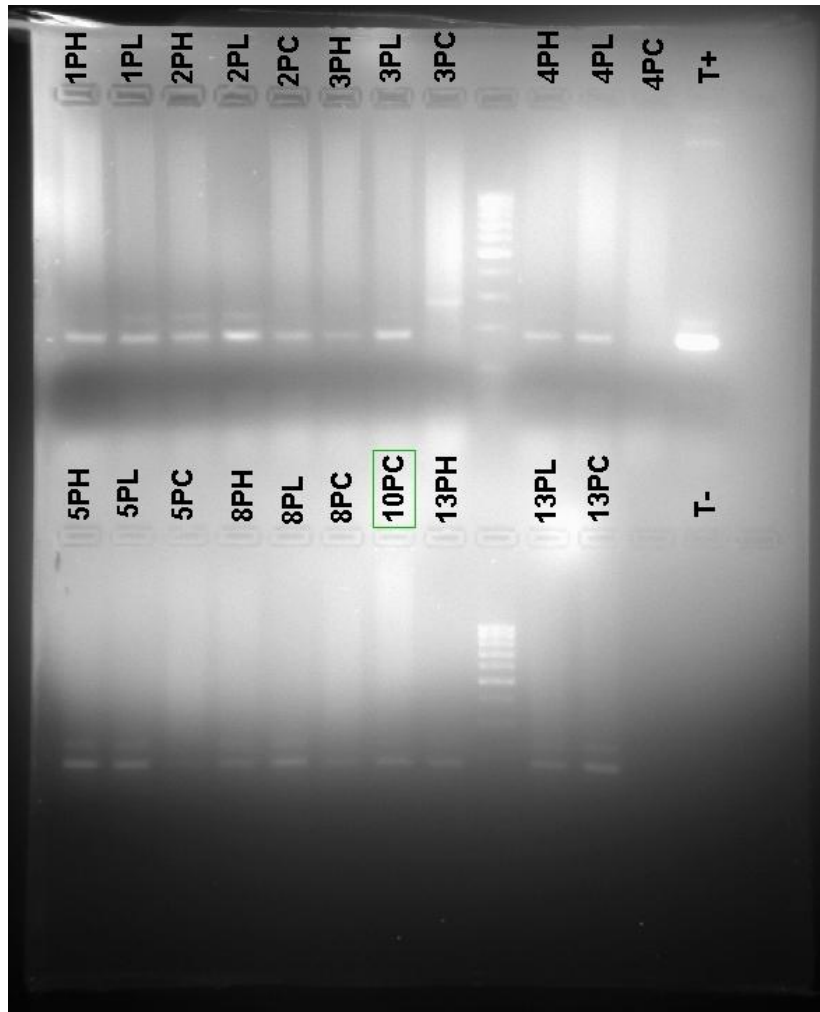
7 mai 2013			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = pH12	positif (182 et 284 pb)	8 = pL20	positif (182 et 284 pb)
2 = pL12	positif (182 et 284 pb)	9 = pH22	positif (182 et 284 pb)
3 = pC12	positif (182 et 284 pb)	10 = pL22	positif (182 et 284 pb)
4 = pH18	positif (182 et 284 pb)	11 = pC22	positif (182 et 284 pb)
5 = pL18	positif (182 et 284 pb)	t+	positif
6 = pC18	positif (182 et 284 pb)	t-	négatif
7 = pH20	positif (182 pb)		



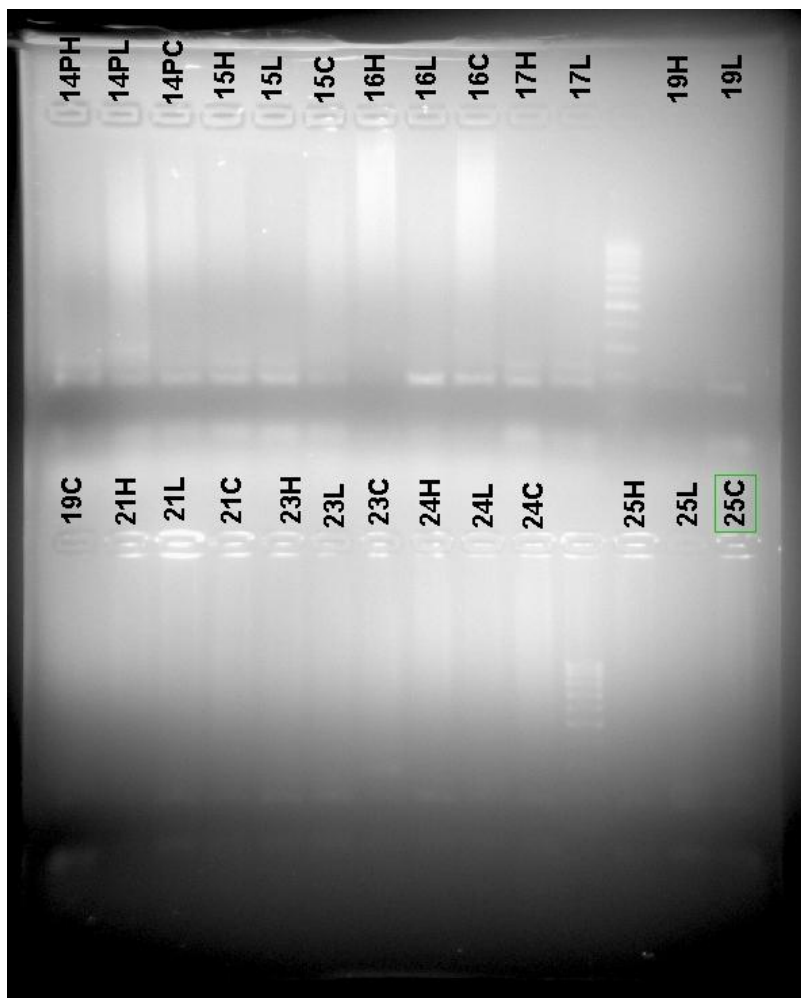
14 mai 2013			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = hH23	négatif	9 = pC7	positif (284 pb)
2 = hL23	positif (182 pb)	10 = pH9	positif (182 et 284 pb)
3 = hC23	positif (284 pb)	11 = pL9	positif (182 et 284 pb)
4 = pH6	négatif	12 = pC9	positif (284 pb)
5 = pL6	positif (284 pb)	13 = pH11	positif (182 pb)
6 = pC6	positif (284 pb)	14 = pL11	positif (182 pb)
7 = pH7	positif (182 pb)	15 = pC11	positif (182 et 284 pb)
8 = pL7	positif (182 pb)		



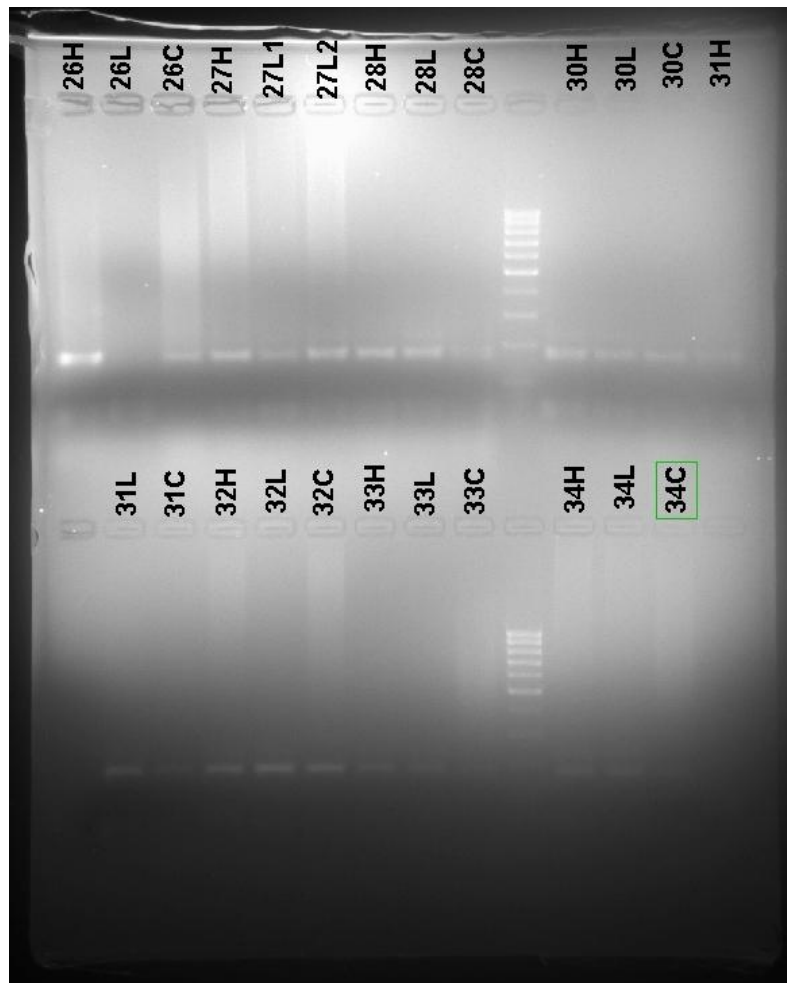
21 mai 2013			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = hH24	négatif	11 = hC27	positif (182 et 284 pb)
2 = hL24	négatif	12 = hH28	positif (182 pb)
3 = hC24	positif (284 pb)	13 = hL28	positif (182 pb)
4 = hH25	négatif	14 = hC28	négatif
5 = hL25	négatif	15 = hH29	positif (182 pb)
6 = hC25	positif (284 pb)	16 = hL29	positif (182 pb)
7 = hH26	négatif	17 = hC29	positif (182 et 284 pb)
8 = hL26	négatif	t+	positif
9 = hH27	positif (182 pb)	t-	négatif
10 = hL27	négatif		



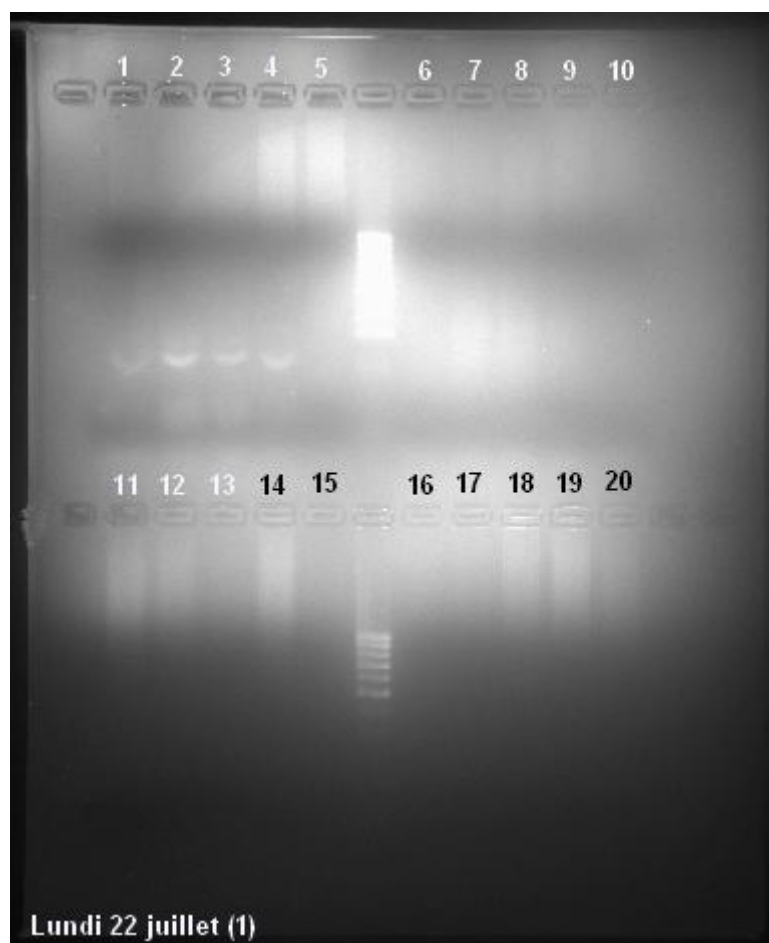
8 juillet 2013 (1)			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
pH1	positif (182pb)	pH5	positif (182 pb)
pL1	positif (182 pb)	pL5	positif (182 pb)
pH2	positif (182 pb)	pC5	positif (182 pb)
pL2	positif (182 pb)	pH8	positif (182 pb)
pC2	positif (182 pb)	pL8	positif (182 pb)
pH3	positif (182 pb)	pC8	positif (182 pb)
pL3	positif (182 pb)	pC10	positif (182 pb)
pC3	positif (284 pb)	pH13	positif (182 pb)
pH4	positif (182 pb)	pL13	positif (182 pb)
pL4	positif (182 pb)	pC13	positif (182 pb)
pC4	négatif		
t+	positif (182 pb)	t-	négatif



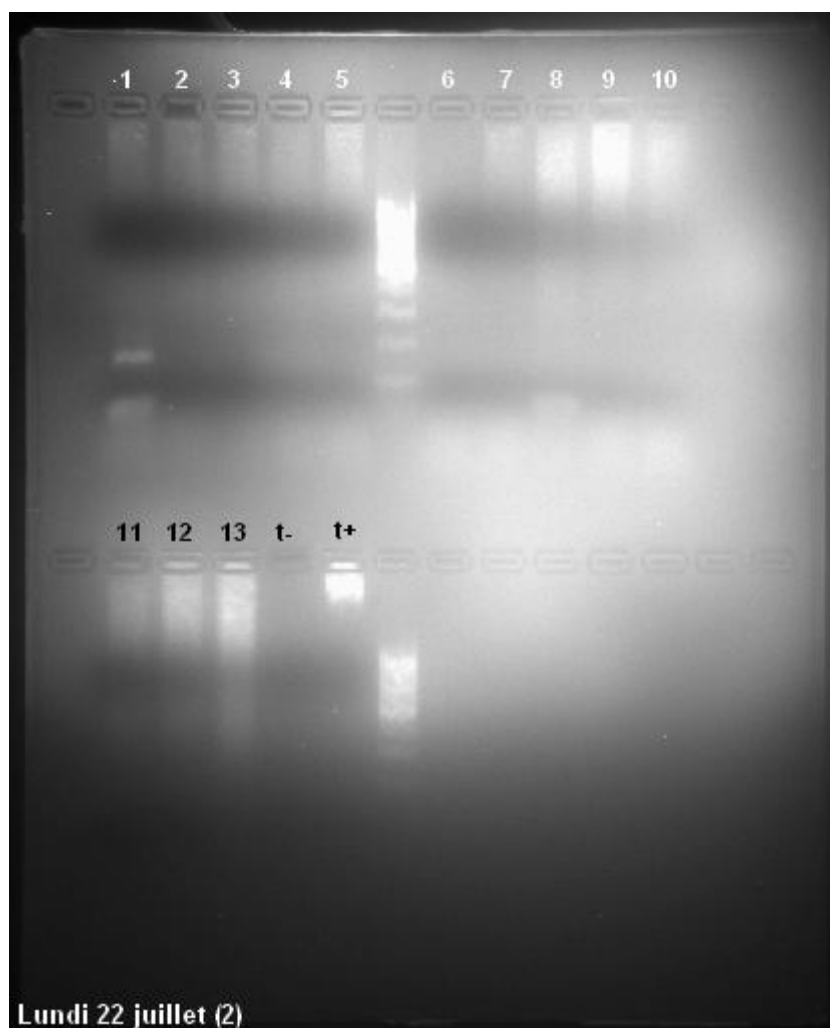
8 juillet 2013 (2)			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
pH14	positif (182 pb)	pC19	positif (182 pb)
pL14	positif (182 et 284 pb)	pH21	négatif
pC14	positif (182 pb)	pL21	positif (182 pb)
pH15	positif (182 pb)	pC21	positif (182 pb)
pL15	positif (182 pb)	pH23	positif (182 pb)
pC15	positif (182 pb)	pL23	positif (182 pb)
pH16	négatif	pC23	positif (182 et 284 pb)
pL16	positif (182 pb)	pH24	positif (182 pb)
pC16	positif (182 pb)	pL24	négatif
pH17	positif (182 pb)	pC24	positif (182 pb)
pL17	positif (182 pb)	pH25	positif (182 pb)
pH19	positif (182 pb)	pL25	négatif
pL19	positif (182 pb)	pC25	positif (182 pb)



8 juillet 2013 (3)			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
pH26	positif (182 pb)	hL31	positif (182 pb)
pL26	négatif	hC31	positif (182 pb)
pC26	positif (182 pb)	hH32	positif (182 pb)
pH27	positif (182 pb)	hL32	positif (182 pb)
pL127	positif (182 pb)	hC32	positif (182 pb)
pL227	positif (182 pb)	hH33	positif (182 pb)
pH28	positif (182 pb)	hL33	positif (182 pb)
pL28	positif (182 pb)	hC33	positif (182 pb)
pC28	positif (182 pb)	hH34	positif (182 pb)
hH30	positif (182 pb)	hL34	positif (182 pb)
hL30	positif (182 pb)	hC34	positif (182 pb)
hC30	positif (182 pb)		
hH31	positif (182 pb)		



22 juillet 2013 (1)			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = hH35	positif (182pb)	11 = hC38	négatif
2 = hL35	positif (182 pb)	12 = hH39	négatif
3 = hH36	positif (182pb)	13 = hL39	négatif
4 = hL36	positif (182 et 284 pb)	14 = hC39	négatif
5 = hC36	négatif	15 = hH40	négatif
6 = hH37	négatif	16 = hL ₁ 40	négatif
7 = hL37	négatif	17 = hL ₂ 40	négatif
8 = hC37	négatif	18 = hH41	négatif
9 = hH38	négatif	19 = hL41	négatif
10 = hL38	négatif	20 = hH42	négatif



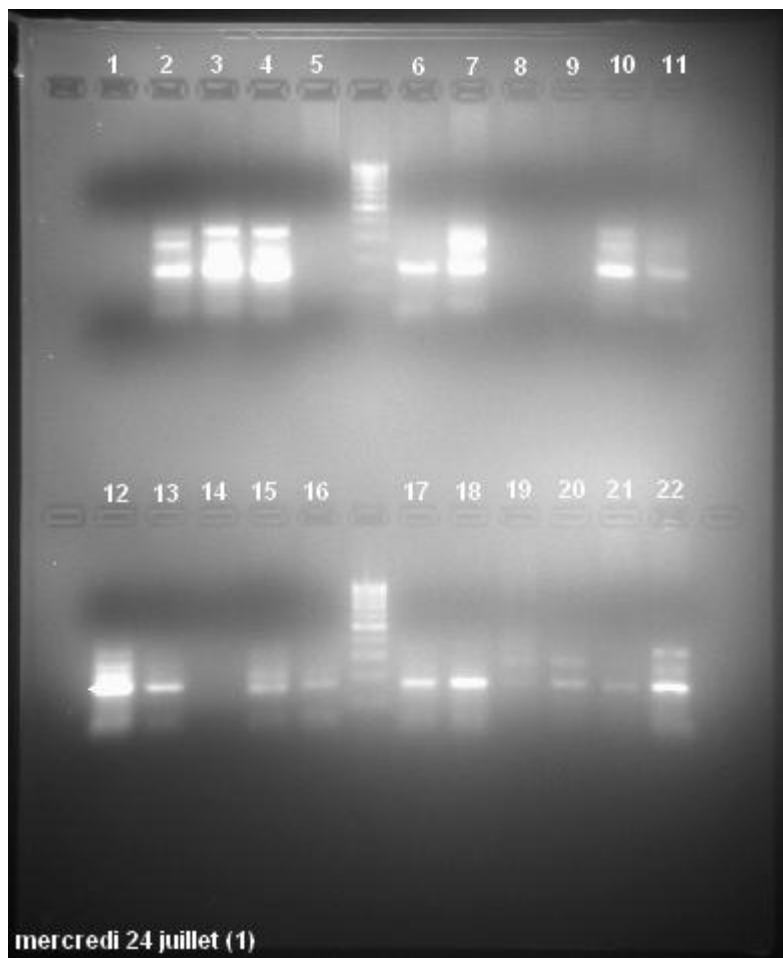
22 juillet 2013 (2)			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = hL42	positif (182pb)	11 = hH47	négatif
2 = hH43	négatif	12 = hL47	négatif
3 = hL43	négatif	13 = hC47	négatif
4 = hH44	négatif	t-	négatif
5 = hL44	négatif	t+	douteux (clone 7)
6 = hH45	négatif		
7 = hL45	négatif		
8 = hC45	négatif		
9 = hH46	négatif		
10 = hL46	négatif		



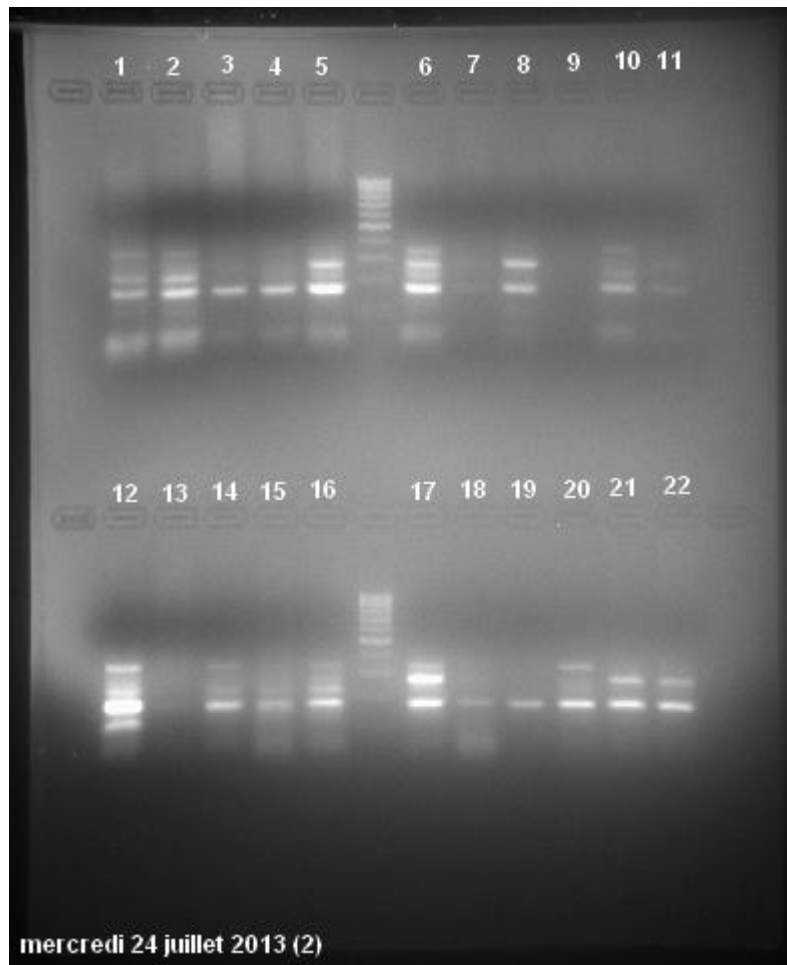
23 juillet 2013 (1)			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = tC2	positif (284pb)	11 = tC12	négatif
2 = tC3	positif (182 et 284 pb)	12 = tC13	négatif
3 = tC4	positif (284pb)	13 = tC14	positif (284pb)
4 = tC5	positif (284pb)	14 = tC15	positif (284pb)
5 = tC6	positif (284pb)	15 = tC16	positif (284pb)
6 = tC7	positif (284pb)	16 = tC17	positif (284pb)
7 = tC8	positif (284pb)	17 = tC18	positif (182 et 284 pb)
8 = tC9	positif (284pb)	18 = tC19	positif (284pb)
9 = tC10	positif (182 et 284 pb)	19 = tC20	positif (284pb)
10 = tC11	positif (182 et 284 pb)	20 = tC21	positif (182 et 284 pb)



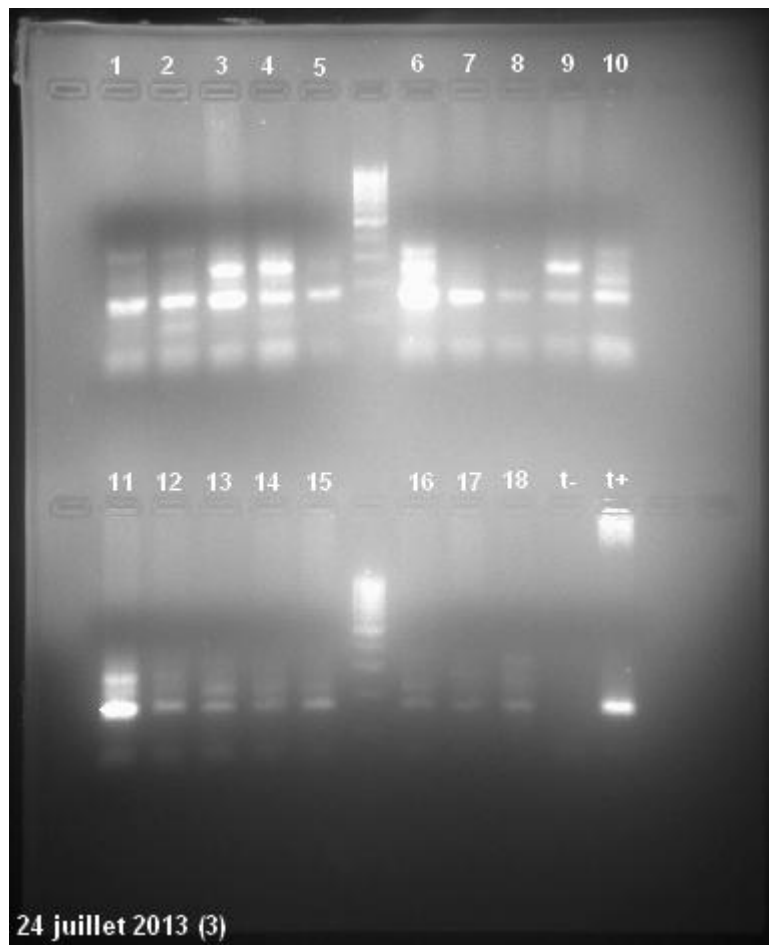
23 juillet 2013 (2)			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = tC22	positif (284 pb)	11 = tC32	positif (182 et 284 pb)
2 = tC23	positif (182 et 284 pb)	12 = tC33	positif (284 pb)
3 = tC24	positif (182 et 284 pb)	13 = tC34	négatif
4 = tC25	positif (182 et 284 pb)	t-	négatif
5 = tC26	positif (284 pb)	t+	positif
6 = tC27	négatif		
7 = tC28	positif (284 pb)		
8 = tC29	positif (284 pb)		
9 = tC30	positif (182 et 284 pb)		
10 = tC31	positif (182 et 284 pb)		



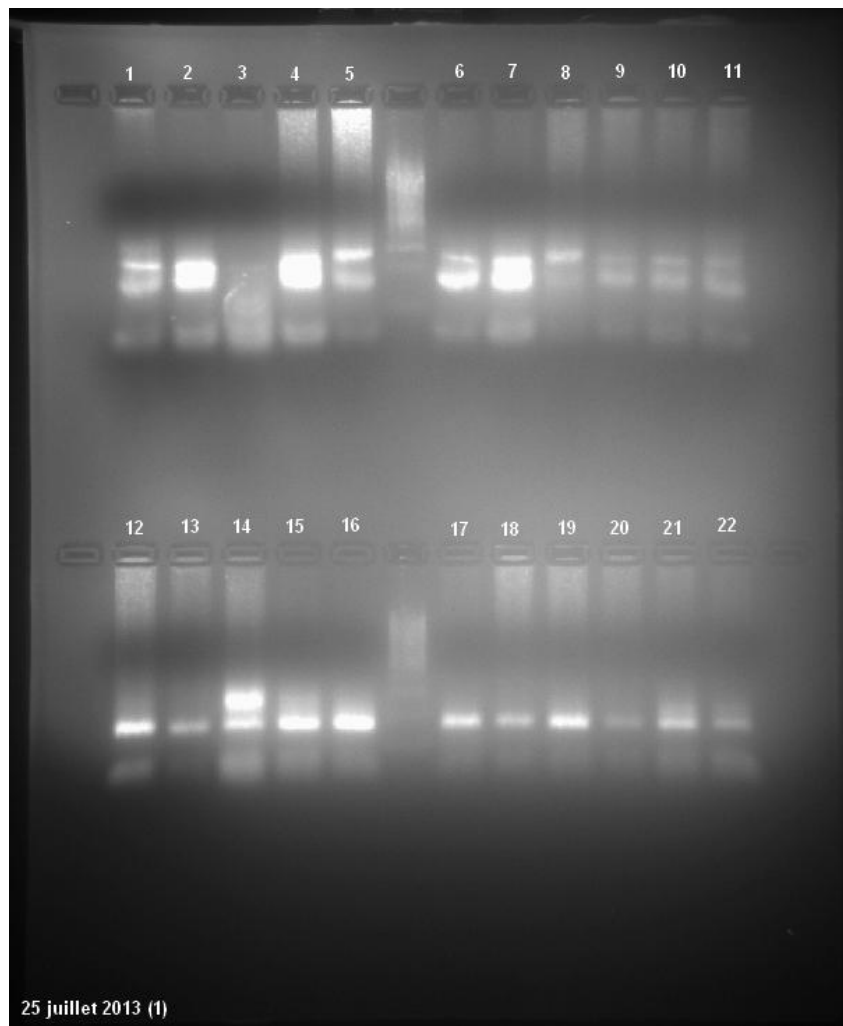
24 juillet 2013 (1)			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = tH1	négatif	12 = tL6	positif (182 et 284 pb)
2 = tL1	positif (182 et 284 pb)	13 = tH7	positif (182 pb)
3 = tH2	positif (182 et 284 pb)	14 = tL7	négatif
4 = tL2	positif (182 et 284 pb)	15 = tH8	positif (182 pb)
5 = tH3	négatif	16 = tL8	positif (182 pb)
6 = tL3	positif (182 pb)	17 = tH9	positif (182 pb)
7 = tH4	positif (182 et 284 pb)	18 = tL9	positif (182 pb)
8 = tL4	négatif	19 = tH10	positif (182 et 284 pb)
9 = tH5	négatif	20 = tL10	positif (182 et 284 pb)
10 = tL5	positif (182 et 284 pb)	21 = tH11	positif (182 pb)
11 = tH6	positif (182 pb)	22 = tL11	positif (182 et 284 pb)



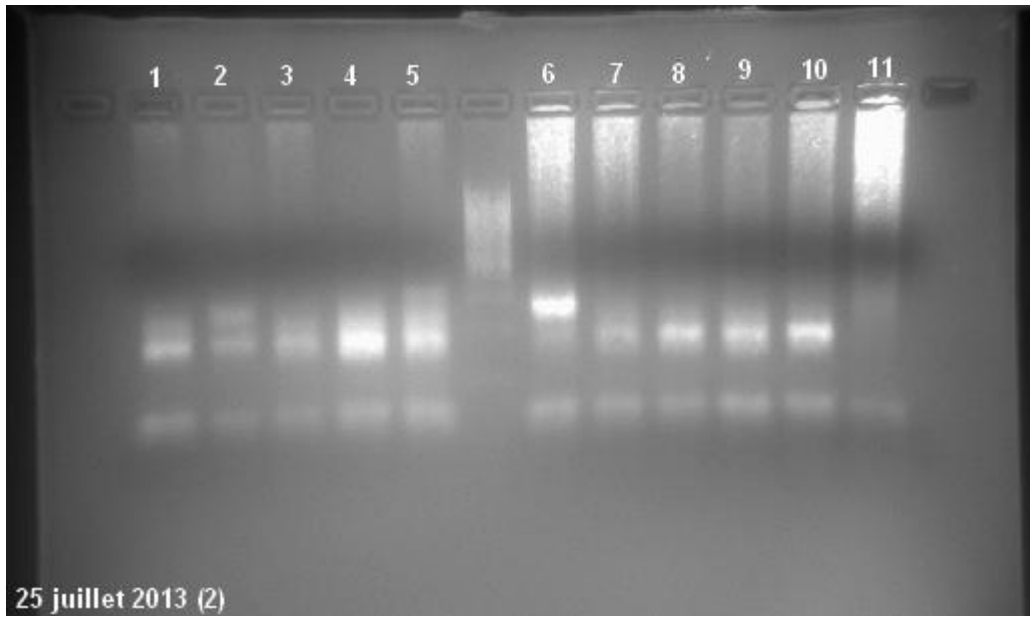
24 juillet 2013 (2)			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = tH12	positif (182 pb)	12 = tL17	positif (182 pb)
2 = tL12	positif (182 pb)	13 = tH18	positif (182 pb)
3 = tH13	positif (182 et 284 pb)	14 = tL18	positif (182 pb)
4 = tL13	positif (182 et 284 pb)	15 = tH19	positif (182 pb)
5 = tH14	positif (182 et 284 pb)	16 = tL19	positif (182 et 284 pb)
6 = tL14	positif (182 et 284 pb)	17 = tH20	positif (182 et 284 pb)
7 = tH15	positif (182 et 284 pb)	18 = tL20	positif (182 et 284 pb)
8 = tL15	positif (182 et 284 pb)	19 = tH21	positif (182 pb)
9 = tH16	négatif	20 = tL21	positif (182 pb)
10 = tL16	positif (182 pb)	21 = tH22	positif (182 et 284 pb)
11 = tH17	positif (182 et 284 pb)	22 = tL22	positif (182 et 284 pb)



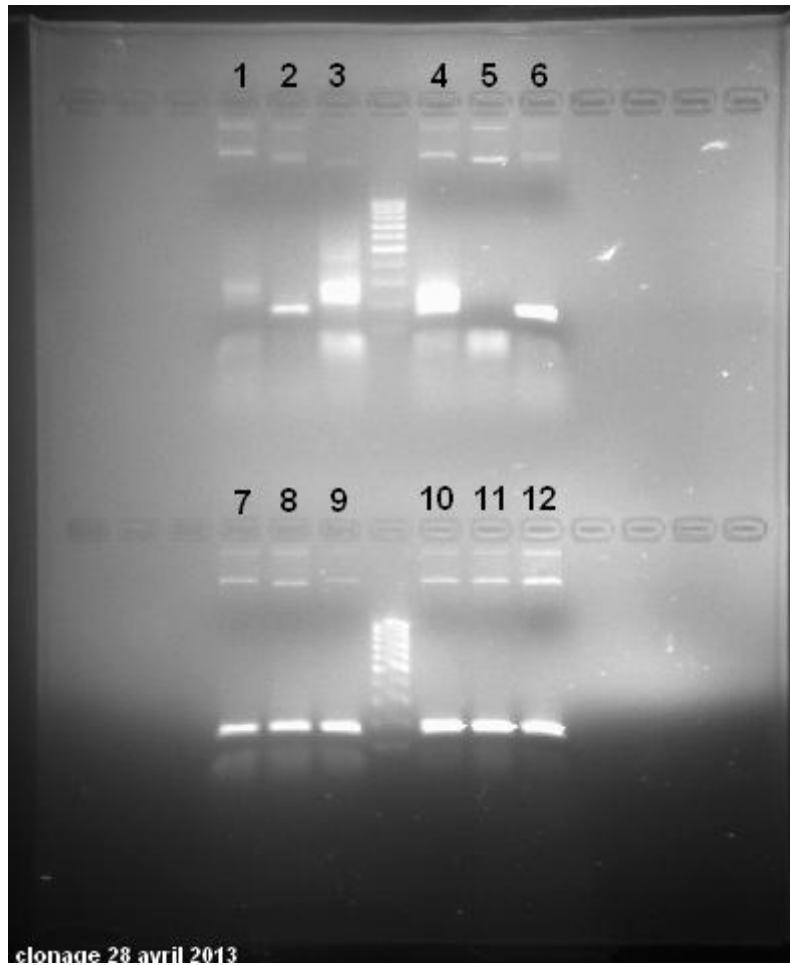
24 juillet 2013 (3)			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = tH23	positif (182 pb)	11 = tH28	positif (182 et 284 pb)
2 = tL23	positif (182 pb)	12 = tL28	positif (182 pb)
3 = tH24	positif (182 et 284 pb)	13 = tH29	positif (182 pb)
4 = tL24	positif (182 et 284 pb)	14 = tL29	positif (182 pb)
5 = tH25	positif (182 pb)	15 = tH30	positif (182 pb)
6 = tL25	positif (182 et 284 pb)	16 = tL30	positif (182 pb)
7 = tH26	positif (182 pb)	17 = tH31	positif (182 pb)
8 = tL26	positif (182 pb)	18 = tL31	positif (182 pb)
9 = tH27	positif (182 et 284 pb)	t-	négatif
10 = tL27	positif (182 pb)	t+	positif



25 juillet 2013 (1)			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
1 = hH35	positif (182pb)	12 = hH39	positif (182 pb)
2 = hL35	positif (182 pb)	13 = hL39	positif (182 pb)
3 = hH36	négatif	14 = hC39	positif (182 et 284 pb)
4 = hL36	positif (182 pb)	15 = hH40	positif (182 pb)
5 = hC36	positif (182 et 284 pb)	16 = hL ₁ 40	positif (182 pb)
6 = hH37	positif (182 pb)	17 = hL ₂ 40	positif (182 pb)
7 = hL37	positif (182 pb)	18 = hH41	positif (182 pb)
8 = hC37	positif (284 pb)	19 = hL41	positif (182 pb)
9 = hH38	positif (182 et 284 pb)	20 = hH42	positif (182 pb)
10 = hL38	positif (182 et 284 pb)	21 = hL42	positif (182 pb)
11 = hC38	positif (182 et 284 pb)	22 = hH43	positif (182 pb)



25 juillet 2013 (2)	
Echantillon	Résultat
1 = hL43	positif (182pb)
2 = hH44	positif (182 et 284 pb)
3 = hL44	positif (182pb)
4 = hH45	positif (182pb)
5 = hL45	positif (182pb)
6 = hC45	positif (182 et 284 pb)
7 = hH46	positif (182pb)
8 = hL46	positif (182pb)
9 = hH47	positif (182pb)
10 = hL47	positif (182pb)
11 = hC47	négatif



clonage 28 avril 2013

Résultats obtenus pour le clonage, le 28 avril 2013			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
Clone 1	négatif	Clone 7	positif
Clone 2	positif	Clone 8	positif
Clone 3	douteux	Clone 9	positif
Clone 4	douteux	Clone 10	positif
Clone 5	négatif	Clone 11	positif
Clone 6	positif	Clone 12	positif

Annexe 6

Données statistiques

Répartition des bovins de la population P_{ab} selon leur race et leur catégorie. (partie II-A-2)

2012	Blonde d'Aq	Charolaise	Limousine	Normande	Parthenaise	Prim'Holstein	Autres	Total
JB	18931	60087	14393	11071	3298	31340	27611	166731
Taureau	784	2842	1607	500	134	1841	1387	9095
Bœuf	220	687	338	6955	147	10623	3921	22891
Vache	18702	55277	22158	22884	4066	140762	46605	310454
Génisse	4611	11612	3707	613	489	430	6107	27569
Total Gros Bovins	43248	130505	42203	42023	8134	184996	85631	536740

BIBLIOGRAPHIE

- ACHA P.N. ; SZYFRES B., 2005 : Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux, 3ème éd., Vol 3, 399 p.
- AL-QASSAB S. ; REICHEL M.P. ; ELLIS J., 2010 : A second generation multiplex PCR for typing strains of *Neospora caninum* using six DNA targets. *Molecular and Cellular Probes*, 24, 20-26.
- 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.
- CAPPELIER J.M. ; HONORE A., 2012 : La sarcosporidiose bovine. *Le point vétérinaire : Parasitologie interne des ruminants*, 96-104.
- CARTIER P. ; MOEVI I., 2007 : Le point sur ... la qualité des carcasses et des viandes de gros bovins. collection résultats, INTERBEV, 72 p.
- CHEN L.Y. ; ZHOU B.J. ; YANG Z.Q. ; LI C.Y. ; ATTWOOD S.W. ; WANG W.L. ; LEI L. ; SUN X.D. ; ZHANG Z.X., 2007 : Effects of frozen storage on the structure of sarcocysts in pig muscle and implications in taxonomic studies. *Exp Parasitol*, 115, 393-398.
- CHIESA F. ; DALMASSO A. ; DOMENIS L. ; CIVERA T., 2011 : A Novel Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection and Identification of *Sarcocystis* spp. in Cattle. IAFP's European Symposium on Food Safety.
- DAUGSCHIES A. ; HINTZ J. ; HENNING M. ; ROMMEL M. : Growth performance, meat quality and activities of glycolytic enzymes in the blood and muscle tissue of calves infected with *Sarcocystis cruzi*. *Vet Parasitol*, 2000, 88, 7-16.
- DÉPARTEMENT ECONOMIE DE L'INSTITUT DE L'ELEVAGE, 2013 : 2012 L'année économique viande bovine Perspectives 2013. Le dossier Economie de l'Elevage, p. 80.
- DESPORTES-LIVAGE I. ; DATRY A., 2005 : Infections à microsporidies, Isospora et *Sarcocystis*. *EMC - Maladies Infectieuses* 2, 178-196.
- DMV, 2012 : Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires, 17ème éd., Les éditions du Point Vétérinaire, 2304 p.
- DUBEY J.P. ; BERGERON J.A., 1982 : *Sarcocystis* as a Cause of Placentitis and Abortion in Cattle, *Veterinary Pathology Online*, 19, 315-318.
- DUBEY J.P. ; SPEER C.A. ; FAYER R., 1988 : *Sarcocystosis of animals and man*, CRC Press, Boca Raton, 215 p.
- EUZEBY J., 1997 : Les sarcocystoses zoonosiques : des coccidioses à *Sarcocystis* à la myosite éosinophilique sarcocystique. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 90, 200-204.
- EUZEBY J., 1996 : Les sarcosporidioses bovines. *Protozooses bovines actualités annecy*, 56-58.
- EUZEBY J., 1998 : Les parasites des viandes: Epidémiologie, physiopathologie, incidences zoonosiques. *Tec & Doc*, 402 p.


- FAYER R, 2004 : *Sarcocystis* spp. in Human Infections. Clinical Microbiology reviews 17(4), 894-902.
- FAYER R. ; DUBEY J.P., 1986 : Bovine sarcocystosis. Compendium on Continuing Education for the practicing Veterinarian, 8(12), F130-F142.
- FRADIN N., 2003 : Evaluation de la fréquence et de la répartition des motifs de saisies en abattoir de ruminants et de porcs. th.med.vet. : Faculté de Médecine, ENVN, Nantes, 155p.
- FUKUYO M. ; BATTSETSEG G. ; BYAMBAA B., 2002 : Prevalence of *Sarcocystis* infection in meat-producing animals in Mongolia. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 33,490-495.
- GAJADHAR A.A. ; MARQUARDT W.C., 1992 : Ultrastructural and transmission evidence of *Sarcocystis cruzi* associated with eosinophilic myositis in cattle. Canadian Journal Veterinary Research 56, 41-46.
- GAJADHAR A.A. ; YATES W.D. ; ALLEN J.R, 1987 : Association of eosinophilic myositis with an unusual species of *Sarcocystis* in a beef cow. Can J Vet Res, 51, 373-378.
- GHISLENI G. ; ROBBA S. ; GERMANI O. ; SCANZIANI E., 2006 : Identification and prevalence of *Sarcocystis* spp. cysts in bovine canned meat. Food Control, 17(9), 691-694.
- GRANSTROM D.E ; RIDLEY R.K ; BOAN Y. ; GERSHWIN L.J. ; BRIGGS D.J., 1990 : Immunofluorescent localization of *Sarcocystis cruzi* antigens, IgG and IgE, in lesions of eosinophilic myositis in cattle. J Vet Diagn Invest, 2, 147-149.
- 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. Am J Vet Res, 50, 571-574.
- GÜCLÜ F. ; ALDEM O.S., GÜLER L., 2004, Differential identification of cattle *Sarcocystis* spp. by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR). Revue de Médecine vétérinaire, 155, 440-444.
- HONORÉ A., 2011. Etude de l'implication de *Sarcocystis* spp. dans le développement des myosites éosinophiliques chez les bovins. Th. Méd. Vét. Faculté de Médecine, Oniris : Ecole nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique, Nantes, 105p.
- HUET T. ; TURBELIN C. ; ESQUEVIN S. ; GRISONI M.-L., 2011 : BiostaTGV (On-line) - Tests statistiques en ligne . Disponible à l'adresse : <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>. Dernier accès le 2 septembre 2013.
- HUONG L.T.T., 1999 : Prevalence of *Sarcocystis* spp. in water buffaloes in Vietnam. Veterinary Parasitology, 86, 33-39.
- INTERBEV. L'activité R&D (On-line). Disponible à l'adresse : <http://www.interbev.fr/recherche-et-developpement/>. Dernier accès le 05 avril 2013.
- JEHLE C. ; DINKEL A. ; SANDER A. ; MORENT M. ; ROMIG T. ; LUC P.V. ; DE T.V. ; THAI V.V. ; 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. ; BENNETT B.W. ; COX M.F. ; HARRIS C.W. ; HOFFMANN G.A. ; TROUTMAN R.S. ; HOFF R.L. ; JONES R.L. ; COLLINS J.K. ; HAMAR W. ; CRAVANS R.L. , 1986 : Eosinophilic myositis and muscular sarcocystosis in the carcasses of slaughtered cattle and lambs. *Am J Vet Res*, 47, 587-593.
- MARY N., 2005 : La sarcosporidiose bovine: Rôle dans les lésions de myosite éosinophilique et espèces impliquées. Thèse de doctorat vétérinaire. ENVN, nantes, 83 p.
- MORE G. ; ABRAHAMOVICH P. ; JURADO S. ; BACIGALUPE D. ; MARIN J.C. ; RAMBEAUD M. ; VENTURINI L. ; VENTURINI M.C. ; 2010: Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. *Vet Parasitol*, 177, 162-165.
- ODENING K. ; STOLTE M. ; BOCKHARDT I., 1996 : On the diagnostics of *Sarcocystis* in cattle: sarcocysts of a species unusual for *Bos taurus* in a dwarf zebu. *Vet Parasitol*, 66, 19-24.
- Ono M. ; Ohsumi T., 1999 : Prevalence of *Sarcocystis* spp. cysts in Japanese and imported beef (Loin: *Musculus longissimus*). *Parasitol Int*, 48, 91-94.
- PARLEMENT EUROPÉEN, 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. In L226, Européenne, J.O.d.l.U., ed. Disponible en ligne : <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0083:0127:FR:PDF>
- RAHUMATULLAH A. ; KHOO B.Y. ; NOORDIN R., 2012 : Triplex PCR using new primers for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol*, 131, 231-238.
- SANTIN M. ; ZARLENGA D.S., 2009 : A multiplex polymerase chain reaction assay to simultaneously distinguish *Cryptosporidium* species of veterinary and public health concern in cattle. *Vet Parasitol*, 166, 32-37.
- SAVINI G. ; DUNSMORE J.D. ; ROBERTSON I.D., 1996 : Studies on pathogenesis, tissue infection and congenital transmission in cows experimentally infected with *Sarcocystis cruzi* by various routes. *Vet Parasitol*, 64, 319-327.
- SAVINI G. ; DUNSMORE J.D. ; ROBERTSON I.D. ; SENEVIRATNA P., 1992 : The epidemiology of *Sarcocystis* spp. in cattle of Western Australia. *Epidemiol Infect*, 108, 107-113.
- 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. *Prev Vet Med*, 32, 35-40.
- SHI L.Z. ; ZHAO H.Y., 1987 : Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of antibodies against *Sarcocystis* spp. in naturally infected cattle in China. *Vet Parasitol*, 24, 185-194.
- TENTER A.M., 1995 : Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *International Journal for Parasitology Australian Society for Parasitology Proceedings of the Scientific Meeting*, 25, 1311-1330.
- VALINEZHAD A. ; ORYAN A. ; AHMADI N., 2008 : *Sarcocystis* and its complications in camels (*Camelus dromedarius*) of eastern provinces of Iran. *Korean J Parasitol*, 46, 229-234.

- VANGEEL L. ; HOUF K. ; CHIERS K. ; VERCRUYSSSE J. ; D'HERDE K. ; DUCATELLE R., 2007: Molecular-based identification of *Sarcocystis hominis* in Belgian minced beef. *J Food Prot*, 70, 1523-1526.
- VANGEEL L. ; HOUF K. ; GELDHOF P. ; NOLLET H. ; VERCRUYSSSE J. ; DUCATELLE R. ; CHIERS K., 2011 : Intramuscular inoculation of cattle with *Sarcocystis* antigen results in focal eosinophilic myositis. *Vet Parasitol*, 183, 224-230.
- VERCRUYSSSE J. ; FRANSEN J. ; VAN GOUBERGEN M., 1989 : The prevalence and identity of *Sarcocystis* cysts in cattle in Belgium. *J. Vet. Med*, B 36, 148-153.
- WOUDA W. ; SNOEP J.J. ; DUBEY J.P., 2006 : Eosinophilic myositis due to *Sarcocystis hominis* in a beef cow. *J Comp Pathol*, 135, 249-253.
- XIANG Z. ; CHEN X. ; YANG L. ; HE Y. ; JIANG R. ; ROSENTHAL B.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. *Parasitol Int*, 58, 293-296.
- XIANG Z. ; HE Y. ; ZHAO H. ; ROSENTHAL B.M. ; DUNAMS D.B. ; LI X. ; ZUO Y. ; FENG G. ; CUI L. ; YANG Z., 2010 : *Sarcocystis cruzi*: comparative studies confirm natural infections of buffaloes. *Exp Parasitol*, 127, 460-466.
- YAN W. ; WANG W. ; WANG T. ; SUO X. ; QIAN W. ; WANG S. ; FAN D., 2013 : Simultaneous identification of three highly pathogenic *Eimeria* species in rabbits using a multiplex PCR diagnostic assay based on ITS1-5.8S rRNA-ITS2 fragments. *Vet Parasitol*, 193, 284-288.
- 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. *Exp Parasitol*, 102, 212-217.
- YANG Z.Q. ; ZUO Y.X. ; YAO Y.G. ; CHEN X.W. ; YANG G.C. ; ZHANG Y.P., 2001 : Analysis of the 18S rRNA genes of *Sarcocystis* species suggests that the morphologically similar organisms from cattle and water buffalo should be considered the same species. *Mol Biochem Parasitol*, 115, 283-288.

Vu: **Le Professeur Rapporteur**

De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes
Atlantique ONIRIS
Professeur

J.-M. Cappelaere


Vu: **Le Directeur Général**

De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Nantes Atlantique ONIRIS
P. SAI



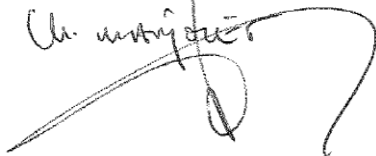
Et par délégation
Professeur H. POULIQUEN

Nantes, le 07.10.2013

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

Pr Hervé POULIQUEN
Directeur du Service des formations vétérinaires

Vu: **Le Président de la Thèse**
Professeur

Ch. Mignot


Vu: **Le Doyen de la Faculté de
Médecine de Nantes**
Professeur J.-M. ROGEZ

Vu et permis d'imprimer

NOM : BERTIN

Prénom : Marie

MYOSITE EOSINOPHILIQUE ET SARCOSPORIDIOSE BOVINE : IMPLICATION DES DIFFERENTES
ESPECES DE *SARCOCYSTIS SPP.*

EOSINOPHILIC MYOSITIS AND BOVINE SARCOPORIDIOSIS : IMPLICATION OF THE
DIFFERENT SPECIES OF *SARCOCYSTIS SPP.*

RESUME

Une exploration approfondie des causes de myosite éosinophilique est nécessaire devant l'augmentation du nombre de carcasses saisies. Cette étude a pour objectif de comprendre l'implication de *Sarcocystis* spp. Elle a été conduite sur 75 bovins saisis et une trentaine de témoins, à l'aide d'une PCR multiplex et de l'histologie. Si la prévalence de la sarcosporidiose est proche de 100 % chez tous les bovins, *S. hominis* a une prévalence de 83 % chez les animaux saisis pour myosite éosinophilique et de 45 % chez les témoins. *S. hominis* est donc plus prévalent chez les animaux saisis que chez les animaux témoins. Le myocarde est un site électif de *S. cruzi*.

MOTS-CLES

Bovin, sarcosporidiose, *Sarcocystis*, parasite, myosite éosinophilique, prévalence, histologie, réaction de polymérisation

SUMMARY

Due to the increasing number of eosinophilic myositis in slaughtered cattle, origins of this lesion have to be explored. The aim of this study was to understand the involvement of *Sarcocystis* spp. Seventy-five seized cattle and approximately thirty control cattle were tested by multiplex PCR and histology. While a 100 % sarcosporidiosis prevalence was recorded in cattle, *S. hominis* prevalence, in cattle with eosinophilic myositis, was 83 % instead of 45 % in control group. *S. hominis* has been shown to be more prevalent in seized group than in control group. *S. cruzi* targets mainly the myocard.

KEY WORDS

Cattle, sarcosporidiosis, *Sarcocystis*, parasite, eosinophilic myositis, prevalence, histology, polymerisation reaction

JURY

Monsieur Jean-Michel CAPPELIER, Maître de Conférences à ONIRIS-Nantes

Madame Catherine MAGRAS, Professeur à ONIRIS-Nantes

Monsieur Christophe CHARTIER, Professeur à ONIRIS-Nantes

ADRESSE DE L'AUTEUR

60 impasse DEVILLIE

42 153 RIORGES