

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

ANNEE 2014

**MYOSITE EOSINOPHILIQUE ET SARCOSPORIDIOSE
BOVINE :
ETUDE CIBLEE CHEZ LA BLONDE D'AQUITAINE**

THESE
pour le
diplôme d'Etat
de
DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement
le 17 octobre 2014
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Dimitri, François, Michel LEMIEUX

Né le 10 Mars 1989 à Caen (14)

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 : Monsieur Albert AGOULON
Maître de Conférences à Oniris-Nantes

Membre Invité : Monsieur Nicolas OUDOT
Vétérinaire conseil - Bovi-Loire (Angers)

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

ANNEE 2014

**MYOSITE EOSINOPHILIQUE ET SARCOSPORIDIOSE
BOVINE :
ETUDE CIBLEE CHEZ LA BLONDE D'AQUITAINE**

THESE
pour le
diplôme d'Etat
de
DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement
le 17 octobre 2014
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Dimitri, François, Michel LEMIEUX

Né le 10 Mars 1989 à Caen (14)

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 : Monsieur Albert AGOULON
Maître de Conférences à Oniris-Nantes

Membre Invité : Monsieur Nicolas OUDOT
Vétérinaire conseil - Bovi-Loire (Angers)

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 (Pr)
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 CAPPELIER (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)
ZOOTECNIE, 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 TOUZOT-JOURDE 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 CHOQUIN (MC)	Marion FUSELLIER (MC) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Odile SENECAAT (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 CARIOU (MC) Philippe COURCOUX (MC) El Mostafa QANNARI (Pr)	Michel SEMENOU (MC) Chantal THORIN (PCEA) Evelyne VIGNEAU (Pr)
ECONOMIE – GESTION - COMMUNICATION	Pascal BARILLOT (MC) Yvan DUFEU (MC) Marie-Josée LORRAIN (MC) 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 :

LEMIEUX, D. (2014). Myosite éosinophilique et sarcosporidiose bovine : étude ciblée chez la blonde d'aquitaine. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine de Nantes. Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique. 140 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 au service de Parasitologie à la Faculté de Médecine de Nantes,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Monsieur Jean-Michel CAPPELIER,
Maître de Conférences au service d'Hygiène et Qualité des Aliments à ONIRIS,
Pour m'avoir fait l'honneur d'encadrer cette étude, pour tous vos conseils, votre disponibilité et votre sympathie,
Sincères remerciements.

A Monsieur Albert AGOULON,
Maître de Conférences au service de Parasitologie – Aquaculture – Faune Sauvage à ONIRIS,
Pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse, pour tous vos conseils,
Sincères remerciements.

A Monsieur Nicolas OUDOT,
Docteur vétérinaire Conseil à BOVI-LOIRE,
Pour ton implication et ta disponibilité tout au long de cette étude, tes explications et ta sympathie,
Sincères remerciements.

A toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail,

**A Monsieur Philippe TESSERAU,
Directeur de BOVI-LOIRE,
*Pour avoir été l'investigateur de cette étude,
Hommages respectueux.***

**A Monsieur Albert ROSSERO,
Ingénieur de Recherche à ONIRIS,
*Pour tous vos conseils techniques et votre aide tout au long de cette étude,
Sincères remerciements.***

**A Madame Chantal THORIN,
Professeur Certifié d'Enseignement Agricole, département de Statistiques à ONIRIS,
*Pour votre disponibilité et vos conseils,
Sincères remerciements.***

**A Clémence MILLET,
Stagiaire dans l'unité UMR-INRA 1014 SECALIM,
*Pour ton entière implication, ton aide, ton perfectionnisme et pour tous nos fous rires,
Remerciements chaleureux.***

**Au groupe d'étudiants de 3^{ème} année de l'ESA,
*Pour votre intérêt pour le sujet, votre implication tout au long de l'étude et votre disponibilité,
Sincères remerciements.***

**A toute l'équipe de l'unité UMR-INRA 1014 SECALIM, en particulier à Justine, Isabelle, Vicky
et Ramila,
*Pour votre accueil, votre disponibilité et votre joie de vivre,
Remerciements chaleureux.***

**Aux éleveurs ayant répondu aux questionnaires,
*Pour leur disponibilité et leur intérêt pour cette étude,
Sincères remerciements.***

A ma famille,

A mes parents,

Parce que sans vous je ne serais pas là.

Pour l'éducation que m'avez donnée, pour tous les sacrifices que vous avez faits, pour les valeurs que vous m'avez transmises, pour votre éternel soutien et pour votre amour, je ne pourrai jamais suffisamment vous remercier. Je suis fier d'être votre fils et je vous aime de tout mon cœur.

A Romain, mon frère,

Pour notre enfance et pour tous les bons moments passés ensemble.

Sache que je serai toujours là pour toi.

A mes grands-parents, mes oncles, mes tantes, ma marraine, mes cousins, mes cousines...

Pour votre amour et votre soutien.

A la famille Heily,

Pour m'avoir si bien accueilli parmi vous.

A Viviane,

Pour le soutien et le réconfort dans les moments difficiles, pour toujours croire en moi et pour ton amour qui, chaque jour, m'apporte tant. C'est à tes côtés que je veux passer le reste de mes jours. Je t'aime.

A mes amis,

A J-B et Tim,

Pour ces 5 belles années, depuis les TD groupe 3 à la 4A, en passant par les après-midi au foyer ou à l'imprimerie, pour les douves et les puces, pour la plongée, l'Italiaaa (et Firenze), la bière d'urgence, le kikikikiiiiii, pour m'avoir hébergé, pour avoir toujours été là pour moi, pour ce que vous êtes et ce que vous représentez pour moi.

A Sonia, ma petite Kaazie,

Pour nos nuits de révision, ton super cheese-cake, pour avoir été une si bonne coloc et pour être une amie extraordinaire. J'espère qu'on pourra un jour mettre notre projet « repas pâtes » en application, pourquoi pas devant un n-ième Super Boooowl ! Et sinon, c'est quoi un cheval fourbe ??

A Maguy, the Frisco Girl,

Pour le merveilleux « fake-couple » à Monaco, pour avoir colonisé mon duvet et même ma chambre, et surtout, par monts et par vaux, pour être toujours là. Le tour de l'Irlande en mode sac à dos ça te tente toujours ? Même si tu vas au fin fond de l'Aveyron, je sais que nous nous reverrons !

A Lafond,

Pour être un si bon ami depuis nos années Clémenceau, pour tous tes cocktails plus ou moins saugrenus, pour nos portes salooniennes et tous les bons moments passés. A bientôt en terres Normandes.

Aux Roussel, Juliette et Seb,

Pour nos balades avec les chiens, les footings à 20 km/h, pour les « Juliette tu nous fais quoi à manger ? », les soirées coupe du monde (et les diabolo-violette). A très bientôt vous deux !

A Juliette D-M,

Pour la personne que tu es et pour notre amitié qui m'est chère. On se voit sur le périph ?

A Seb, mon normand préféré,

Parce que sans toi la promo n'aurait pas été la même, pour ton rire toujours plus communicatif, et pour ton amitié.

A Elgaz,

Pour avoir été co-fondatrice du Saloon et pour avoir déniché la demeure.

A Olivier et Sarah Raoux,

Olivier, pour avoir été le premier à me mettre un stéthoscope sur les oreilles,

Sarah, pour avoir été une maître de stage formidable,

Vous deux, pour m'avoir hébergé pendant plusieurs semaines dans la joie et la bonne humeur !

A tous les parrains Kro-Boys / DSK, Fritz, Nora, Mathiaud, Agathe, Léna, Beubeu, Lorna, Roudoudou, Héloïse, Raphoux, Max, Damien, Cédric, Blanche, Fouffe, Flo, Nico, Eve, Elsa, Fanny, Sarah, Anaïs, Caro, Bérengère.

J'ai été ravi de pouvoir vivre avec vous tous ces poulottages aussi riches les uns que les autres. Ya pas à dire, c'est vraiment la meilleure semaine de l'année ! J'espère qu'on aura l'occasion de se revoir et d'enfin réussir à monter un char !

A toute la promo d'ENVer,

Parce que vous m'avez fait rêver et que j'ai adoré partager ces 5 années avec vous. Vous allez me manquer.

A tous mes poulots, en particulier Nif, Bubuche, Jerem, Paulo, Rozenn, Pasta, Tzatziki, Pyro, La Douve, Caro Salle, Bukaké, Caro, Lucky, Jeanna, Marielle, Elsa, Myriam, Léa, SMS, Debuigny ma poulotte d'adoption, et tous les autres,

Vous avez été magiques !! Si vous avez besoin d'un stage, n'hésitez pas ;)

A très bientôt je l'espère.

Au Saloon, A la Ruche et A la Cucaracha, les meilleures colocs du monde !

A tous les autres, qui ont croisé ma route au cours d'une pause-café, d'une aprèm, d'une sortie plongée, d'une virée en J80, d'une soirée... notamment Camille la Frillouille, Borias, Justine, Jwinnie, Méléna, Manuel, Bérénice, Maude, Bastien, Grobine, MA7, Anita, Jeanne et Jeanne, Flo, Meg-anne, Benouz, Mélanie et Caro, Ptit Ronan, Alizée, La Bac, Hascoët, Mitch, Violaine, Francis, Aziliz...et tous les autres...

Je quitte cette école avec des souvenirs plein la tête, merci à tous pour ces 5 merveilleuses années !

A Anne-lise, ma co-colleuse Forever,

Parce que sans toi la prépa et les colles n'auraient pas été les mêmes. Pour notre complicité, nos TP physiques dans ta cuisine, pour les cailloux et les abricots, et pour notre amitié. A très vite.

A Rafiki,

Pour ta bienveillance, tes passions gastronomiques, pour tes idées parfois tordues. Tu es un ami formidable. Que ce soit en France ou aux Etats-Unis, à bientôt autour d'une bonne bière.

A mes amis de Caen, Alex, Guigui, Audrey, Solène, Simon,

Pour avoir toujours été là pour moi depuis nos années lycées. J'espère que nos routes se croiseront à nouveau.

A mes amis de prépa,

Parce que malgré quelques périodes un peu difficiles, on a passé de très bons moments ensemble et j'en garde de très beaux souvenirs.

TABLES DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	18
LISTE DES TABLEAUX	20
LISTE DES ANNEXES	22
LISTE DES ABREVIATIONS	23
INTRODUCTION	25
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	27
1. CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET BIOLOGIQUES DE <i>SARCOCYSTIS SPP.</i>	29
1.1. Taxinomie.....	29
1.2. Cycle évolutif	29
1.2.1. Chez l'hôte intermédiaire	30
1.2.2. Chez l'hôte définitif.....	31
1.3. Morphologie	31
1.3.1. Chez l'hôte intermédiaire	31
1.3.1.1. A l'œil nu.....	31
1.3.1.2. En microscopie optique	32
1.3.1.3. En microscopie électronique	33
1.3.2. Chez l'hôte définitif.....	35
2. ETUDE CLINIQUE	35
2.1. Chez les bovins.....	35
2.1.1. Signes cliniques	35
2.1.2. Diagnostic.....	36
2.1.2.1. Diagnostic du vivant de l'animal.....	36
2.1.2.2. Diagnostic <i>post-mortem</i>	37
2.1.3. Traitement	39
2.2. Chez l'hôte définitif.....	39
2.2.1. Chez l'homme	39
2.2.1.1. Signes cliniques	39
2.2.1.2. Diagnostic.....	40
2.2.1.3. Traitement.....	40
2.2.2. Chez les carnivores.....	40
3. PATHOGENIE ET IMMUNITE	40
3.1. Pathogénie	40
3.2. Immunité	41
3.2.1. Chez l'hôte intermédiaire	41

3.2.2.	Chez l'hôte définitif.....	41
4.	LESIONS CHEZ LES BOVINS.....	42
4.1.	Description des lésions de myosite éosinophile	42
4.1.1.	Macroscopiquement	42
4.1.2.	Microscopiquement	43
4.2.	Pathogénie des myosites éosinophiles.....	44
5.	IMPORTANCE DE LA SARCOSPORIDIOSE	45
5.1.	Prévalence	45
5.2.	Epidémiologie	48
5.3.	Impact économique	49
5.3.1.	Les pertes dues aux saisies d'abattoirs	49
5.3.2.	Les pertes dues à la maladie	49
6.	MOYEN DE LUTTE.....	50
6.1.	Chez l'hôte définitif.....	50
6.2.	Chez l'hôte intermédiaire	50

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE..... 53

1.	CADRE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	55
2.	MATERIELS ET METHODES.....	55
2.1.	Etude de population.....	55
2.1.1.	Caractéristiques des bovins de race Blonde d'Aquitaine saisis pour myosite éosinophile	55
2.1.2.	Comparaison des bovins saisis de race Blonde d'Aquitaine à des bovins saisis de race Charolaise.....	57
2.2.	Analyse biomoléculaire.....	57
2.2.1.	Echantillonnage	57
2.2.2.	Digestion enzymatique des échantillons.....	58
2.2.3.	Extraction de l'ADN.....	59
2.2.4.	PCR Multiplex et électrophorèse.....	59
2.2.5.	Interprétation des résultats et étude statistique	60
2.3.	Etude de la conduite d'élevage.....	61
2.3.1.	Questionnaire d'enquête	61
2.3.2.	Population d'étude.....	62
2.3.3.	Organisation de la base de données et étude statistique	63
3.	RESULTATS.....	65
3.1.	Etude de population.....	65
3.1.1.	Caractéristiques des bovins de race Blonde d'Aquitaine saisis pour myosite éosinophile	65
3.1.1.1.	Type de saisie	65

3.1.1.2.	Age	66
3.1.1.3.	Poids de carcasse	67
3.1.1.4.	Conformation.....	68
3.1.2.	Comparaison des bovins Blonde d'Aquitaine et Charolais saisis pour myosite éosinophilique	70
3.1.2.1.	Type de saisies.....	71
3.1.2.2.	Age	72
3.1.2.3.	Poids de carcasse	73
3.1.2.4.	Conformation.....	74
3.2.	Analyses biomoléculaires.....	76
3.2.1.	Prévalence de la sarcosporidiose	76
3.2.1.1.	Prévalence de <i>Sarcocystis spp.</i>	76
3.2.1.2.	Prévalence par espèce.....	76
3.2.1.3.	Prévalence selon le muscle étudié	77
3.2.2.	Relation entre myosite éosinophilique et sarcosporidiose.....	78
3.2.2.1.	Impact de <i>Sarcocystis spp.</i>	78
3.2.2.2.	Impact des différentes espèces de <i>Sarcocystis</i>	79
3.2.3.	Observation par élevage	82
3.3.	Etude de la conduite d'élevage.....	84
3.3.1.	Description de la population.....	84
3.3.2.	Analyse uni-variée.....	85
3.3.3.	Analyse bi-variée des populations «Cas/Témoins» et «Récidivistes/Témoins»	86
3.3.4.	Analyse multivariée.....	93
3.3.4.1.	Régression logistique.....	94
3.3.4.2.	Validité du modèle linéaire complet.....	95
3.3.4.3.	Comparaison des modèles linéaires complet et simplifié.....	97
4.	DISCUSSION	99
4.1.	Caractéristiques des populations d'étude	99
4.1.1.	Caractéristiques des animaux saisis pour myosite éosinophilique	99
4.1.2.	Prédisposition de la race Blonde d'Aquitaine au développement de myosite éosinophilique	99
4.1.3.	Collecte des échantillons d'analyse par PCR	100
4.1.4.	Recrutement des élevages et réponse aux questionnaires	100
4.2.	Technique d'analyse des échantillons par PCR Multiplex	101
4.3.	Prévalence de la sarcosporidiose	101
4.3.1.	Prévalence de <i>Sarcocystis spp.</i>	101
4.3.2.	Prévalence des différentes espèces de <i>Sarcocystis</i>	102
4.4.	Apparition des lésions de myosite éosinophilique	103
4.4.1.	Selon le parasitisme à <i>Sarcocystis</i>	103

4.4.2. Selon les conditions d'élevage	103
CONCLUSION.....	105
ANNEXES.....	107
BIBLIOGRAPHIE	132

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma du cycle évolutif des espèces de <i>Sarcocystis</i> infectant les bovins (Cappelier et Honoré, 2012).....	30
Figure 2 : Observation macroscopique de kyste sarcosporidien dans un muscle de l'épaule d'un bovin (Nicolas OUDOT, BOVILOIRE, 2012).....	32
Figure 3 : Coupe transversale de sarcocystes de <i>S. hominis</i> au microscope électronique à transmission, montrant des septa traversant le sarcocyste (Wouda et al., 2006)	34
Figure 4 : Observation de bradyzoïtes au microscope à contraste interférentiel de bradyzoïtes de <i>S. cruzi</i> (grossissement x 1000) (Fayer, 2004).....	34
Figure 5 : Ookyste de <i>S. cruzi</i> , contenant 2 sporocystes, isolé à partir de fèces de chien (Xiang et al., 2011) (observation au microscope optique x 400).....	35
Figure 6 : Observation d'une lésion diffuse de myosite éosinophilique dans un muscle de bovin (Cappelier et Honoré, 2012).....	42
Figure 7 : Lésions multifocales de myosite éosinophilique, avec centre suppuré, sur une section de muscle de bovin (Wouda et al., 2006)	43
Figure 8 : Lésion microscopique d'un granulome éosinophilique dans un muscle de bovin (Vangeel et al., 2013)	44
Figure 9 : Schéma d'explication de l'interprétation d'une boîte de dispersion	56
Figure 10 : Gel d'électrophorèse de la PCR 10 avec sa grille de lecture	60
Figure 11 : Répartition des types de saisies en fonction de la catégorie de bovins	66
Figure 12 : Boîte de dispersion de l'âge à l'abattage des vaches dans les populations Pabattus et Psaisis.....	66
Figure 13 : Boîte de dispersion de l'âge à l'abattage des génisses dans les populations Pabattus et Psaisis.....	67
Figure 14 : Boîte de dispersion du poids de carcasse des vaches dans les populations Pabattus et Psaisis.....	67
Figure 15 : Boîte de dispersion du poids de carcasse des génisses dans les populations Pabattus et Psaisis.....	68
Figure 16 : Répartition des carcasses des vaches de Pabattus et Psaisis en fonction de leur conformation selon le classement EUROP	69
Figure 17 : Répartition des carcasses des génisses de Pabattus et Psaisis en fonction de leur conformation selon le classement EUROP	69
Figure 18 : Répartition des types de saisies dans Psaisis et Pcharosaisis	71
Figure 19 : Boîte de dispersion de l'âge à l'abattage dans les populations Psaisis et Pcharosaisis	72
Figure 20 : Boîte de dispersion de l'âge d'abattage dans les populations Pabattus et Pcharo	72
Figure 21 : Boîte de dispersion du poids de carcasse dans les populations Psaisis et Pcharosaisis	73
Figure 22 : Boîte de dispersion du poids de carcasse dans les populations Pabattus et Pcharo... ..	73
Figure 23 : Répartition des carcasses de Psaisis et Pcharosaisis en fonction de leur conformation selon le classement EUROP	74

Figure 24 : Répartition des carcasses de Pabattus et Pcharo en fonction de leur classement selon le classement EUROP.....	75
Figure 25 : Localisation des élevages Cas (Rouge) et Témoins (Bleu) ayant répondu au questionnaire (source : ZeeMaps®).....	84
Figure 26 : Répartition des élevages selon l'effectif des mères, dans les populations Cas, Récidivistes et Témoins	86
Figure 27 : Boîte de dispersion de la durée de pâturage dans les populations Cas, Récidivistes et Témoins	86
Figure 28 : Alimentation des animaux à l'engraissement dans les élevages Cas, Récidivistes et Témoins	87
Figure 29 : Différents mode d'abreuvement en stabulation et au pâturage, pour les élevages Cas, Récidivistes et Témoins.....	88
Figure 30 : Environnement à proximité des pâtures des élevages Cas, Récidivistes et Témoins .	89
Figure 31 : Situation des élevages Cas, Récidivistes et Témoins vis-à-vis de diverses maladies ..	90
Figure 32 : Pratiques vaccinales selon la catégorie d'animaux dans les élevages Cas, Récidivistes et Témoins	90
Figure 33 : Présence d'habitations à proximité de l'exploitation, dans les populations Cas, Récidivistes et Témoins.....	91
Figure 34 : Présence de certains animaux dans les élevages Cas, Récidivistes et Témoins	92
Figure 35 : Représentation graphique de l'AFM de la répartition des élevages Récidivistes (rouge) et Témoins (vert) selon les 6 variables du modèle complet.....	95
Figure 36 : Cercle des corrélations des variables explicatives introduites dans l'AFM.....	96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : les différents types de paroi de kystes de <i>Sarcocystis</i> observés au microscope optique	32
Tableau II : les différentes villosités des kystes de <i>Sarcocystis</i> observées au microscope électronique	33
Tableau III : Prévalence dans diverses régions du monde de l'infection par <i>Sarcocystis spp.</i> chez des animaux de rente (d'après Bertin, 2013)	46
Tableau IV : Prévalence de <i>Sarcocystis spp.</i> selon l'espèce de mammifère en jeu et le site musculaire étudié (Bertin, 2013)	47
Tableau V : Prévalence de <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i> selon le muscle étudié, chez les bovins (Bertin, 2013).....	47
Tableau VI : Nombre de prélèvements par catégorie de muscles (C : myocarde, L : lésion/caparaçon) en fonction de la saisie ou non de la carcasse pour myosite éosinophile	58
Tableau VII : Localisation des amorces et tailles des amplicons obtenus (Chiesa et al., 2011)....	59
Tableau VIII : Tableau regroupant les résultats de l'analyse de la prévision du modèle	64
Tableau IX : Présentation des effectifs des populations Pabattus et Psaisis et des pourcentages de saisies selon la catégorie d'animaux.....	65
Tableau X : Présentation des effectifs des populations Pabattus, Psaisis, Pcharo et Pcharosaisis et des pourcentages de saisies selon la catégorie d'animaux	70
Tableau XI : Présentation des effectifs des populations Psaisis et Pcharosaisis et des taux de saisies, en ne retenant que les vaches et les génisses	71
Tableau XII : Résultats de la PCR Multiplex pour <i>Sarcocystis spp.</i>	76
Tableau XIII : Résultats de la PCR Multiplex en fonction des espèces de <i>Sarcocystis</i> et de l'échelle d'étude	76
Tableau XIV : Résultats de la PCR Multiplex en fonction du muscle étudié, toutes espèces de <i>Sarcocystis</i> confondues	77
Tableau XV : Résultats de la PCR Multiplex en fonction du muscle étudié et des espèces de <i>Sarcocystis</i>	77
Tableau XVI : Résultats de la PCR Multiplex en fonction du muscle étudié et en séparant les infections simples et doubles.....	78
Tableau XVII : Résultats de la PCR Multiplex pour <i>Sarcocystis spp.</i> selon l'origine du prélèvement (Saisi ou Témoin).....	78
Tableau XVIII : Résultats de la PCR Multiplex en fonction de l'espèce de <i>Sarcocystis</i> chez les bovins saisis et témoins.....	79
Tableau XIX : Résultats de la PCR Multiplex en fonction de l'espèce de <i>Sarcocystis</i> pour des prélèvements issus de bovins saisis et témoins	79
Tableau XX : Résultats de la PCR Multiplex vis-à-vis d'une infection par <i>S. cruzi</i> , selon l'organe prélevé, chez les bovins saisis et témoins	80
Tableau XXI : Résultats de la PCR Multiplex, en séparant les infections simples et les infections doubles, pour les prélèvements issus de bovins saisis et témoins	80
Tableau XXII : Prévalences de <i>S. cruzi</i> et <i>S. hominis</i> dans les prélèvements saisis et témoins et prévalence attendue de l'association <i>S. cruzi</i> et <i>S. hominis</i> dans les deux populations.	81

Tableau XXIII : Résultats de la PCR Multiplex vis-à-vis d'une infection à <i>S. hominis</i> seul, selon l'organe prélevé, chez les bovins saisis et témoins	81
Tableau XXIV : Description des taux de saisies au sein de la population d'élevages cas de l'étude (à partir des données de Bovi-Loire)	84
Tableau XXV : Variables issues du questionnaire de la conduite d'élevage et exclues de l'analyse statistique pour manque de variabilité	85
Tableau XXVI : Liste des facteurs de risques identifiés lors de l'analyse bi-variée.....	94
Tableau XXVII : Variables explicatives et leurs p-value, retenues lors de la régression logistique	94
Tableau XXVIII : Classement des élevages Récidivistes et Témoins selon leur situation réelle et selon la réponse du modèle complet.....	97
Tableau XXIX : Classement des élevages Récidivistes et Témoins selon leur situation réelle et selon la réponse du modèle simplifié.....	97

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Protocole de digestion enzymatique.....	109
Annexe 2 : Protocole d'extraction d'ADN.....	110
Annexe 3 : Protocole de PCR Multiplex <i>Sarcocystis spp.</i>.....	112
Annexe 4 : Résultats des électrophorèses observées à la lumière UV	114
Annexe 5 : Questionnaire d'enquête.....	123
Annexe 6 : Matrice de corrélations des variables explicatives retenues lors de la régression logistique	131

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

AFM : Analyse Factorielle Multiple

BVD : Bovine Viral Diarrhea, ou Diarrhée Virale Bovine

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

GMQ : Gain Moyen Quotidien, souvent exprimé en kg/jour.

IBR : Infectious Bovine Rhinotracheitis, ou Rhinotrachéite Infectieuse Bovine

ICZN : International Code of Zoological Nomenclature, ou code international de nomenclature zoologique

IgE/IgG/IgM : Immunoglobuline E/G/M

ME : Myosite Eosinophilique

RAPD-PCR : Random Amplified Polymorphic DNA-PCR, ou PCR à amplification aléatoire d'ADN polymorphe

RFLP-PCR : Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR, ou PCR à polymorphisme des longueurs des fragments de restriction

pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction, ou Réaction de Polymérisation en Chaîne

TBE : Tris, Borate, EDTA

téc : tonnes équivalent carcasse

INTRODUCTION

La sarcosporidiose est une maladie parasitaire cosmopolite et touchant de nombreuses espèces animales. Elle est due à l'infection des animaux par des coccidies kystogènes du genre *Sarcocystis*. Ce parasite possède un cycle hétérodixène, faisant intervenir un hôte définitif, où il se développe dans l'intestin, et un hôte intermédiaire chez lequel il va former un kyste musculaire le plus souvent sans aucun signe clinique associé (Dubey & Lindsay, 2006). La sarcosporidiose bovine correspond à l'infection des bovins en tant qu'hôtes intermédiaires. Elle est le fait de trois espèces : *S. cruzi*, *S. hirsuta* et *S. hominis*, dont les hôtes définitifs sont respectivement les canidés, les félinés et les primates. *S. hominis* est donc un agent zoonotique, mineur, étant à l'origine d'une atteinte intestinale passant très souvent inaperçue chez l'homme.

La myosite éosinophilique est une lésion inflammatoire musculaire, cliniquement asymptomatique, caractérisée par la présence dans le muscle de plages verdâtres, de taille variable (de quelques millimètres à plusieurs centimètres de diamètre), conduisant à la saisie partielle ou totale de la carcasse concernée (Euzéby, 1998). Cette lésion, indécélable avant l'abattage de l'animal, fait partie des motifs de saisies dédommagées par le F.A.R (Fonds d'Assainissement Régional), qui rembourse alors 80% de la valeur de la carcasse saisie. Bien que l'étiologie concernant l'apparition de ces lésions soit encore méconnue, l'implication de *Sarcocystis* est fortement suspectée (Vangeel et al., 2012). Si tel est le cas, la sarcosporidiose bovine aurait alors un impact économique très important.

BOVI-LOIRE (Interprofession bovine des Pays de la Loire), représentant INTERBEV (Association Nationale Interprofessionnelle du Bétail et des Viandes) en Pays de la Loire, est garante de la qualité des produits commercialisés provenant des abattoirs des Pays de la Loire, et est chargée de gérer le F.A.R pour la région. En ce qui concerne les dossiers de remboursement, BOVI-LOIRE fait face à une constante augmentation du nombre de cas de saisies pour myosite éosinophilique. Lors de la mise en place du F.A.R en 1991, 7 dossiers ont été traités sur l'année, alors qu'en 2013, 460 saisies pour myosite éosinophilique ont fait l'objet de remboursements, représentant la somme de 722 138,41 € (données de BOVI-LOIRE). Les dossiers de saisies pour myosite éosinophilique constituent aujourd'hui la plus grande part des dossiers du F.A.R, dépassant même les dossiers pour cysticerose, représentant quant à eux 105 cas en 2013 (données de BOVI-LOIRE).

Face à une telle augmentation des saisies pour myosite éosinophilique, BOVI-LOIRE a entrepris, en collaboration avec ONIRIS, une série d'études visant à améliorer la connaissance de cette inflammation. Quatre études ont ainsi été financées par BOVI-LOIRE depuis 2005, la dernière ayant eu lieu en 2013. Les objectifs de celles-ci étaient de rechercher le rôle du parasitisme par *Sarcocystis* dans l'apparition des lésions de myosite éosinophilique, car bien que la prévalence de *Sarcocystis* chez les bovins avoisine les 100% dans la plupart des régions du monde (Dubey & Lindsay, 2006 ; Moré et al., 2013 ; Vangeel et al., 2012), l'apparition de lésions de myosite éosinophilique est relativement peu fréquente (0,08% en Pays de la Loire en 2013, données de BOVI-LOIRE). Ces différentes études, et notamment celle de Bertin en 2013, ont permis de mettre en évidence une prédisposition raciale. En effet, la race Blonde d'Aquitaine est particulièrement concernée par les lésions de myosite éosinophilique, avec un taux de saisies de près de 0,5% en 2013 contre un taux de 0,08% toutes races confondues.

Notre étude, qui s'inscrit dans la continuité de la démarche entreprise par BOVI-LOIRE, est donc ciblée sur la race Blonde d'Aquitaine. Elle a pour but principal d'approfondir les connaissances concernant l'apparition des lésions de myosite éosinophilique dans cette race. Pour y parvenir, nous nous sommes fixés les objectifs de travail suivants : rechercher les espèces de *Sarcocystis* incriminées dans les lésions, à l'aide d'une technique d'amplification moléculaire, la PCR Multiplex ; rechercher l'impact éventuel de la conduite d'élevage et de l'environnement proche des bovins dans l'apparition des lésions de myosite éosinophilique, via l'analyse d'un questionnaire d'enquête ; rechercher des éléments épidémiologiques permettant d'expliquer les prévalences aussi élevées du parasitisme par *Sarcocystis* chez les bovins, en combinant l'analyse PCR et le questionnaire d'enquête.

Première Partie :
Etude bibliographique

1. CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET BIOLOGIQUES DE SARCOCYSTIS SPP.

1.1. Taxinomie

La sarcosporidiose est une maladie parasitaire due au développement de coccidies kystogènes, *Sarcocystis spp.*, appartenant à la famille des Isosporidés, la sous-famille des Sarcocystinés et au genre *Sarcocystis* (phylum des Apicomplexa, classe des protozoaires). Ces parasites sont hétéroxènes et leur cycle de vie comprend deux hôtes. L'hôte définitif est souvent un prédateur (mammifères, oiseaux, marsupiaux...), l'hôte intermédiaire est quant à lui généralement un herbivore ou un omnivore. *Sarcocystis spp.* est un parasite qui a longtemps été réputé pour être très spécifique de ses hôtes intermédiaires. En effet, il existe souvent une spécificité d'espèces pour l'hôte intermédiaire et une spécificité plus large (d'ordre ou de famille) pour l'hôte définitif (Tenter, 1995). Cependant, il a été montré que certaines espèces de *Sarcocystis* (notamment *S. cruzi*, *S. hominis* et *S. hirsuta*) ont à la fois la vache et le buffle comme hôte intermédiaire (Jehle et al., 2009).

1.2. Cycle évolutif

En tant qu'hôte intermédiaire, les bovins peuvent être infectés par trois espèces de *Sarcocystis* : *S. cruzi*, *S. hirsuta* et *S. hominis*, pour lesquels les hôtes définitifs sont respectivement les canidés, les félidés et les primates (Dubey & Lindsay, 2006). Une étude a récemment montré que les bovins sont également hôtes intermédiaires pour *S. sinensis* dont l'hôte définitif reste inconnu (Moré et al., 2014).

On distingue ainsi une sarcosporidiose musculaire (concernant l'hôte intermédiaire) et une sarcosporidiose intestinale (concernant l'hôte définitif). Le cycle évolutif du parasite est présenté dans la Figure 1.

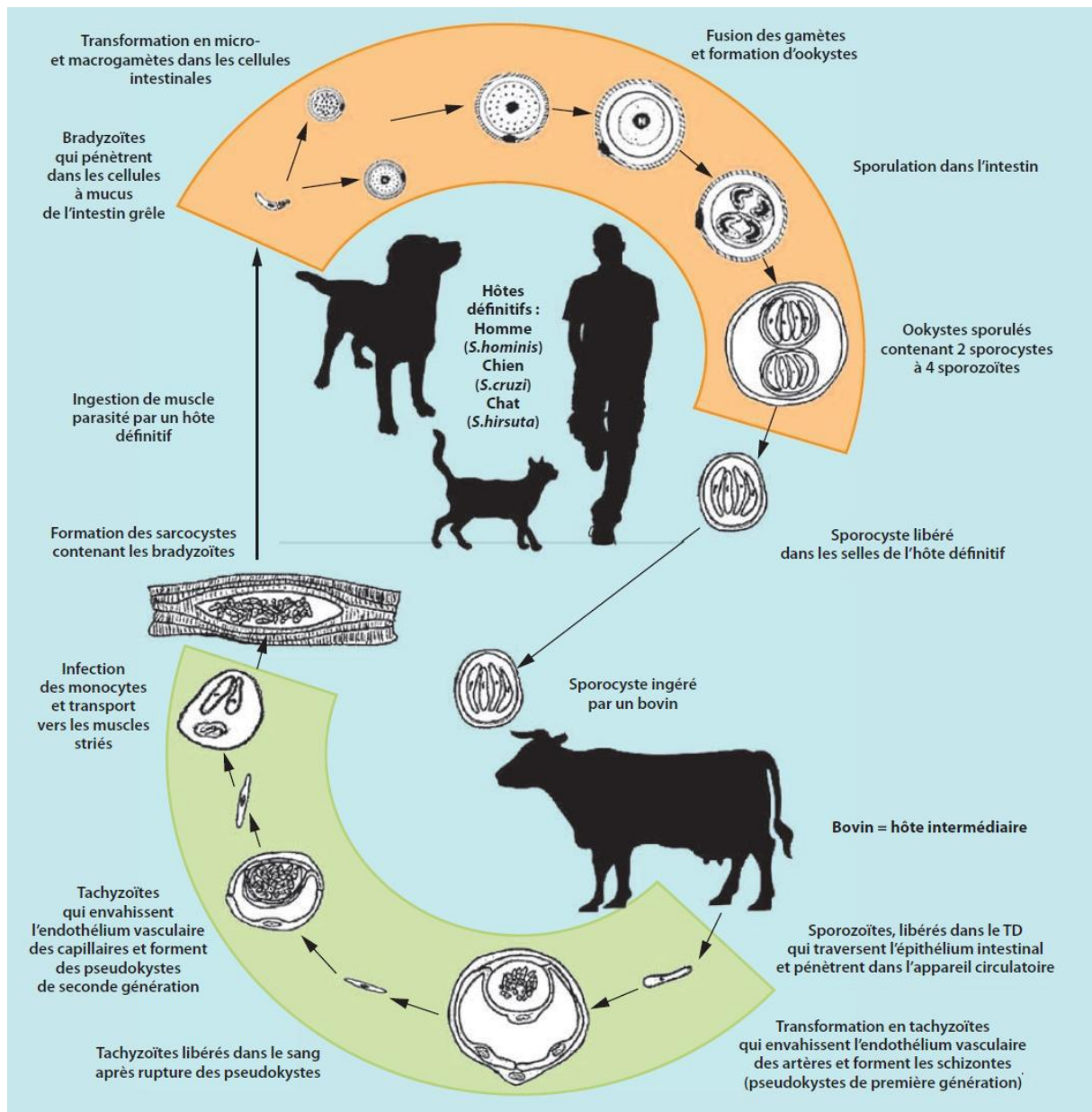


Figure 1 : Schéma du cycle évolutif des espèces de *Sarcocystis* infectant les bovins (Cappelier et Honoré, 2012)

1.2.1. Chez l'hôte intermédiaire

L'hôte intermédiaire s'infecte en ingérant des ookystes sporulés ou des sporocystes excrétés dans l'environnement par l'hôte définitif. Une fois dans l'intestin grêle, la digestion des sporocystes permet la libération des 4 sporozoïtes qu'ils contiennent. Ces derniers traversent l'épithélium intestinal puis envahissent les cellules endothéliales des petites artères et artéριοles situées à proximité. Au sein de ces cellules a lieu la première schizogonie, entre 7 et 15 jours après ingestion, permettant l'évolution des sporozoïtes en mérozoïtes ou tachyzoïtes de première génération, chaque sporozoïte produisant jusqu'à 100 mérozoïtes. Il se forme ainsi des pseudokystes, ou schizontes, nom donné à la cellule endothéliale envahie (Desportes-Livage & Datry, 2005 ; Dubey & Lindsay, 2006).

Le schizonte finit par éclater et les mérozoïtes libérés vont pénétrer dans les cellules endothéliales des capillaires de tout le système vasculaire. C'est ici qu'a lieu la seconde schizogonie, entre 19 et 46 jours après ingestion, produisant les mérozoïtes de seconde génération. Chaque mérozoïte donnant naissance à environ 25 mérozoïtes de seconde génération, formant un pseudokyste de seconde génération (Dubey et al., 1989).

Ces mérozoïtes sont à leur tour libérés dans le sang et vont soit y rester, soit pénétrer dans les monocytes circulants. Ils envahissent ainsi l'ensemble du système vasculaire, ce qui leur permet de pénétrer dans les fibres des muscles striés cardiaque et squelettiques et quelque fois le tissu nerveux. Les mérozoïtes se transforment alors en cellules rondes nommées métrocytes qui induisent la formation de kystes musculaires, les sarcocystes, entre 45 et 65 jours après ingestion (Dubey et al., 1989).

Les métrocytes vont alors subir une forte multiplication donnant naissance à de très nombreux bradyzoïtes ou cystozoïtes. C'est à partir de cette étape que le kyste est dit mature et devient infectieux pour l'hôte définitif, au moins 2 mois post-ingestion. En fin de maturation, chaque kyste contient plusieurs centaines de milliers de bradyzoïtes (Dubey et al., 1989).

1.2.2. Chez l'hôte définitif

L'hôte définitif s'infecte en ingérant de la viande bovine crue ou insuffisamment cuite contenant des kystes parasites infectieux.

Une fois dans le tube digestif, le kyste est digéré et la rupture de sa paroi permet la libération des bradyzoïtes qu'il renferme. Ceux-ci deviennent mobiles et entrent dans les cellules à mucus de l'épithélium intestinal. Les bradyzoïtes se transforment alors en macrogamètes (gamète femelle) ou en microgamètes (gamète mâle) (Dubey et al., 1989).

La suite du développement a lieu au niveau de la *lamia propria* de l'épithélium. Il y a fusion d'un macrogamète avec un microgamète, formant un ookyste. Une fois la sporogonie effectuée, chaque ookyste contient deux sporocystes contenant chacun 4 sporozoïtes. Les ookystes sont alors infectieux pour l'hôte intermédiaire et sont libérés dans les matières fécales de l'hôte définitif. Parfois la paroi de l'ookyste se rompt dans l'intestin et les sporocystes sont directement excrétés. Les premières excréctions apparaissent généralement entre 7 et 14 jours après l'ingestion et continueront souvent pendant deux ou trois mois (Euzéby, 1998).

1.3. Morphologie

1.3.1. Chez l'hôte intermédiaire

1.3.1.1. A l'œil nu

Les kystes musculaires apparaissent comme des éléments submicroscopiques (0,5-3 mm x 0,3 mm) allongés dans le sens des fibres, comme le montre la Figure 2. Ils sont théoriquement visibles à l'œil nu mais, en pratique, on ne les remarque que lorsqu'ils sont nombreux. Ils forment de petites tâches ovoïdes, de couleur blanchâtre à grisâtre, ou jaunâtre à verdâtre s'il y a infiltration éosinophile (Euzéby, 1998).

Cependant, les sarcocystes de *S. hirsuta* peuvent être particulièrement gros, mesurant jusqu'à 8 mm de longueur et 1 mm de largeur (Dubey et al., 1989).



Figure 2 : Observation macroscopique de kyste sarcosporidien dans un muscle de l'épaule d'un bovin (Nicolas OUDOT, BOVILOIRE, 2012)

1.3.1.2. En microscopie optique

Les kystes peuvent être observés en microscopie optique. Leurs dimensions varient selon l'espèce et le stade de maturation du kyste. Les sarcocystes de *S. cruzi* ont une longueur inférieure à 500 μm , ceux de *S. hirsuta* souvent moins de 800 μm et ceux de *S. hominis*, moins de 950 μm (Tenter, 1995). L'épaisseur de la paroi est couramment utilisée comme critère de détermination d'espèce (Tableau I). Parmi les espèces infectant les bovins, seul le sarcocyste de *S. cruzi* possède une paroi fine (inférieure à 1 μm) alors que *S. hominis* et *S. hirsuta* ont tous les deux une paroi épaisse (de 2 à 7 μm) (Wouda et al., 2006).

Tableau I : les différents types de paroi de kystes de *Sarcocystis* observés au microscope optique

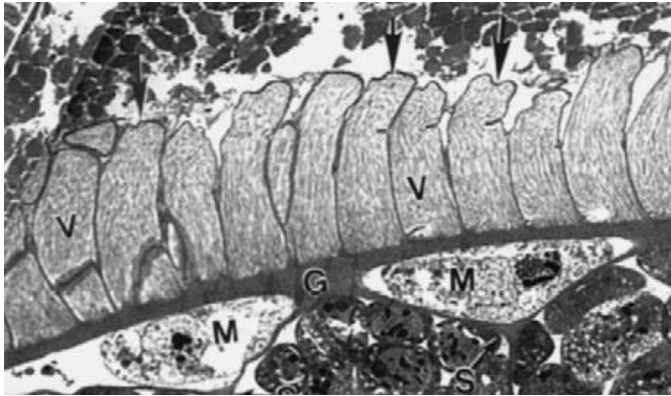

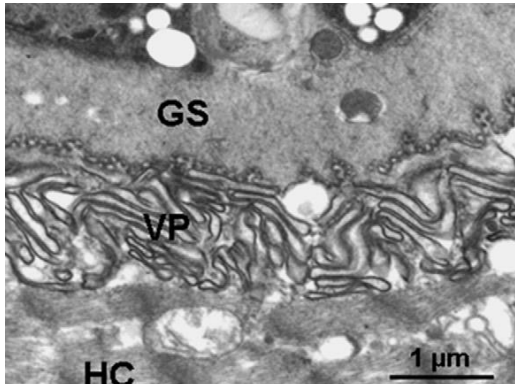
<p>Kyste à paroi fine de <i>S. cruzi</i>, coloration hémalun-éosine. x 600 (Ghisleni et al., 2006)</p>	<p>Kyste à paroi épaisse de <i>S. hominis</i> ou <i>S. hirsuta</i>, coloration hémalun-éosine. x 600 (Ghisleni et al., 2006)</p>

1.3.1.3. En microscopie électronique

Afin de différencier les deux espèces à paroi épaisse, l'observation des villosités, ou microphanères, des kystes au microscope électronique est indispensable (Tableau II). Le sarcocyste de *S. hominis* présente des villosités en palissade, en forme de doigts, avec une extrémité arrondie et une base large. Celui de *S. hirsuta* a des villosités larges, en forme de langue, avec une base plus étroite et effilées distalement (Moré et al., 2011 ; Wouda et al., 2006).

Il existe également des villosités sur les kystes de *S. cruzi*. Ces dernières sont filamenteuses et sans microtubules, contrairement à *S. hominis* et *S. hirsuta* (Dubey et al., 1989).

Tableau II : les différentes villosités des kystes de *Sarcocystis* observées au microscope électronique

<p>Paroi d'un kyste de <i>Sarcocystis hominis</i> au microscope électronique à transmission (Wouda et al., 2006). On observe les microvillosités (V) en palissade, avec une extrémité émoussée (flèche noire) et une base large, typiques de cette espèce. NB : M : metrocyte / G : zone dense aux électrons</p>	
<p>Paroi d'un kyste de <i>Sarcocystis hirsuta</i> au microscope électronique à transmission (Moré et al., 2011). On observe les microvillosités en forme de langue, avec une base étroite (flèche jaune). La flèche noire indique des microtubules et des granules denses aux électrons.</p>	
<p>Paroi d'un kyste de <i>Sarcocystis cruzi</i> au microscope électronique à transmission (Jehle et al., 2009). On observe des villosités (VP) très filamenteuses et sans microtubules. (HC = cellule hôte, GS = zone dense aux électrons)</p>	

En coupe transversale, les sarcocystes apparaissent divisés en alvéoles (Figure 3), séparées par des septa et renfermant des bradyzoïtes, éléments allongés en forme de banane (Figure 4) et mesurant de 7 à 15 μm de longueur par 2,5 à 3,5 μm (Fayer, 2004 ; Latif et al., 2013).

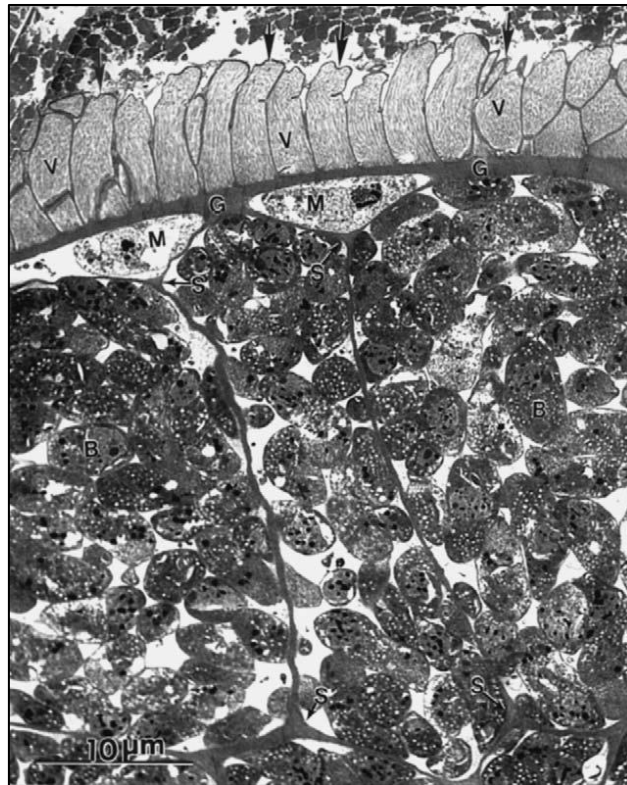


Figure 3 : Coupe transversale de sarcocystes de *S. hominis* au microscope électronique à transmission, montrant des septa traversant le sarcocyste (Wouda et al., 2006)
B : Bradyzoïtes, G : zone dense aux électrons, M : métrocytes, S : septa, V : villosités de la paroi



Figure 4 : Observation de bradyzoïtes au microscope à contraste interférentiel de bradyzoïtes de *S. cruzi* (grossissement x 1000) (Fayer, 2004)

1.3.2. Chez l'hôte définitif

Les ookystes excrétés ne sont visibles qu'au microscope (Figure 5). Ils mesurent entre 14,3 et 15 µm par 9,5 à 10 µm chez *S. hominis* (Saito et al., 1998) et en moyenne 16 µm par 10 µm pour *S. cruzi* (Xiang et al., 2011). Chaque ookyste contient 2 sporocystes, mesurant dans la plupart des espèces de 8 à 10 µm sur 4 à 5 µm (Desportes-Livage & Datry, 2005) et renfermant chacun 4 sporozoïtes et quelques corps résiduels d'aspect granulaire. La paroi des ookystes est fine et se rompt souvent avant l'excrétion dans le milieu extérieur (Fayer, 2004). Il n'est donc pas rare de retrouver à la fois des ookystes et des sporocystes dans les prélèvements de fèces. De par les fortes similitudes existant entre les ookystes et sporocystes des différentes espèces, l'observation de ces éléments dans un but de détermination d'espèces de *Sarcocystis* n'est pas utilisée (Dubey et al., 1989).



Figure 5 : Ookyste de *S. cruzi*, contenant 2 sporocystes, isolé à partir de fèces de chien (Xiang et al., 2011) (observation au microscope optique x 400)

2. ETUDE CLINIQUE

2.1. Chez les bovins

2.1.1. Signes cliniques

La sévérité des signes cliniques est directement corrélée à la quantité d'ookystes ingérés par l'animal ainsi qu'à son statut immunitaire. Mais dans la très grande majorité des cas, l'infection des bovins par *Sarcocystis* est asymptomatique (Dubey & Lindsay, 2006).

L'infection peut évoluer sous une forme aiguë conduisant à l'apparition de signes cliniques non spécifiques, comme de la fièvre, une anorexie, une prostration, des tremblements, une perte de poids, une chute de la production laitière, une alopecie au niveau de l'arrière-train (Dubey & Lindsay, 2006 ; Fayer & Dubey, 1986). Une anémie peut être associée à ces signes cliniques. Une ingestion massive d'ookystes peut donner suite à une forme suraiguë causant une atteinte nerveuse (encéphalite, encéphalo-myélite) et parfois la mort de l'animal (Tenter, 1995). Lorsqu'ils surviennent, ces signes apparaissent environ trois à quatre semaines après l'ingestion, ce qui correspond au déroulement du deuxième cycle de schizogonie. Cette forme aiguë a lieu notamment lorsqu'un individu naïf ingère une grande dose d'ookystes.

D'après Dubey, pour observer cette forme aiguë un bovin doit ingérer en une seule fois au moins 50 000 sporocystes de *S. cruzi*, espèce réputée pour être la plus pathogène parmi celles pouvant infecter les bovins. Une ingestion de 200 000 ookystes de *S. cruzi* entraîne la mort de l'individu dans 50% des cas (Dubey et al., 1989).

Chez les vaches gestantes, la sarcosporidiose aiguë peut provoquer un avortement, avec ou sans lésions fœtales, ou bien une naissance prématurée (Savini et al., 1996).

La sarcosporidiose d'évolution chronique est la forme la plus fréquente. Cette forme est aussi appelée sarcosporidiose musculaire car elle est caractérisée par la formation de kystes musculaires, sans qu'aucun signe clinique ne soit visible. L'absence de la phase aiguë est probablement la conséquence d'une ingestion à faible dose d'ookystes. Ces kystes apparaissent quatre mois après l'ingestion (Euzéby, 1998). Tous les muscles striés peuvent être touchés, mais certains sont considérés électifs : le myocarde, la langue, l'œsophage, les muscles masséters, le muscle urétral et le diaphragme (Bucca et al., 2011). D'après Bertin, il semblerait que *S. cruzi* soit préférentiellement localisé dans le myocarde (Bertin, 2013). Associés à la formation de ces kystes, des symptômes musculaires de type rhumatoïde peuvent apparaître : douleur musculaire, troubles fonctionnels des muscles parasites, difficultés de mastication, atrophie musculaire. Même si ces symptômes ne sont pas toujours visibles, il est admis que des diminutions de performances de production sont associées à l'évolution chronique de la maladie (Dauguschies et al., 2000).

2.1.2. Diagnostic

2.1.2.1. Diagnostic du vivant de l'animal

Le diagnostic clinique du vivant de l'animal est très difficile tant les signes cliniques sont rares et non spécifiques (voir *supra*). Des examens biochimiques et hématologiques non spécifiques (recherche d'anémie, de lymphocytose, d'augmentation des CPK...) peuvent permettre d'étayer cette suspicion (Euzéby, 1998).

Toutefois, si la sarcosporidiose est suspectée, différents examens de laboratoire sont disponibles afin d'en confirmer le diagnostic.

Une recherche de mérozoïtes dans le sang circulant, libres ou inclus dans des monocytes peut être mise en place. Cependant, le résultat ne sera intéressant qu'en cas de positivité, auquel cas le diagnostic de sarcosporidiose sera confirmé (Euzéby, 1998).

Différentes méthodes ELISA visant à la détection d'anticorps dirigés contre des éléments parasitaires ont été mises en place. Une équipe a montré en 1997 que la méthode donnant les meilleurs résultats est une ELISA recherchant la présence d'anticorps dirigés contre les mérozoïtes (Savini et al., 1997 (a)). Ils ont obtenu une sensibilité de 98% et une spécificité de 97% à l'échelle d'un individu et une sensibilité de 100% ainsi qu'une spécificité de 100% à l'échelle d'un troupeau. Ce test étant à la fois peu coûteux et rapide, il s'avère être utilisable lors d'études épidémiologiques à grande échelle.

Cependant, l'intérêt des analyses sérologiques est en pratique limité dans le cas de la sarcosporidiose. En effet, aucun test ne permet d'obtenir une information au sujet de l'espèce de *Sarcocystis* impliquée, ce qui est essentiel dans les études épidémiologiques. De plus, ces tests permettent la détection d'anticorps dirigés contre des éléments parasitaires circulants mais ne permettent pas la détection de kystes parasitaires. Or ce sont les kystes qui sont en partie responsables des lésions musculaires lors de la sarcosporidiose chronique. Enfin, il semble que la grande majorité des animaux aient déjà été en contact avec le parasite, si bien qu'un résultat positif ne permet pas de différencier une sarcosporidiose aiguë d'une infection asymptomatique et ancienne (Radostits et al., 2007).

2.1.2.2. Diagnostic post-mortem

Une fois l'animal mort, il est possible d'effectuer des prélèvements de muscles permettant d'une part, l'observation des lésions éventuelles et d'autre part, la mise en œuvre d'outils diagnostiques.

- Observation de lésions à l'autopsie

Lors d'une forme aiguë de sarcosporidiose, on pourra noter des lésions hémorragiques aussi bien au niveau des muscles que sur les viscères, des lésions nécrotiques, des adénopathies et parfois une endocardite. Mais comme pour les signes cliniques, ces lésions ne sont pas spécifiques de la sarcosporidiose (Euzéby, 1998).

Concernant la sarcosporidiose chronique, il est possible d'observer les lésions typiques de kystes en particulier lorsqu'une infiltration éosinophile a eu lieu (voir 1.3.1).

- ELISA sur coupe histologique

Il est possible de réaliser un test ELISA sur des coupes de muscles. Cela permet un diagnostic aussi bien en phase aiguë qu'en phase chronique. Dans la phase chronique, l'ELISA est positive jusqu'au taux de dilution de 1/1280 (Euzéby, 1998).

- Microscope optique et électronique

Il existe plusieurs techniques d'observation des échantillons au microscope optique : sur coupe histologique, après digestion enzymatique ou par énucléation des sarcocystes.

Pour les coupes histologiques, les prélèvements de muscles sont fixés dans du formol 10%. On réalise des fines coupes d'épaisseurs 2-4 µm qui sont ensuite colorées à l'hématoxyline-éosine (Ono & Ohsumi, 1999 ; Vangeel et al., 2013).

Le prélèvement de muscle peut également être broyé puis placé dans une solution de digestion enzymatique, à base de pepsine et d'acide chlorhydrique. Le produit de digestion est ensuite décanté et 2-3 gouttes sont récupérées et montées sur une lame pour être observées (Mary, 2005).

Il est également possible de réaliser une énucléation des sarcocystes, à l'aide de micro-forceps et d'aiguille sous microscope. Les sarcocystes obtenus sont ensuite montés sur lame dans une solution saline (Odening et al., 1996).

Les différentes préparations sont ensuite observées au microscope. On peut ainsi faire le diagnostic de sarcosporidiose, lorsque l'on met en évidence des sarcocystes. De plus, l'observation de la paroi permet de réaliser un diagnostic d'espèce (Dubey et al., 1989).

Dans le cas des espèces de *Sarcocystis* infectant les bovins, *S. cruzi*, dont les kystes ont une paroi fine (< 1µm), peut facilement être différencié de *S. hirsuta* et *S. hominis* pour qui les kystes ont une paroi épaisse (2-7 µm) (Wouda et al., 2006). Cette distinction peut être réalisée au microscope optique (Tableau I).

Cependant, la distinction entre les espèces à paroi épaisse nécessite l'observation des villosités de la paroi, ce qui ne peut se faire qu'à l'aide d'un microscope électronique. Ainsi, le sarcocyste de *S. hominis* présente des villosités en palissade et en forme de doigts, avec une extrémité arrondie et une base large. Celui de *S. hirsuta* a des villosités larges, en forme de langue, avec une base plus étroite et effilées distalement (Moré et al., 2009 ; Wouda et al., 2006) comme le montre le Tableau II. L'observation au microscope électronique nécessite une fixation puis une déshydratation de l'échantillon, dont les dimensions doivent être de l'ordre de quelques millimètres de largeur (Jehle et al., 2009).

L'intérêt de l'observation de kystes au microscope est qu'il permet d'établir un diagnostic de certitude, avec la possibilité d'identifier l'espèce impliquée, même après congélation des échantillons bien que les éléments parasitaires aient perdu leur pouvoir infectieux (Chen et al., 2007).

Toutefois il existe un certain nombre d'inconvénients. C'est une méthode longue, coûteuse et nécessitant un personnel très qualifié pour la lecture des lames. Elles ne sont donc pas applicables pour de grandes études épidémiologiques (Savini et al., 1997 (a)). De plus, la microscopie optique ne permet pas de différencier toutes les espèces, contrairement à la microscopie électronique mais qui est bien plus coûteuse. Il arrive également que les kystes soient endommagés lors de la préparation des coupes, rendant leur observation plus difficile (Wouda et al., 2006). Enfin, la sensibilité de l'observation microscopique est peu élevée puisqu'on ne peut analyser qu'une faible proportion de muscle pour chaque prélèvement (Tenter, 1995).

- Diagnostic moléculaire

De nos jours, les méthodes de diagnostic moléculaire sont des outils essentiels en recherche épidémiologique, notamment en ce qui concerne la sarcosporidiose (Moré et al., 2011).

L'amplification de l'ADN par PCR est particulièrement étudiée. Plusieurs séquences d'ADN ont été exploitées. Parmi elles, l'ARNr 18S fait l'objet de nombreuses études. Cet ARN est en effet couramment utilisé pour les recherches de parenté entre espèces eucaryotes puisqu'il s'agit d'une portion qui, semble-t-il, évolue très peu (Tenter, 1995).

Ainsi, des PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ont été appliqués sur l'ADN de cet ARNr 18S. Cette technique permet l'amplification d'une longue séquence de l'ADN puis sa fragmentation par des enzymes de restriction. Les différents segments sont séparés par électrophorèse et la lecture du gel permet l'identification de l'espèce impliquée (Yang et al., 2002).

D'autres études ont utilisé des PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), qui amplifient, de façon complètement aléatoire, certaines séquences d'ADN. Une électrophorèse sépare ensuite les différents amplicons. Ainsi, en utilisant plusieurs amorces, on obtient un nombre de fragments différents et de tailles différentes selon l'espèce de *Sarcocystis*, ce qui permet de connaître l'espèce en cause (Güclü et al., 2004).

Des méthodes utilisant des amorces spécifiques à chaque espèce de *Sarcocystis* et visant l'ARNr 18S ont été mises au point. Les premières amorces ne permettaient pas d'amplifier des séquences de longueurs très différentes, le séquençage des amplicons était nécessaire pour déterminer l'espèce en cause (Vangeel et al., 2007). En 2011, Chiesa *et al* ont créé des amorces rendant possible l'amplification de segments de longueurs suffisamment différentes pour être distingués à la lecture du gel d'électrophorèse (Chiesa et al., 2011). Ainsi, une PCR multiplex a été mise en place, permettant de déterminer simultanément si le parasite est présent dans le prélèvement et le cas échéant de l'identifier après amplification et migration sur gel par électrophorèse.

Cependant, il semblerait que l'analyse de l'ARNr 18S ne permette pas toujours de bien différencier certaines espèces phylogénétiquement très proches, comme *S. hominis* et *S. sinensis* par exemple. En 2013, un autre gène a été étudié : la sous unité 1 du gène codant pour le cytochrome C oxydase (cox1). Après amplification et séquençage, il a été conclu que ce gène pourra être utilisé à l'avenir afin d'établir des diagnostics d'espèce car les différences de séquences entre les espèces de *Sarcocystis* sont suffisamment importantes (Gjerde, 2013).

Quoi qu'il en soit, la PCR présente plusieurs avantages : elle est rapide, relativement peu coûteuse, ne nécessite pas de personnel très qualifié pour la lecture des résultats. Ainsi elle est utilisable en routine et notamment pour des enquêtes épidémiologiques à très grande échelle (Yang et al., 2002).

2.1.3. Traitement

Bien qu'à l'heure actuelle il n'existe aucun traitement spécifique de la sarcosporidiose, il est possible, en cas de sarcosporidiose aiguë, d'utiliser des traitements anticoccidiens habituels des bovins. Les molécules utilisables sont les suivantes (Fayer, 2004 ; Radostits et al., 2007) :

- Amprolium (100mg/kg par jour pendant 30 jours)
- Salinomycine (1 à 2mg/kg par jour pendant 30 jours)
- Oxytétracycline à très haute dose
- Halofuginone (1,5mg/kg par jour, pendant 2 jours) par exemple dans HALOCUR®
- Toltrazuril (10 mg/kg/jour pendant 3 jours) par exemple dans BAYCOX®

Certaines études ont montré que l'administration de traitements anticoccidiens entre deux et quatre semaines après l'ingestion de sporocystes prévient l'apparition des troubles cliniques (Fayer & Dubey, 1986).

2.2. Chez l'hôte définitif

Les différentes espèces de *Sarcocystis* ont toutes un point commun : elles sont davantage pathogènes chez leur hôte intermédiaire que chez leur hôte définitif (Dubey & Lindsay, 2006). La sarcosporidiose intestinale, ou coccidiose sarcocystique, ne provoque donc que très rarement des signes cliniques.

2.2.1. Chez l'homme

A ce jour, l'homme est connu pour être l'hôte définitif de deux espèces : *S. hominis* et *S. suihominis*, dont l'hôte intermédiaire est le porc. Le portage intestinal, à un instant donné, de *Sarcocystis* semble relativement fréquent, généralement compris entre 6% et 10% quelles que soient les régions du monde observées (Acha & Szyfres, 2005). Toutefois, ces données varient avec les habitudes alimentaires de la population, notamment en ce qui concerne la consommation de viande crue. Ainsi, au Tibet, la prévalence de *S. hominis* chez l'adulte était de 21,8%. D'autres études ont montré que des individus très jeunes (9 mois) pouvaient être touchés (Euzéby, 1998).

2.2.1.1. Signes cliniques

La sarcosporidiose intestinale est généralement asymptomatique. Cependant, des volontaires ayant ingéré de la viande bovine crue et contenant des sarcocystes de *S. hominis* ont présenté différents symptômes (Euzéby, 1998).

Un premier syndrome, d'allure toxique, apparaît trois à huit heures après l'ingestion et se prolonge pendant 24 à 36 heures. Celui-ci se manifeste par une anorexie, des nausées, des douleurs gastro-intestinales et de la diarrhée.

Dix à quinze jours après l'ingestion, un syndrome de type coccidiose est observé. Il a lieu pendant la période de gamétogonie des *Sarcocystis*, période correspondant à l'excrétion des premiers ookystes. Il se manifeste par une entérite diarrhéique, pouvant durer quelques jours mais passant souvent inaperçu (Euzéby, 1998).

En Thaïlande, quelques rares cas très graves ont été rapportés, suite à des infections non expérimentales. Les individus concernés ont développé une entérite nécrosante, nécessitant un traitement chirurgical (Fayer, 2004).

Des individus volontaires ont ingéré de la viande porcine crue et contenant des sarcocystes de *S. suis/hominis*, parasite réputé pour être plus pathogène que *S. hominis* (Euzéby, 1998). Ces personnes ont présenté un syndrome toxique plus sévère, avec notamment vomissement, œdème, difficultés respiratoires et tachycardie (Desportes-Livage & Datry, 2005).

2.2.1.2. Diagnostic

Le diagnostic de présomption est fondé sur la symptomatologie et sur l'anamnèse, rapportant une histoire récente d'ingestion de viande crue ou peu cuite.

Le diagnostic de certitude peut être réalisé par la mise en évidence, dans les fèces de l'individu, d'ookystes sporulés ou de sporocystes ovoïdes mesurant de 12 à 19 µm sur 8 à 12 µm (Desportes-Livage & Datry, 2005). Pour ce faire, un examen direct, des techniques d'enrichissement ou une recherche par PCR peuvent être employés (Xiang et al., 2009). L'excrétion des ookystes et sporocystes se prolongent pendant 10 à 12 semaines après l'ingestion. Cependant, dans la mesure où la forme asymptomatique est la forme la plus fréquente, et que les symptômes ne sont pas spécifiques, cette recherche est rarement effectuée.

2.2.1.3. Traitement

En pratique, la cause précise des entérites n'est pas recherchée et des traitements uniquement symptomatiques sont entrepris. Toutefois, il est théoriquement possible de mettre en place les thérapeutiques médicales classiques des coccidioses (Euzéby, 1998). Face à l'absence de réaction immunitaire de l'hôte (voir paragraphe 3.2.2), le traitement doit être renouvelé toutes les semaines pendant trois mois.

2.2.2. Chez les carnivores

Les études concernant la symptomatologie de la sarcosporidiose intestinale chez les carnivores sont relativement rares. Quelques chiens et coyotes à qui on a distribué de la viande crue ont présenté des vomissements et de l'anorexie. Mais ces signes non spécifiques peuvent être dus au changement de régime alimentaire (Dubey et al., 1989).

Le diagnostic et le traitement des carnivores hôtes définitifs sont encore plus rares que chez l'homme, mais peuvent utiliser les mêmes méthodes.

3. PATHOGENIE ET IMMUNITE

3.1. Pathogénie

Le pouvoir pathogène de *Sarcocystis* est lié (Euzéby, 1998) :

- à une action phlogogène. Elle fait suite à l'élaboration de facteurs chimiotactiques, exerçant un effet attractif sur les leucocytes, et à la synthèse de cytokines par les macrophages.
- à une action nécrosante, résultant de la destruction des cellules endothéliales suite à leur colonisation par les tachyzoïtes. Elle conduit à l'apparition de pétéchies, de suffusions et de lésions suppuratives.

- à une action toxique. La sarcocystine est une protéine thermolabile, résistant tout de même à des températures inférieures à 55°C (Euzéby, 1997), synthétisée par les parasites dès le stade pseudokystique, mais surtout au sein des kystes matures. Elle entraîne dans les conditions naturelles une élévation du taux de somatostatine et une diminution du taux de l'IGF-1. Cependant, si on l'injecte à des lapins, elle est particulièrement toxique et entraîne rapidement la mort. C'est cette toxine que l'on suppose être à l'origine des syndromes de sarcosporidiose intestinale aiguë.
- à une action antigénique. Il existe différents antigènes sarcosporidiens : des antigènes de surfaces (polypeptides communs aux sporozoïtes, tachyzoïtes et bradyzoïtes), des antigènes cytoplasmiques (isolés à partir des tachyzoïtes) et des antigènes de micronèmes. Ces différents antigènes provoquent des sécrétions de cytokines nécosantes (TNF- α principalement) et phlogogène (IL-1 notamment).

Chez l'hôte intermédiaire, ces actions sont surtout présentes pendant la phase aiguë de l'infection et sont principalement l'œuvre des tachyzoïtes de seconde génération.

3.2. Immunité

3.2.1. Chez l'hôte intermédiaire

Les antigènes parasitaires, principalement ceux appartenant aux pseudokystes, sont à l'origine de la mise en place de deux types d'immunité chez l'hôte intermédiaire.

La première est une immunité humorale, composée d'IgG, d'IgM et d'IgE, dirigée contre les tachyzoïtes, stade circulant du parasite. Les IgM apparaissent 15 jours après ingestion puis leur concentration plasmatique diminue au-delà du troisième mois. Les IgG quant à elles sont détectées à partir de la cinquième semaine post-ingestion et persistent pendant au moins six mois (Fayer & Dubey, 1986). La cinétique des IgE n'est pas encore bien connue mais leur production est néanmoins confirmée (Euzéby, 1998).

La seconde est une immunité cellulaire, dont le rôle est la destruction de kystes musculaires, via la formation d'un granulome. Elle se traduit par une infiltration lymphocytaire et macrophagique, avec cytotoxicité des lymphocytes T et phagocytose par les macrophages (Euzéby, 1998).

L'immunité ainsi conférée est une immunité de prémunition ou de co-infection (Savini et al., 1996). Elle permet, une fois mise en place, d'empêcher l'apparition des signes cliniques de la sarcosporidiose aiguë. Des veaux préalablement infectés avec 50 000 ou 100 000 sporocystes de *S. cruzi* ont supporté une ingestion ultérieure d'une dose létale de sporocystes. Et cette protection serait efficace pendant au moins 252 jours (Dubey et al., 1989).

En outre, il semblerait qu'il n'y ait pas d'immunité croisée. Ainsi, des bovins infectés par *S. hirsuta* ne présenteraient pas d'immunité efficace vis-à-vis de *S. cruzi* (Dubey et al., 1989).

3.2.2. Chez l'hôte définitif

Contrairement à ce que l'on sait des autres coccidioses, l'hôte définitif peut être réinfecté. En effet, les coccidioses sarcocystiques sont caractérisées par un parasitisme par les gamétocytes (les formes sexuées). Or ces stades parasitaires sont très peu immunogènes, à la différence des stades issus de la schizogonie (les tachyzoïtes). Ainsi, l'hôte définitif ne développera pas d'immunité lors d'une infection et une consommation de viande crue parasitée entraînera une nouvelle infection suivie d'une excrétion d'ookystes dans ses fécès, accompagnée ou non de signes cliniques (Euzéby, 1998).

4. LÉSIONS CHEZ LES BOVINS

La plupart des bovins sont porteurs de sarcocystes, mais très peu d'entre eux développent des lésions macroscopiquement visibles. Ces lésions, appelées myosite éosinophilique (ME) en raison du caractère inflammatoire et de l'infiltration de granulocytes éosinophiles qui les caractérisent, concerneraient 0,002% à 0,013% des bovins abattus dans différentes régions du monde (Vangeel et al., 2012). Des taux exceptionnels, supérieurs à 5%, ont été rapportés dans l'Ouest des Etats-Unis (Jensen et al., 1986). En France, en région Pays de la Loire, 0,086% des bovins abattus en 2013 présentaient des lésions de myosite éosinophilique (Bertin, 2013). Cependant, le schéma pathogénique conduisant à l'apparition de ce type de lésion est encore mal connu et seules quelques hypothèses sont avancées pour le moment.

4.1. Description des lésions de myosite éosinophilique

4.1.1. Macroscopiquement

Macroscopiquement, on peut observer 2 types de lésions.

- Le premier type de lésions est caractérisé par des lésions diffuses, larges, de 5 à 15 cm de diamètre, de forme irrégulière et globuleuse et plus ou moins ferme et fibreuse (Figure 6). Elles sont de couleur jaune pâle avec éventuellement quelques nuances verdâtres et rougeâtres. Le plus souvent, ces lésions bordent les aponévroses musculaires. On retrouverait ce type de lésions sur moins de 10% des carcasses concernées par des myosites éosinophiliques (Jensen et al., 1986).



Figure 6 : Observation d'une lésion diffuse de myosite éosinophilique dans un muscle de bovin (Cappelier et Honoré, 2012)

- Le deuxième type de lésion est caractérisé par la présence de nombreuses lésions multifocales, rondes ou fusiformes et de petite taille (0,5 à 5 mm par 0,5 à 2 mm) (Figure 7). Ces lésions sont plus discrètes que les précédentes. Elles sont allongées dans le sens des fibres musculaires. Lorsqu'elles sont récentes, les lésions sont de couleur verte, puis en vieillissant elles deviennent grises avec des éventuelles nuances verdâtres en périphérie. Certaines de ces lésions multifocales peuvent être coalescentes et forment alors une lésion de 1 à 4 mm de diamètre, plutôt ferme. Les lésions cicatricielles faisant suite à ces lésions sont de couleur grisâtre à jaunâtre, comportent des foyers verdâtres et parfois, quelques nodules marrons énucléables sont présents, de taille 0,1 à 0,5 mm de diamètre (Jensen et al., 1986).



Figure 7 : Lésions multifocales de myosite éosinophile, avec centre suppuré, sur une section de muscle de bovin (Wouda et al., 2006)

4.1.2. Microscopiquement

L'analyse histologique révèle que ces lésions sont des granulomes, centré sur un kyste, pouvant être décrits selon 3 stades d'évolution (Jensen et al., 1986) :

- Dans un premier temps, la lésion de ME est constituée d'un amas de tissu nécrotique, contenant de nombreux granulocytes éosinophiles et quelques macrophages, et de débris de myocytes entourant le sarcocyste.
- En vieillissant, le centre de la lésion se dégrade de plus en plus. Les fragments de myocytes ont perdu leurs noyaux et leurs striations et des images de phagocytoses sont visibles. Bien que la plupart des cellules soient identifiables, sauf au cœur des zones calcifiées, la grande majorité des granulocytes éosinophiles sont morts. En périphérie du granulome, de nouveaux granulocytes éosinophiles apparaissent, accompagnés de lymphocytes, de macrophages, de mastocytes et de quelques hématies. Ces cellules forment comme une frontière entre le granulome et les cellules musculaires saines.
- En fin d'évolution, le tissu est très fortement dégénéré. Le centre ne contient plus que des débris cellulaires et le sarcocyste dégénéré. La paroi du granulome est formée de cellules polynucléaires géantes, de lymphocytes et de tissu fibreux. Ce tissu fibreux, cicatriciel, est également présent autour de la lésion, et contient quelques myocytes, lymphocytes et granulocytes éosinophiles dégradés. Les cellules qui entourent ces lésions sont également modifiées, d'autant plus qu'elles sont proches de la lésion (Figure 8).

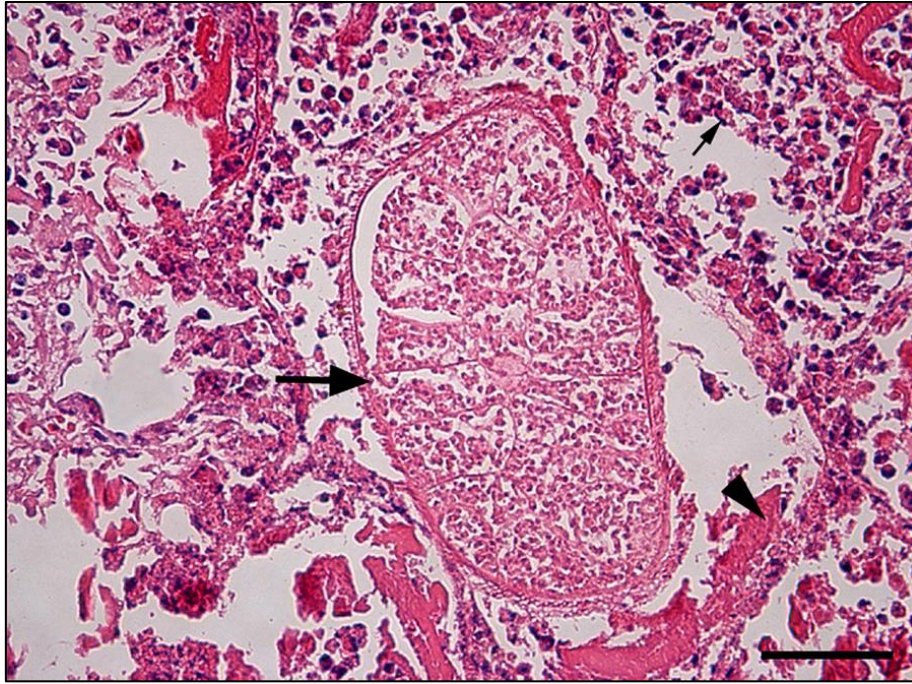


Figure 8 : Lésion microscopique d'un granulome éosinophilique dans un muscle de bovin (Vangeel et al., 2013)

Grande flèche : sarcocyste dégénéré. Petite flèche : amas de granulocytes éosinophiles. Tête de flèche : myocyte dégénéré.

4.2. Pathogénie des myosites éosinophiliques

A l'heure actuelle, des études histologiques ont montré qu'au centre des lésions de ME se trouvent des sarcocystes dégénérés ou en voie de dégénérescence (Dubey & Lindsay, 2006). De plus, selon d'autres études, les carcasses comportant des lésions de ME contiennent moins d'éléments parasitaires que les carcasses sans lésions (Gajadhar & Marquardt, 1992). Ceci appuie l'hypothèse faite que cette lésion de ME serait révélatrice d'une réponse immunitaire de l'hôte contre le parasite (Granstrom et al., 1989).

L'inconnue est la raison pour laquelle l'hôte va réagir contre certains kystes, alors que d'autres ne seront concernés par aucune réaction inflammatoire (Vangeel et al., 2013).

En 1986, Jensen *et al.*, supposent que lors de la maturation des kystes, l'augmentation du nombre et de la taille des bradyzoïtes ainsi que l'accumulation de déchets métaboliques, comprenant notamment des facteurs chimiotactiques pour les granulocytes éosinophiles, des antigènes et des cytotoxines, conduiraient à l'ouverture de la paroi du kyste. Ceci libérerait les différents éléments cités, conduisant à l'apparition des lésions inflammatoires, les granulomes éosinophiliques (Jensen et al., 1986).

Cette hypothèse est remise en cause en 1989, par Granstrom et son équipe. Selon eux, si cette hypothèse était vérifiée, on aurait une prévalence de ME chez les animaux abattus bien plus élevée en raison de la forte prévalence de la sarcosporidiose bovine et du fait que les sarcocystes commencent à dégénérer et libérer leur contenu après trois mois environ. Selon l'auteur, les ME seraient plutôt dues à une réponse anormale de l'hôte vis-à-vis de la présence du parasite, similaire à une hypersensibilité de type I. D'autres facteurs pourraient intervenir, tels la génétique, la dose antigénique, le parasitisme simultané par des helminthes ou encore la concomitance d'une infection virale (Granstrom et al., 1989).

Vangeel montre, en 2012, qu'il est possible de provoquer l'apparition de lésions similaires aux ME par injection intramusculaire d'un mélange d'antigènes de *Sarcocystis*, provenant de kystes à parois fines et épaisses. Ceci conforte l'hypothèse du rôle primordial du système immunitaire dans l'apparition des lésions (Vangeel et al., 2012).

En 2013, Bertin constate qu'une infection mixte, à *S. cruzi* et *S. hominis*, pourrait diminuer la fréquence des ME chez les bovins abattus (Bertin, 2013).

En outre, il semblerait que la fréquence d'apparition des lésions de ME soit différente selon la catégorie de bovins. En région des Pays de la Loire, les taux de saisies parmi les vaches et génisses sont supérieurs à 0,1 %, alors que ceux des jeunes bovins, taureaux et bœufs sont beaucoup plus faibles, avec un taux de saisies près de 50 fois inférieur en ce qui concerne les jeunes bovins (Bertin, 2013).

Enfin, il semblerait qu'il y ait des différences selon les races. La Blonde d'Aquitaine et en second lieu la Parthenaise seraient, en France, les deux races bovines les plus concernées par les saisies pour myosite éosinophilique, avec des taux de saisies de 0,42% et 0,22% respectivement, en Pays de la Loire et tout type d'animaux confondus alors que les taux de saisies des autres races sont situés autour de 0,02 et 0,03% (Bertin, 2013).

Quoi qu'il en soit, ces lésions conduisent à la saisie des carcasses concernées, jugées impropres à la consommation humaine (voir *infra*).

5. IMPORTANCE DE LA SARCOSPORIDIOSE

5.1. Prévalence

Sarcocystis spp. est un parasite cosmopolite et les prévalence de son portage chez les animaux de rente herbivores sont très élevées dans toutes les régions du monde (Tableau III).

Tableau III : Prévalence dans diverses régions du monde de l'infection par *Sarcocystis spp.* chez des animaux de rente (d'après Bertin, 2013)

Région / Pays		Prévalence totale obtenue	Echantillonnage	Méthodes employées		Date de prélèvement	Réf.
				Microscop.	Bio.moléculaire		
Europe	Belgique	94%	67 échantillons de viande bovine hachée	TEM*	PCR (ARNr 18S)	01-2006 à 03-2006	(1)
		97%	100 bovins – 300 prélèvements (cœur, diaphragme, œsophage)	Digestion + MP*		07-1987 à 11-1987	(1)
	Italie (Sicile)	96%	50 vaches – 1100 prélèvements (22 muscles)	Histologie	PCR + RFLP (ADNr 18S)	09-2008 à 02-2009	(1)
Iran	84%	250 chameaux	04-2002 à 03-2005			(1)	
Vietnam	79%	502 buffles asiatiques – 2510 prélèvements (5 muscles)	01-1996 à 10-1997			(1)	
	90%	30 buffles asiatiques – 208 prélèvements	10-2003 à 12-2003			(1)	
Mongolie	63%	101 vaches – 541 échantillons		TEM*	(1)		
	90%	30 vaches	Ecrasement entre lames	06-1998 à 07-1999			
	93%	30 yacks					
	100%	30 hainag*					
97%	777 moutons						
Japon	6%	317 bovins	Histologie	PCR (ARNr 18S)	02-1996 à 07-1999	(1)	
Malaisie	36%	102 bovins			02-2011 à 03-2012	(2)	
	67%	18 buffles					
Océanie et continent américain	USA (import)	37%	87 bovins	Histologie	02-1996 à 02-1998	(1)	
	Australie (import)	29%	78 bovins (œsophage)			(1)	
	Australie (ouest)	52%	714 bovins (œsophage)	Digestion + MP*	05-1989 à 12-1990	(1)	
	Brésil	6%	64 boîtes de conserve (beg)*	Histologie	01-2003 à 06-2004	(1)	
		23%	64 boîtes de conserve (beg)*			(1)	
Argentine	99,7%	390 bovins (cœur, muscle psoas et sang)	TEM*	PCR + IFAT*		(1)	

Ref. : (1) : Bertin, 2013

(2) : Latif, 2013

*Hainag : croisement d'une vache et d'un yack ; IFAT : Indirect Fluorescent Antibody Technique ; MP : microscopie photonique ; TEM : microscopie électronique à transmission ; (beg) : bœuf en gelée.

Ces données sont à comparer aux prévalences de myosites éosinophiliques, qui seraient de 0,002% à 0,013% selon les pays (Vangeel et al., 2012), montrant la complexité de la relation entre sarcosporidiose et myosite éosinophilique.

Certains muscles sont considérés comme des sites électifs de localisation des sarcocystes (voir 2.1.1). Le Tableau IV montre que les prévalences peuvent être modifiées selon, d'une part le muscle analysé, et d'autre part l'espèce hôte étudiée. Le choix du couple muscle/espèce semble avoir un grand intérêt pour les recherches de parasites. Chez les bovins, le cœur et le diaphragme semblent être des sites à privilégier pour les analyses.

Tableau IV : Prévalence de *Sarcocystis spp.* selon l'espèce de mammifère en jeu et le site musculaire étudié (Bertin, 2013)

Etude	Bucca et al., 2011	Vercruyse et al., 1989		Fukuyo et al., 2002				
	Méthode	Hist.	Hist.	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)
	Œsophage	-	67% (67/100)	97% (97/100)	-	-	-	80% (4/5)
	Masséter	66% (33/50)	-	-	-	-	-	-
	Autres muscles étudiés	32-52% (16-26/50)*	-	-	-	-	-	66,7% Région intercostale

Hist. : Histologie ; MP : Microscope Photonique ; * : 18 muscles étudiés

De plus, il semblerait que, pour un même hôte intermédiaire, les différentes espèces de *Sarcocystis* aient des sites électifs différents (Tableau V).

Tableau V : Prévalence de *S. hominis* et *S. cruzi* selon le muscle étudié, chez les bovins (Bertin, 2013)

Espèce de <i>Sarcocystis</i>	Muscle étudié		
	Diaphragme	Autre muscle squelettique	Myocarde
<i>S. hominis</i>	80,2% (85/106)	79% (84/107)	48,9% (45/92)
<i>S. cruzi</i>	23,6% (25/106)	26% (28/107)	57,6% (53/92)

Ainsi, *S. cruzi* serait plus fréquemment localisé dans le myocarde alors que *S. hominis* le serait davantage dans le diaphragme ou dans d'autres muscles squelettiques, ce qui justifie l'analyse simultanée du myocarde et d'un muscle squelettique lors de recherches de parasites.

5.2. Epidémiologie

Différents éléments peuvent expliquer, au moins en partie, les raisons pour lesquelles la prévalence de *Sarcocystis spp.* est aussi élevée et ce quelle que soit la région du monde concernée (Dubey et al., 1989).

- Un hôte, définitif ou intermédiaire, peut être porteur de plusieurs espèces de *Sarcocystis* en même temps (Jehle et al., 2009).
- Une espèce de *Sarcocystis* peut avoir plusieurs espèces en tant qu'hôte définitif. Par exemple, pour *S. cruzi*, tous les canidés peuvent être hôte définitif. Ceci permet une adaptation du cycle évolutif à de nombreuses régions du monde. De même, *S. hominis* peut contaminer tous les primates et *S. hirsuta* tous les félinés (Dubey & Lindsay, 2006).
- Les ookystes et sporocystes sont libérés par l'hôte définitif pendant plusieurs semaines après une seule ingestion infectante (à la différence de ce que l'on observe dans les autres coccidioses) ce qui assure une grande dissémination du parasite (Euzéby, 1997).
- Aucune immunité ne se met en place chez l'hôte définitif, si bien que chaque ingestion d'aliment contaminé pourra être à l'origine d'une période d'excrétion (Dubey et al., 1989).
- La longévité des sporocystes est très grande : ils peuvent survivre deux ou trois mois en milieu sec et jusqu'à un an en milieu humide (Euzéby, 1997), ce qui permet leur dissémination sur de longues périodes.
- De même, les sporocystes peuvent survivre à des températures négatives, jusqu'à -20°C pendant 48 heures. Ils peuvent survivre au cours de l'hiver dans de très nombreuses régions du monde (Euzéby, 1997).
- Les sporocystes possèdent une très grande résistance aux différents antiseptiques lorsque ceux-ci sont appliqués à des concentrations correspondant à leur utilisation habituelle. Seul l'ammoniac à 10% possède un effet létal sur les sporocystes (Euzéby, 1997).
- Un unique hôte définitif peut disséminer un très grand nombre d'ookystes et de sporocystes. Par exemple, un chien ayant été nourri avec 250g de viande de bœuf contaminée excrète entre 100 et 6000 sporocystes par grammes de fèces. A la fin de la période d'excrétion, cela peut représenter la dissémination de millions de sporocystes (Dubey et al., 1989).
- A la différence d'autres coccidies, *Sarcocystis* est libéré par les hôtes définitifs sous sa forme infectante. Sa maturation et le développement de son caractère infectieux ne dépendent donc pas des conditions extérieures (Dubey et al., 1989).
- Les sarcocystes peuvent rester infectieux pendant plusieurs mois voire années, même si un certain nombre d'entre eux commencent à dégénérer trois mois après inoculation (Dubey et al., 1989). Ils peuvent survivre jusqu'à 15 jours après la mort de l'hôte et résistent à la réfrigération à -2°C (Euzéby, 1997).
- Bien que très rare, une transmission verticale serait possible. En recherchant des anticorps anti-sarcocystis pré-colostraux, une étude a montré que 3 veaux sur 173 auraient été en contact avec le parasite lors de la gestation (Moré et al., 2009).

Toutes ces caractéristiques participent au bon déroulement du cycle de *Sarcocystis*, permettant au parasite d'être très présent à l'échelle mondiale.

5.3. Impact économique

5.3.1. Les pertes dues aux saisies d'abattoirs

Par la myosite éosinophilique qu'elle provoque, la sarcosporidiose est à l'origine de nombreuses saisies de carcasses, le plus souvent totales. En effet, selon Bertin, les saisies pour sarcosporidiose seraient à 88% des saisies totales (Bertin, 2013).

En France, le retrait des viandes des circuits de la consommation humaine est défini par le règlement 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 (Parlement Européen et Conseil, 2004). L'ensemble des critères conduisant à la déclaration d'une viande impropre à la consommation humaine est indiqué dans l'annexe I, section II, chapitre V de ce règlement. L'alinéa h de ce chapitre indique qu'une viande présentant une infestation parasitaire doit être saisie, et selon l'alinéa p, des altérations physiopathologiques, des anomalies de consistance ou des anomalies organoleptiques doivent également entraîner un retrait de la viande. Ce sont donc les raisons pour lesquelles les viandes contaminées par *Sarcocystis* sont retirées des circuits de consommation.

En 2012, 3 650 000 gros bovins ont été abattus en France, correspondant à 1 355 000 tonnes équivalent carcasse (téc) (Département Economie de l'Institut de l'Elevage, 2013). Selon Fradin, en 2003, à l'échelle nationale, le taux de saisie (en tonnages) pour sarcosporidiose représenterait 0,00966% des abattages totaux (Fradin, 2003). Ceci correspondrait en 2012 à une saisie d'environ 131 téc pour sarcosporidiose.

D'après les chiffres de BOVI-LOIRE, dans les abattoirs de Pays de la Loire, 335 153 gros bovins ont été abattus en 2013, et 384 ont été saisis pour myosite éosinophilique, soit un taux de saisie de 0,11% chez les gros bovins. Parmi elles, 347 carcasses ont été saisies en totalité, ce qui représenterait une perte de plus de 870 000€, toujours selon BOVI-LOIRE, pour la région Pays de la Loire. Ce chiffre ne prend pas en compte les pertes pour saisies partielles, plus difficile à chiffrer et concernant 37 carcasses. Le coût réel des pertes est donc probablement plus élevé que l'estimation faite. De plus, toujours d'après les données de BOVI-LOIRE, le taux de saisies pour myosite éosinophilique est en augmentation depuis plusieurs années (0,055% en 2010 et 0,076% en 2013, tous types d'animaux confondus), ce qui semble particulièrement préoccupant.

Aux Etats-Unis, entre 1982 et 1983, 4 455 carcasses ont été totalement saisies et 24 293 ont subi des saisies partielles. En estimant qu'en moyenne une saisie partielle correspond à la saisie d'un quart de la carcasse et qu'une carcasse avait une valeur de 700 dollars, le coût total des saisies pour sarcosporidiose a été estimé à 7,4 millions de dollars (Fayer & Dubey, 1986).

5.3.2. Les pertes dues à la maladie

- Maladie sub-clinique

L'infection parasitaire serait à l'origine d'une diminution des performances de croissance des animaux. Une étude a montré que des veaux infectés par *S. cruzi* présentaient une diminution significative du GMQ et avaient des poids finaux, à l'abattage, plus faibles que des veaux sains. Malgré cela, la qualité de la viande ne serait pas altérée (Dauguschies et al., 2000). Mais du point de vue économique, l'évaluation de ces pertes est très difficile dans la mesure où les diminutions des performances peuvent avoir de très nombreuses causes au cours de la vie d'un animal.

- Maladie clinique

La maladie clinique peut être à l'origine de pertes économiques, par la diminution des performances de croissance, la chute de la production de lait,... qu'elle entraîne. Cependant, les sarcosporidioses aiguës sont très rares et ne sont pratiquement jamais diagnostiquées, si bien qu'il n'est pas possible de quantifier les pertes engendrées.

Aux Etats-Unis, une estimation, incluant les conséquences de la forme sub-clinique et de la forme clinique, a été faite pour l'année 1984 et a évalué les pertes à 95 millions de dollars (Fayer & Dubey, 1986).

- Sarcosporidiose intestinale

Les pertes économiques de la sarcosporidiose intestinale chez les hôtes définitifs sont également impossible à évaluer en pratique. Les symptômes étant très rarement présents, le diagnostic de certitude pratiquement jamais réalisé et les traitements éventuels uniquement symptomatiques, celles-ci sont probablement peu élevées.

6. MOYEN DE LUTTE

6.1. Chez l'hôte définitif

Les moyens de lutte contre la sarcosporidiose intestinale sont uniquement préventifs car il n'existe pas de réel traitement curatif de celle-ci (Desportes-Livage & Datry, 2005). La prophylaxie sanitaire est axée sur l'évitement de la consommation de viande bovine contenant des kystes infectieux.

Deux méthodes sont possibles. La première est la consommation de viande suffisamment cuite. Les bradyzoïtes sont tués après cuisson pendant 20 minutes à 60°C, 15 minutes à 70°C ou 5 minutes à 100°C. L'autre méthode assurant l'assainissement des viandes est la congélation à -5°C pendant 48 heures ou -20°C pendant 24h (Fayer, 2004).

Concernant les carnivores domestiques, l'alimentation doit être à base d'aliments industriels, ou de viandes ayant subi les traitements assainissants ci-dessus.

6.2. Chez l'hôte intermédiaire

Chez les bovins, plusieurs traitements sont possibles, notamment pour la sarcosporidiose aiguë. Ils ne sont pas spécifiques, puisqu'inspirés des traitements de la coccidiose intestinale et ne sont pas actifs sur les phases kystiques (Desportes-Livage & Datry, 2005). Ici encore les seuls moyens de lutte envisageables sont les moyens préventifs. Ainsi, la mise en place de bonnes pratiques d'hygiène et l'écartement des carnivores domestiques et sauvages des zones d'élevage doivent permettre de limiter la contamination des aliments, de l'environnement et de l'eau par des fèces humaines ou de canidés et félinés. Si toutefois des zones ne peuvent être assainies, il est primordial d'empêcher les bovins d'accéder à celles-ci (Fayer, 2004).

Deuxième Partie : **Etude expérimentale**

1. CADRE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Ce travail a été réalisé de mars à septembre 2014 au sein de l'unité HQA-Secalim (UMR 1014 INRA), à Oniris.

Les données bibliographiques suggèrent l'implication de *Sarcocystis spp.* dans l'apparition des lésions de myosite éosinophilique, mais le lien entre les deux est encore méconnu. De plus, en Pays de la Loire, la race Blonde d'Aquitaine est particulièrement concernée par les saisies pour myosite éosinophilique, ce qui justifie pleinement une étude dans cette population.

Les objectifs de cette étude étaient donc :

- de préciser la prévalence de *Sarcocystis spp.* chez les bovins de race Blonde d'Aquitaine,
- de déterminer les espèces incriminées chez les bovins Blonde d'Aquitaine saisis pour myosite éosinophilique et chez les bovins Blonde d'Aquitaine non atteints,
- d'explorer des effets liés aux animaux (race, âge, poids...) sur l'apparition de lésions de myosite éosinophilique,
- d'explorer des effets liés à l'environnement et à la conduite d'élevage sur l'apparition de lésions de myosite éosinophilique.

Afin d'atteindre ces objectifs, une première phase expérimentale était axée sur l'analyse de prélèvements musculaires afin de déterminer la ou les espèces de *Sarcocystis* présentes. En parallèle, une étude de la conduite d'élevage, chez des élevages pour lesquels un prélèvement avait été réalisé, a été mise en place afin de rechercher un lien entre l'apparition de myosite éosinophilique et certaines étapes clés de la vie de l'animal.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Etude de population

2.1.1. Caractéristiques des bovins de race Blonde d'Aquitaine saisis pour myosite éosinophilique

Afin de réaliser une description des bovins de race Blonde d'Aquitaine saisis pour myosite éosinophilique (ME), la population de bovins Blonde d'Aquitaine saisis pour ME et la population de bovins Blonde d'Aquitaine non saisis ont été comparées. Il y a donc deux populations :

- la première population, **Pabattus**, correspond à tous les bovins de race Blonde d'Aquitaine, abattus en Pays de la Loire et non saisis, du 01/01/2013 au 31/12/2013. Elle comporte **42 703 bovins**.

- la seconde population, **Psaisis**, correspond à tous les bovins de race Blonde d'Aquitaine, abattus en Pays de la Loire et saisis pour myosite éosinophilique, du 01/01/2013 au 31/12/2013. Elle comporte **192 bovins**.

Les deux populations sont donc complètement distinctes, de façon à limiter les interférences qu'il y aurait si une des deux populations était une sous-population de l'autre.

Des tests de **Khi²** d'homogénéité ont été réalisés afin de comparer les populations Pabattus et Psaisis selon différentes modalités qualitatives (conformation...). Ces tests, réalisés avec le logiciel R® ou avec le site internet BioStaTGV® (Huet et al., 2011), utilisant également le logiciel R®, vise à affirmer ou exclure l'hypothèse H_0 : « la répartition des modalités est la même dans les deux populations observées ».

Une p-value est calculée, elle correspond à la probabilité de rejeter H_0 à tort. Autrement dit, pour un risque d'erreur fixé, si la p-value est inférieure à ce risque alors on considère qu'on peut rejeter H_0 ; si elle est supérieure à ce risque, on accepte H_0 . Dans notre étude, le risque d'erreur a été fixé à 5%.

Le test du Khi^2 n'est valide que si les effectifs théoriques sont tous supérieurs ou égaux à 5. Lorsque cette condition n'était pas vérifiée, un **test exact de Fisher** a été réalisé. Ce test permet de calculer directement la p-value. Le risque d'erreur a été fixé à 5% également.

Lorsque les variables étudiées sont continues (le poids, l'âge...), un test de **Student** a été réalisé. Ce test permet de comparer les moyennes d'une variable dans les deux populations. L'hypothèse nulle H_0 est l'égalité des moyennes et cette hypothèse est rejetée lorsque la p-value est inférieure au risque d'erreur, fixé pour notre étude à 5%.

Ce test nécessite d'avoir, d'une part, des effectifs totaux supérieurs à 30 et, d'autre part, l'égalité des variances entre les deux populations. Cette dernière condition est vérifiée par un test de **Fisher-Snedecor**. Lorsque cette condition n'était pas vérifiée, un test de **Welch** était alors réalisé pour comparer les moyennes.

Tous ces tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel R®.

Pour les variables qualitatives présentant une différence significative entre les deux populations étudiées, des odds ratio (OR) ont été calculés. Dans notre étude, ils permettent de quantifier le risque relatif d'une population à risque d'être saisies par rapport à la population non à risque. Un intervalle de confiance à 95% de ces odds ratio a été calculé, par la méthode de Woolf.

Pour les variables continues, des boîtes de dispersion ont également été réalisées, avec le logiciel Excel®. Ces graphes permettent d'apprécier la répartition des valeurs d'une modalité (Figure 9).

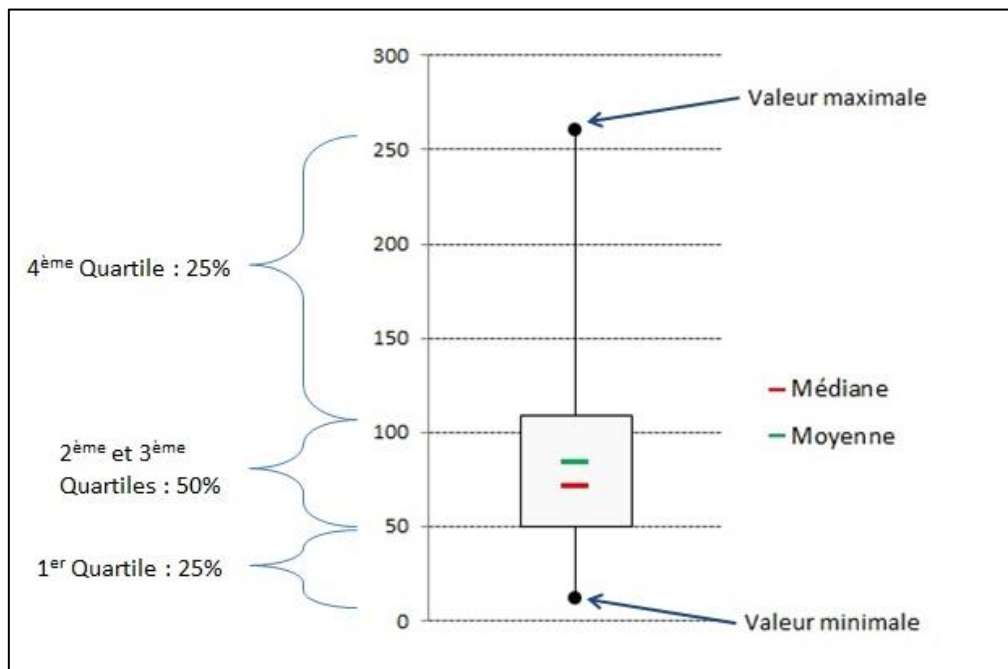


Figure 9 : Schéma d'explication de l'interprétation d'une boîte de dispersion

2.1.2. Comparaison des bovins saisis de race Blonde d'Aquitaine à des bovins saisis de race Charolaise

Afin de rechercher une éventuelle prédisposition de la race Blonde d'Aquitaine vis-à-vis de l'apparition des lésions de ME, la population de bovins de race Blonde d'Aquitaine a été comparée à la population de bovins de race Charolaise. La race Charolaise a été choisie car elle présente un taux très faible de saisies pour ME et présente une conduite d'élevage assez proche de celle de la Blonde d'Aquitaine. Nous avons donc quatre populations :

- la première population, **Pabattus**, correspond à tous les bovins de race Blonde d'Aquitaine, abattus en Pays de la Loire et non saisis, du 01/01/2013 au 31/12/2013. Elle comporte **42 703 bovins**.

- la population **Psaisis** correspondant à tous les bovins de race Blonde d'Aquitaine, abattus en Pays de la Loire et saisis pour myosite éosinophilique, du 01/01/2013 au 31/12/2013. Elle comporte **192 bovins**.

- la population **Pcharo** correspondant à tous les bovins de race Charolaise, abattus en Pays de la Loire et non saisis, du 01/01/2013 au 31/12/2013. Elle comporte **124 007 bovins**.

- la population **Pcharosaisis** correspondant à tous les bovins de race Charolaise, abattus en Pays de la Loire et saisis pour myosite éosinophilique, du 01/01/2013 au 31/12/2013. Elle comporte **30 bovins**.

Afin de comparer ces quatre populations, des tests de **Khi²** ont été réalisés pour les variables qualitatives, ou des **tests exacts de Fisher** lorsque les effectifs théoriques étaient inférieurs à 5. Pour les variables continues, des tests de **Student** ou des tests de **Welch** ont été utilisés selon l'égalité ou non des variances. Pour tous ces tests, le risque d'erreur a été fixé à 5%. De même, des boîtes de dispersion ont été créées pour les variables continues et des odds ratio ont été calculés pour les variables qualitatives.

2.2. Analyse biomoléculaire

2.2.1. Echantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés par le vétérinaire de BOVILOIRE sur 79 bovins adultes femelles (vache ou génisse) de race Blonde d'Aquitaine abattus entre octobre 2013 et juin 2014 dans les Pays de la Loire et provenant d'élevages localisés dans les Pays de la Loire. Parmi ces bovins, 44 ont fait l'objet d'une saisie pour motif de myosite éosinophilique et 35 témoins ne présentaient aucune lésion et étaient issus d'élevage n'ayant eu aucune saisie pour myosite éosinophilique au cours des 8 dernières années.

Notre étude étant consécutive à celle de Bertin en 2013, les données d'analyses par PCR Multiplex des prélèvements de bovins adultes femelles de race Blonde d'Aquitaine ont été ajoutées aux données d'analyses PCR de notre étude. Cela a permis d'ajouter les résultats d'analyse de 37 bovins saisis pour myosite éosinophilique et 7 bovins non saisis, issus d'élevages n'ayant pas eu de saisies au cours des 8 dernières années (Bertin, 2013).

Ainsi, un total de 81 bovins saisis et 42 bovins témoins ayant fait l'objet de prélèvements ont été introduits dans notre étude.

Sur chaque animal, 2 prélèvements d'environ 200g ont été effectués :

- un prélèvement de **muscle lésionnel** (L) observé à l'abattoir et ayant conduit à la saisie, quel que soit le muscle concerné.
- un prélèvement de **myocarde** (C).

Pour les animaux témoins, le prélèvement de muscle lésionnel est remplacé par un prélèvement de caparaçon (également noté L), partie de la carcasse comprenant la poitrine, les côtes et les muscles abdominaux. De façon à obtenir la plus grande homogénéité possible dans les prélèvements, lorsque, chez les animaux saisis, le caparaçon était lésé, il était choisi en priorité.

Pour certains animaux témoins, un prélèvement pouvait manquer (le cœur la plupart du temps), à cause de la perte de la traçabilité entre la carcasse et les abats, qui suivent des circuits différents. Parfois seul le cœur était présent en atelier de découpe lorsque la carcasse était vendue pour la boucherie.

De même, pour les animaux saisis, il était parfois difficile de retrouver le cœur correspondant à la carcasse. Les différents prélèvements sont répertoriés dans le Tableau VI.

Tableau VI : Nombre de prélèvements par catégorie de muscles (C : myocarde, L : lésion/caparaçon) en fonction de la saisie ou non de la carcasse pour myosite éosinophilique

Qualité de la carcasse	Prélèvements en 2014		Données de Bertin, 2013		Total
	Type de prélèvement		Type de prélèvement		
	L	C	L	C	
Carcasse saisie	44	30	37	37	148
Carcasse non saisie	32	31	7	0	70

Bien qu'il y ait une différence d'effectif entre les prélèvements de muscles squelettiques et de myocarde, les proportions sont conservées au sein populations saisie et témoin. En effet, les prélèvements de myocarde constituent 45% des prélèvements pour chacune des populations.

L'identification des prélèvements comprend :

- une première lettre, **s**, si le prélèvement est fait sur une carcasse saisie, ou **t**, s'il s'agit d'un prélèvement témoin.
- une seconde lettre correspondant au muscle prélevé : **C** pour myocarde, et **L** pour muscle lésionnel ou caparaçon.
- un **numéro**, correspondant à son numéro d'ordre de prélèvement.

Par exemple, le prélèvement sC10 correspond au prélèvement de myocarde sur la carcasse saisie numéro 10.

Lors des prélèvements sur les animaux témoins, la difficulté était d'obtenir des animaux non saisis et provenant d'élevage n'ayant eu aucune saisie lors des 8 dernières années. Plusieurs animaux ont été prélevés en atelier de découpe et finalement exclus de l'étude après vérification des antécédents de l'élevage. Mais dans un souci de clarté lors des manipulations au laboratoire, nous avons conservé le numéro initial de chaque prélèvement. Ainsi, le prélèvement tC51 correspond au prélèvement de myocarde du 35^{ème} et dernier témoin.

Une fois le prélèvement réalisé, il est placé au congélateur, à -20°C, en attente de l'analyse biomoléculaire.

2.2.2. 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), dont le protocole détaillé est présenté dans l'Annexe 1.

L'objectif de cette étape est de digérer les fibres musculaires et la paroi des kystes sarcosporidiens éventuellement présents, afin de libérer les éléments parasitaires qu'ils contiendraient.

Les échantillons sont mis à décongeler au réfrigérateur à 4°C la veille de leur digestion enzymatique. Pour chacun d'eux, 200g sont pesés et broyés à l'aide d'un mixeur électrique ménager puis 20g de cette viande hachée sont ajoutés à 100mL d'une solution de digestion enzymatique. Cette solution contient de l'acide chlorhydrique, de la pepsine Merck®, du sel et de l'eau distillée. Le mélange est agité au bain-marie à 37°C pendant 30 minutes.

Après cette étape, le broyat obtenu est filtré avec un tamis métallique de 400 µm de diamètre. Le filtrat obtenu est mis à décanter dans une ampoule de décantation pendant 30 minutes.

Le culot de décantation est récupéré et placé dans 5 tubes à congélation (ou cryotubes), de 1,5 mL, qui sont congelés à -20°C en attente des étapes suivantes.

2.2.3. Extraction de l'ADN

Pour chaque échantillon, un cryotube de 1,5 mL est mis à décongeler avant le début de la manipulation, à 4°C. Nous avons utilisé pour cette étape le kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel). Le protocole détaillé est présenté dans l'Annexe 2. L'objectif de cette étape est d'extraire l'ADN présent dans les échantillons et notamment l'ADN de *Sarcocystis*.

Les premières étapes du protocole permettent la lyse des différents constituants cellulaires puis la fixation de l'ADN sur une membrane de silice. Les étapes suivantes permettent de laver cette membrane de tout constituant autre que de l'ADN. Enfin, la dernière étape permet de remettre en solution l'ADN, en le détachant de la membrane de silice.

La solution finale est placée dans un tube eppendorf et congelée à -20°C en attente des étapes suivantes.

2.2.4. PCR Multiplex et électrophorèse

Cette étape permet l'amplification de l'ADN de *Sarcocystis* puis sa détection via l'électrophorèse. Le protocole de PCR Multiplex, présenté en Annexe 3, a été mis au point par Chiesa *et al.*, 2011. Il permet de mettre en évidence la présence de chacune des 3 espèces de *Sarcocystis* pouvant infecter le bovin.

Cette méthode repose sur l'amplification d'une séquence de l'ADN codant l'ARNr 18S des parasites. Quatre amorces sont utilisées : 1 amorce anti-sens commune aux 3 espèces de *Sarcocystis*, et 3 amorces sens, chacune spécifique d'une des 3 espèces de *Sarcocystis* (Tableau VII).

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

Espèces	Position de l'amorce sens (taille de l'amorce)	Position de l'amorce anti-sens (taille de l'amorce)	Taille de l'amplicon
<i>S. hirsuta</i>	250-268 (18 pb)	342-360 (18 pb)	108 pb
<i>S. hominis</i>	165-182 (17 pb)		182 pb
<i>S. cruzi</i>	50-74 (24 pb)		284 pb

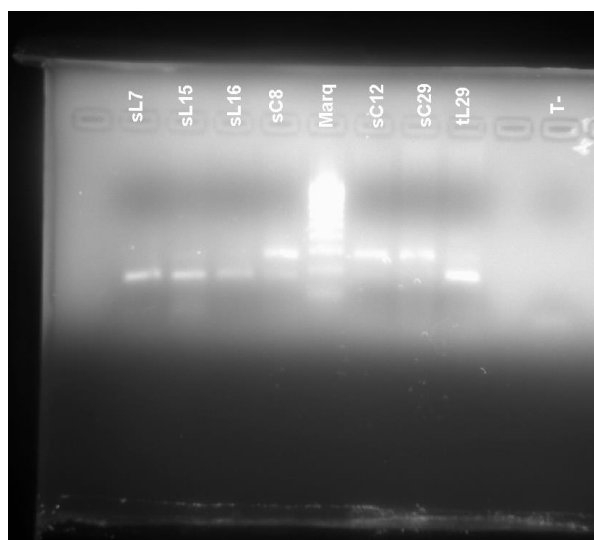
pb : paires de bases

Les amplicons sont de tailles suffisamment différentes pour être bien séparés par la migration lors de l'électrophorèse, ce qui permet la détection simultanée des 3 espèces de *Sarcocystis*.

L'électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose à 2% dans du TBE (Tris Borate EDTA) 0,5X. Dans chaque puits sont déposés 25 µL de produits de PCR et 5 µL de solution de dépôt. La migration a lieu à 100 Volts, 400 mA, pendant 45 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 un ordinateur. Un échantillon est positif quand au moins une bande blanche entre 100 pb (paires de bases) et 300 pb est visible, ce qui signifie la présence d'une ou plusieurs espèces de parasites. Les poids moléculaires sont lus à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire, permettant l'identification des espèces.

Un exemple de gel et son tableau de lecture sont donnés dans la Figure 10 et l'ensemble des gels d'électrophorèse et leurs tableaux de lecture sont présentés en Annexe 4.



Gel de la PCR numéro 10	
Echantillon	Résultat
sL7	Positif pour <i>S. hominis</i>
sL15	Positif pour <i>S. hominis</i>
sL16	Positif pour <i>S. hominis</i>
sC8	Positif pour <i>S. cruzi</i> et <i>S. hominis</i>
sC12	Positif pour <i>S. cruzi</i>
sC29	Positif pour <i>S. cruzi</i>
tL29	Positif pour <i>S. hominis</i>
T - = témoin négatif	Négatif
Marq = Marqueur de poids moléculaire 100 pb	

Figure 10 : Gel d'électrophorèse de la PCR 10 avec sa grille de lecture

Pour vérifier le bon fonctionnement de la PCR et l'absence de contamination des différents prélèvements lors des manipulations, nous avons utilisé un témoin négatif et un témoin positif. Le témoin négatif était composé d'eau filtrée et autoclavée. Le témoin positif était un extrait de plasmide de clonage, réalisé par Bertin, 2013, à partir d'un extrait d'ADN fiable. Ce témoin positif est introduit dans le but de vérifier le bon déroulement de la PCR et a été utilisé principalement lors des premières PCR mais n'était plus introduit une fois le protocole bien en place.

2.2.5. Interprétation des résultats et étude statistique

Un prélèvement est déclaré positif pour le portage d'une espèce de *Sarcocystis* si au moins une fois, à l'électrophorèse, une bande, correspondant à l'espèce en question, apparaît.

Un bovin est déclaré infecté par l'espèce de *Sarcocystis* si au moins un de ses prélèvements est déclaré positif pour cette espèce.

Des tests de **Khi²** d'homogénéité ont été réalisés afin de comparer le portage parasitaire dans la population d'animaux saisis et dans la population d'animaux témoins, avec un risque d'erreur fixé à 5%. Lorsque les effectifs théoriques étaient inférieurs à 5, des tests exacts de **Fisher** ont été réalisés, avec un risque d'erreur fixé à 5% également.

2.3. Etude de la conduite d'élevage

2.3.1. Questionnaire d'enquête

L'étude de la conduite d'élevage a été menée par une enquête, via un questionnaire dont les réponses ont été récupérées directement en élevage auprès des éleveurs. Ce questionnaire, présenté en Annexe 5, a été mis au point en coopération avec les étudiants de 3^{ème} année de l'Ecole Supérieure d'Agriculture d'Angers (Groupe ESA), à partir d'un questionnaire réalisé par BOVI-LOIRE. Il devait être le plus complet possible, puisqu'il n'y a aucune donnée bibliographique à ce propos.

Il comportait plusieurs rubriques :

- Coordonnées de l'élevage et historique des cas de saisies pour myosite éosinophilique
- Présentation générale de l'élevage
Cette partie a permis de regrouper des données concernant le nombre d'animaux, les types de productions, le logement, la gestion de la reproduction et des mises bas...
- Alimentation des animaux
Des questions étaient posées à propos du type d'aliment donné et la quantité apportée, selon l'âge des animaux et la phase de production. En particulier, la phase d'engraissement a été particulièrement étudiée.
- Risque sanitaire lié à l'alimentation et à l'abreuvement
Les questions de cette rubrique visaient à explorer une potentielle transmission d'ookystes par l'alimentation en élevage. Le lieu de stockage des aliments fourragés, le mode de distribution des aliments, la provenance des aliments...ont été étudiés. De même, l'origine de l'eau d'abreuvement ainsi que son état sanitaire ont fait l'objet de questions.
- Pâturage et environnement à proximité des pâtures
Cette rubrique avait pour objectif de cibler les risques de transmission au pâturage. Ainsi, la période de pâturage, la présence d'eau, de station d'épuration, de faunes sauvages, d'humains, de terrains inondables l'hiver...ont été étudiées.
- Situation sanitaire de l'élevage
Dans cette rubrique, différents points ont été ciblés :
 - Des questions concernant les risques sanitaires à travers la litière et la gestion du fumier. Il était également sujet de la gestion des délivrances lors des mises-bas.
 - D'autres questions traitaient du nettoyage des bâtiments, des abreuvoirs, du matériel de l'exploitation.
 - Les protocoles vaccinaux du cheptel ainsi que la présence de maladies récurrentes faisaient l'objet de questions, le but étant de faire un point sur le statut immunitaire des animaux et la pression infectieuse dans l'élevage.
 - La gestion du parasitisme a également été étudiée, selon l'âge des animaux. Une question spécifique pour la période d'engraissement a été introduite. De même, les anticoccidiens faisaient l'objet de questions spécifiques.Pour les élevages ayant eu des saisies pour myosite éosinophilique, il était demandé si les traitements contre les parasites internes étaient différents avant l'apparition du premier cas.
 - Enfin, il était demandé si l'élevage avait déjà eu des cas de cysticercoses et/ou de saisies de foie à cause de la présence de douves, lors des 8 dernières années.

- Risque de contamination par l'homme
 Cette rubrique avait pour objectif d'étudier toutes les situations à risques pouvant entraîner la présence de fèces humaines pouvant contaminer les bovins. Ainsi des questions concernant la proximité des habitations environnantes, les raccordements des sanitaires, les activités annexes... ont été posées.
 La consommation de viande bovine par les éleveurs a aussi été ciblée, afin de rechercher si le déroulement complet cycle de *S. hominis* était possible dans l'élevage étudié.
- Risque de contamination par les animaux
 Afin de rechercher les risques de transmissions d'ookystes par les animaux, domestiques et sauvages, à proximité des bovins, il était demandé aux éleveurs s'ils avaient noté la forte présence de certains animaux (rongeurs, oiseaux, gibiers...) à proximité des pâtures et/ou à proximité des bâtiments de l'exploitation. Bien que certains animaux ne semblent pas intervenir dans le cycle des espèces de *Sarcocystis* transmissibles aux bovins, comme les rongeurs par exemple, ils sont décrits comme vecteurs d'ookystes potentiels. Nous avons donc essayé d'avoir une liste d'animaux la plus complète possible, sans pour autant être exhaustives. Une question concernant la dératisation et sa fréquence a été introduite.
 Enfin, des questions au sujet des carnivores domestiques (chiens et chats) étaient présentes. Elles portaient sur leur alimentation et sur leurs traitements éventuels contre les parasites internes. D'autres questions traitaient de la gestion de leurs excréments.

Ce questionnaire a ensuite été présenté en élevage, après contact téléphonique permettant de fixer un rendez-vous.

2.3.2. Population d'étude

L'objectif était de comparer les conduites d'élevages dans des élevages ayant eu des saisies pour myosite éosinophilique aux élevages n'ayant pas eu de cas depuis les 8 dernières années. L'ensemble des élevages ayant eu un ou plusieurs bovins prélevés dans le cadre de notre étude a été contacté afin de leur présenter le questionnaire. Nous avons donc deux populations :

- La population **Cas**, correspondant aux élevages de Pays de la Loire ayant des bovins de race Blonde d'Aquitaine ayant eu un animal saisi pour myosite éosinophilique entre octobre 2013 et mai 2014 et pour lesquels un questionnaire a été rempli. Cette population comporte **29** élevages, dont **23 récidivistes** (ayant eu au moins 2 cas au cours des 8 dernières années).
- La population **Témoin**, correspondant aux élevages de Pays de la Loire ayant des bovins de race Blonde d'Aquitaine n'ayant eu aucun animal saisi pour myosite éosinophilique au cours des 8 dernières années, pour lesquels un animal a pu faire l'objet d'un prélèvement de muscles entre octobre 2013 et mai 2014, et ayant rempli un questionnaire. Cette population comporte **25** élevages.

Les deux populations sont donc définies selon **l'absence ou l'existence de saisies pour myosite éosinophilique**. Ainsi, aucune information concernant la sarcosporidiose et les espèces de *Sarcocystis* impliquées n'a été introduite dans les critères de sélection.

2.3.3. Organisation de la base de données et étude statistique

La base de données se présente sous la forme d'un fichier Excel®, dans lequel chaque ligne correspond à un élevage et chaque colonne à une question (ou variable). Au total, 203 colonnes ont été introduites. Lorsqu'une question ne concernait pas un élevage, la case correspondante était laissée vide.

Cette base de données a été conçue afin d'étudier le lien entre l'apparition de lésions de ME et la conduite d'élevage, ce qui revient à comparer la population Cas à la population Témoin.

Premièrement, une analyse uni-variée de chaque variable a permis de faire un premier tri et de retirer les variables ne présentant pas d'intérêt pour la suite de l'analyse.

Cette première étape a été suivie d'une analyse bi-variée. Cette analyse permet de comparer des variables deux à deux. Plus précisément, elle permet de comparer une **variable expliquée** à différentes **variables explicatives**. Ces dernières correspondent aux différentes variables du questionnaire. Afin de répondre à notre objectif, deux groupes d'analyses ont été réalisés, chaque groupe représentant l'étude d'une variable expliquée.

La première variable expliquée était la variable « **Lot** » ayant pour modalités « C » pour Cas et « T » pour Témoin. L'objectif était donc d'étudier les effets de la conduite d'élevage sur l'apparition de myosites éosinophiliques.

Les élevages récidivistes ont fait l'objet d'une étude particulière. La variable « **Récidiviste** », avec pour modalités « OUI » et « NON » a donc été introduite et a été comparée à chacune des variables explicatives.

Pour l'analyse bi-variée, lorsque la variable explicative était une variable qualitative, un test du **Khi²** d'indépendance, ou lorsque les effectifs théoriques étaient inférieurs à 5, un test **exact de Fisher**, ont été réalisés.

Lorsque la variable explicative était continue, un test de **Student** ou un test de **Welch** ont été utilisés selon l'égalité ou non des variances, respectivement. Lorsque les effectifs totaux étaient inférieurs à 30, un test non paramétrique de **Mann-Whitney-Wilcoxon** a été réalisé.

Tous ces tests ont été réalisés avec le logiciel R®. A la suite de cette analyse, seules les variables ayant des p-value inférieures à **0,15** ont été retenues.

Enfin, une analyse multi-variée a été mise en place afin d'étudier l'influence des différentes variables retenues vis-à-vis de la variable expliquée tout en étudiant les corrélations entre les différentes variables explicatives. L'objectif étant à terme de ne conserver que quelques variables explicatives, non corrélées entre elles, pouvant expliquer la variable expliquée.

Dans un premier temps, une **régression logistique, avec une procédure descendante** a été mise en place avec le logiciel R®. La régression logistique est une méthode statistique qui permet de modéliser une variable expliquée à deux modalités (ce qui correspond donc à notre variable Lot), en fonction de plusieurs variables explicatives, par une combinaison linéaire. La **procédure descendante** est une procédure qui consiste à introduire dans la régression toutes les variables explicatives identifiées lors de l'analyse bi-variée et d'éliminer une à une les moins significatives (c'est-à-dire ayant les p-value les plus élevées). Cette méthode permet de retirer les variables explicatives fortement corrélées à d'autres et dont la pertinence vis-à-vis de la variable expliquée est faible. La procédure est arrêtée lorsqu'on n'obtient que des variables significatives et un critère d'information d'Akaike (AIC) le plus faible possible. Pour notre étude, le risque d'erreur a été fixé à 20%. On obtient alors un modèle linéaire liant une variable expliquée à plusieurs variables explicatives.

Afin de vérifier l'absence de corrélations entre les variables explicatives, une matrice de corrélation a été utilisée. Cette matrice permet de réaliser des tests de χ^2 d'indépendance entre les différentes variables introduites dans la matrice et d'afficher les différentes p-value dans un tableau. Le risque d'erreur a été fixé à 5%. Ainsi, les variables dont les p-value sont inférieures à 0,05 sont considérées comme étant corrélées. Pour ces variables, un **test de corrélation de Pearson**, réalisé avec le logiciel R®, permet d'étudier la corrélation entre ces variables : elle est considérée comme faible pour une valeur comprise entre -0,3 et 0,3, moyenne pour valeur comprise entre -0,6 et -0,3 ou 0,3 et 0,6, forte pour une valeur comprise entre -1 et 0,6 ou 0,6 et 1.

Après l'élaboration du modèle linéaire, la validité de ce dernier doit être vérifiée. Une **Analyse Factorielle Multiple (AFM)** a été réalisée avec le logiciel R®. Il s'agit d'une méthode statistique permettant d'analyser plusieurs variables à la fois. Chaque individu (ou élevage dans notre étude) est représenté par méthode graphique, sur un plan factoriel, par un point. L'analyse de la carte permet de déterminer si nos deux populations (Cas et Témoins) sont bien séparées selon les variables retenues par le modèle linéaire.

L'AFM produit également un cercle de corrélation, qui retranscrit l'influence de chacune des différentes variables explicatives sur la variable expliquée. Concrètement, le cercle de corrélation des variables permet de voir qu'elles sont les variables qui influent le moins dans la distinction des deux populations. L'objectif est de mettre en évidence des variables de faible importance afin de simplifier le modèle mis à en place avec la régression logistique.

La dernière étape consiste à analyser les caractéristiques prévisionnelles du ou des modèles définis. Cette étape est réalisée avec la fonction **predict**, sous le logiciel R®. Cette fonction permet de reprendre les différents individus (ou élevage pour notre étude) ayant été utilisés pour la mise en place du modèle et de les soumettre au ou aux modèles. Les résultats du modèle sont ensuite comparés aux résultats réels. On obtient un tableau contenant 4 valeurs et qui permet le calcul de la sensibilité et de la spécificité du modèle (Tableau VIII).

Tableau VIII : Tableau regroupant les résultats de l'analyse de la prévision du modèle

		Situation réelle	
		Positif	Négatif
Prévision du modèle	Positif	VP	FP
	Négatif	FN	VN

VP : Vrai Positif / VN : Vrai Négatif / FP : Faux Positif / FN : Faux Négatif

Ainsi, la sensibilité et la sensibilité peuvent être calculées selon les formules suivantes :

$$\text{Sensibilité} = \frac{VP}{VP + FN} \qquad \text{Spécificité} = \frac{VN}{VN + FP}$$

La sensibilité correspond à la probabilité que le modèle donne une réponse positive pour un individu positif. La spécificité correspond à la probabilité que le modèle donne une réponse négative pour un individu négatif. Ces deux valeurs permettent ainsi de comparer différents modèles entre eux et d'objectiver la fiabilité d'un modèle. Pour notre étude, cela permet d'analyser la pertinence des facteurs de risque vis-à-vis de leur influence dans l'apparition de lésions de myosite éosinophilique.

3. RESULTATS

3.1. Etude de population

3.1.1. Caractéristiques des bovins de race Blonde d'Aquitaine saisis pour myosite éosinophilique

Les populations Pabattus et Psaisis ainsi que les pourcentages de saisis selon les catégories d'animaux sont présentés dans le Tableau IX :

Tableau IX : Présentation des effectifs des populations Pabattus et Psaisis et des pourcentages de saisis selon la catégorie d'animaux

Population	Catégorie					
	Jeune Bovin	Taureau	Bœuf	Vache	Génisse	Total
Pabattus	19737	614	239	17827	4286	42703
Psaisis	2	0	1	167	22	192
Pourcentage de saisis	0,0101	0	0,4167	0,9281	0,5107	0,4476

Les pourcentages de saisis pour myosite éosinophilique sont particulièrement importants pour les catégories bœuf, vache et génisse. Cependant, au cours de l'année 2013, un seul bœuf a été saisi. De même, aucun taureau et seulement deux jeunes bovins ont été saisis. Les catégories jeune bovin, taureau et bœuf ont donc été retirées des populations afin de concentrer l'étude sur les vaches et les génisses.

Il apparaît que les vaches blondes ont un taux de saisis d'environ 0,93 %, alors que celui des génisses est d'environ 0,51 %. Les génisses sont significativement moins saisis que les vaches (p -value = 0,007), avec près de deux fois moins de saisis pour les génisses par rapport aux vaches.

3.1.1.1. Type de saisie

La saisie des carcasses, que ce soit chez les vaches ou les génisses, est totale dans la grande majorité des cas, avec plus de 93% de saisis totales vaches et génisses confondues (Figure 11). Dans notre population, les saisis de vaches sont plus fréquemment des saisis totales que les saisis de génisse, de manière significative (p -value = 0,0488).

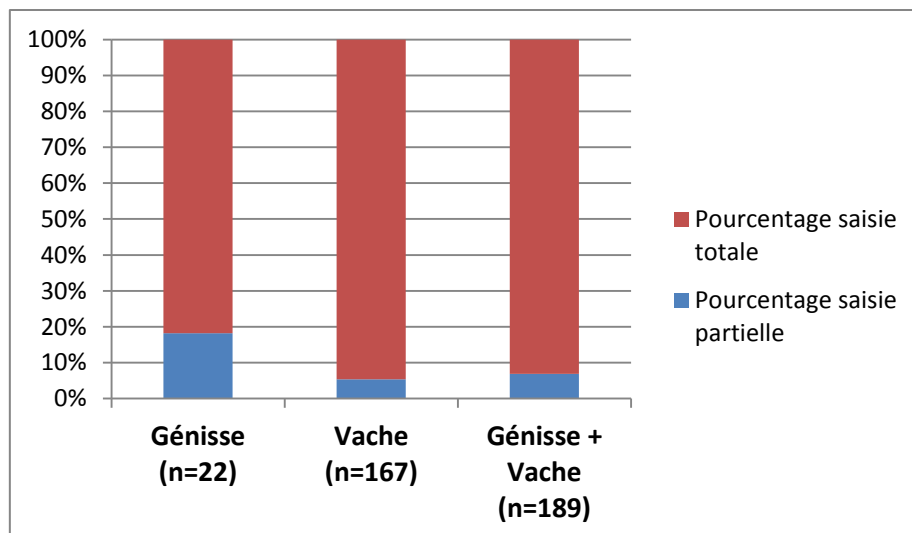


Figure 11 : Répartition des types de saisies en fonction de la catégorie de bovins

3.1.1.2. Age

Comme le montre la Figure 12, les vaches saisies sont significativement plus jeunes que la population de vaches non saisies, avec des moyennes respectives de 70,6 mois et 83,5 mois ($p\text{-value} = 5,607.10^{-8}$). Cependant, en tenant compte des écarts-types et des boîtes de dispersion, qui sont proches l'une de l'autre, ce qui signifie que plus de 50% des vaches des deux populations sont dans la même tranche d'âge (entre 48 et 109 mois à l'abattage), cette différence est à nuancer.

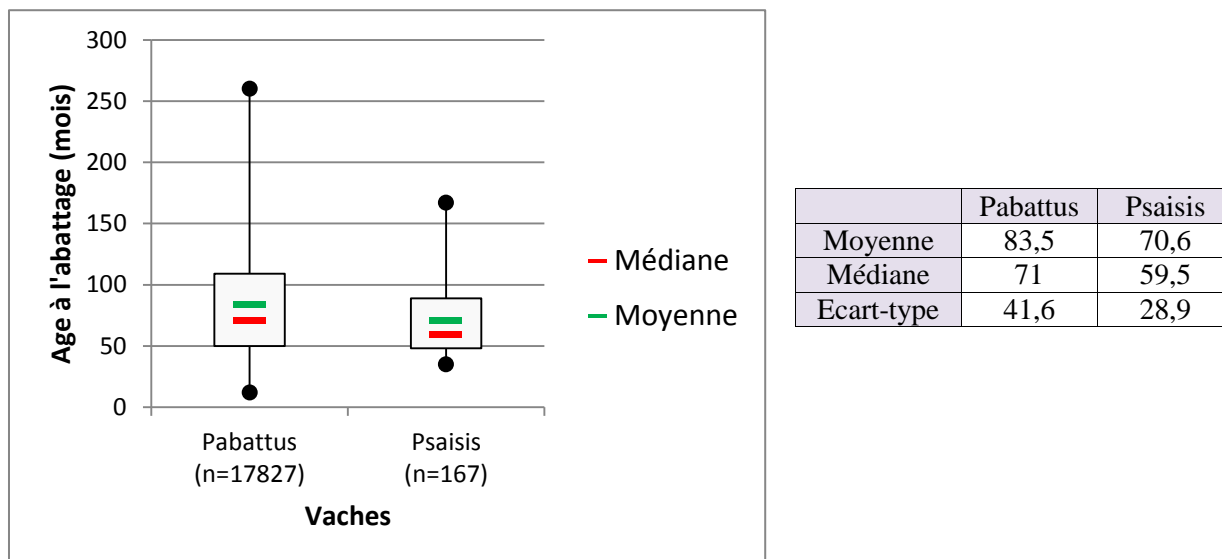
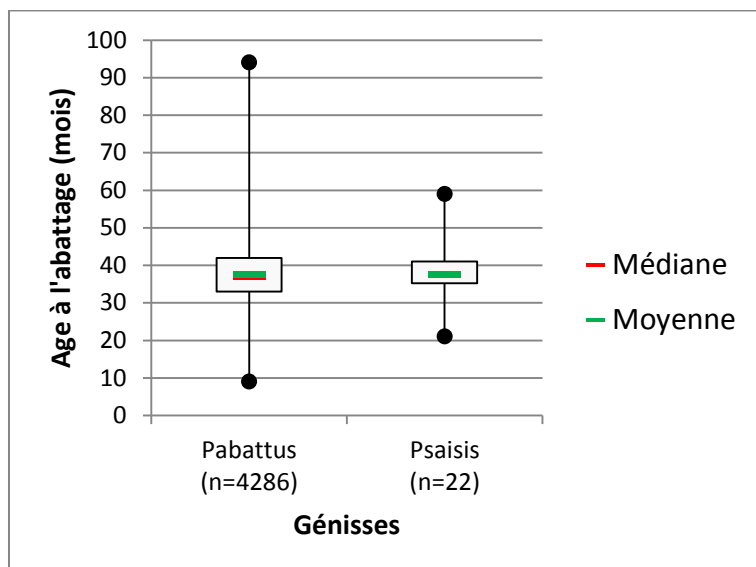


Figure 12 : Boîte de dispersion de l'âge à l'abattage des vaches dans les populations Pabattus et Psaisis

En ce qui concerne les génisses (Figure 13), les moyennes d'âge à l'abattage sont très proches (p -value = 0,9749), avec un âge d'abattage de 37,5 mois pour les génisses saisies et 37,6 pour les non saisies. De plus, les boîtes de dispersion sont au même niveau, il n'y a donc aucune différence en terme d'âge d'abattage des génisses des deux populations.

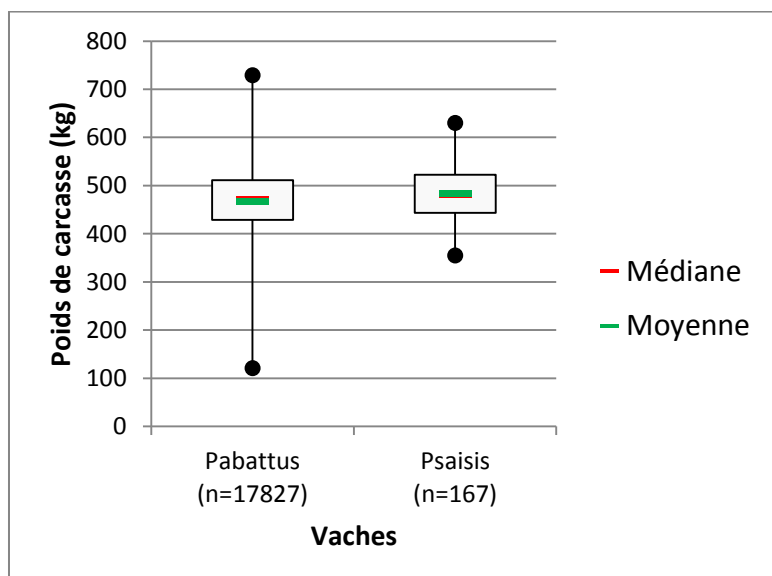


	Pabattus	Psaisis
Moyenne	37,6	37,5
Médiane	37	37,5
Ecart-type	7,8	7,3

Figure 13 : Boîte de dispersion de l'âge à l'abattage des génisses dans les populations Pabattus et Psaisis

3.1.1.3. Poids de carcasse

Le poids de carcasse moyen des vaches saisies est significativement (p -value = $3,09 \cdot 10^{-4}$) plus élevé que celui des vaches non saisies, avec des valeurs respectives de 484 kg et 466 kg. Cependant, comme pour l'âge d'abattage, les boîtes de dispersion sont très proches et les écarts-types importants. Cette différence est donc à nuancer (Figure 14).



	Pabattus	Psaisis
Moyenne	466	484
Médiane	471,2	481,6
Ecart-type	70	56

Figure 14 : Boîte de dispersion du poids de carcasse des vaches dans les populations Pabattus et Psaisis.

Pour les génisses, les poids moyens sont de 458 kg pour les animaux non saisis et de 462 kg pour les génisses saisies. Les poids de carcasse des génisses ne sont pas significativement différents (p -value = 0,7434). Ce résultat se retrouve à l'analyse des boîtes de dispersion (Figure 15) qui sont situées au même niveau.

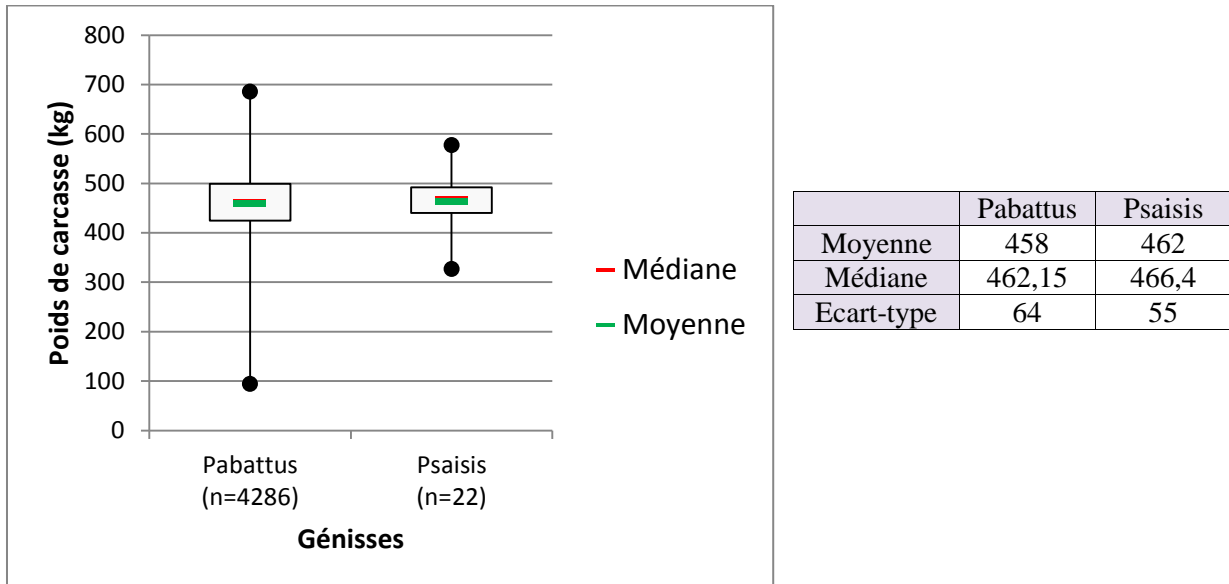


Figure 15 : Boîte de dispersion du poids de carcasse des génisses dans les populations Pabattus et Psaisis

3.1.1.4. Conformation

Les carcasses de vaches Blonde d'Aquitaine sont globalement de bonne conformation, avec plus de 60% des carcasses de classement U (Figure 16). Cependant les carcasses des vaches saisies sont significativement de meilleure conformation (p -value = 0,0211), avec 73% des carcasses ayant un classement E ou U contre 64% des carcasses non saisies ayant un classement E ou U.

Le calcul de l'odds ratio (OR) permet de conclure que les vaches de conformation E et U ont un risque relatif d'être saisies augmenté de 1,49 (Intervalle de confiance (IC) à 95% : [1,06-2,1]), ce qui reste modeste. Ce résultat peut expliquer que les vaches saisies ont un poids de carcasse supérieur aux vaches non saisies, puisque pour une race donnée, bonne conformation et poids sont souvent liés.

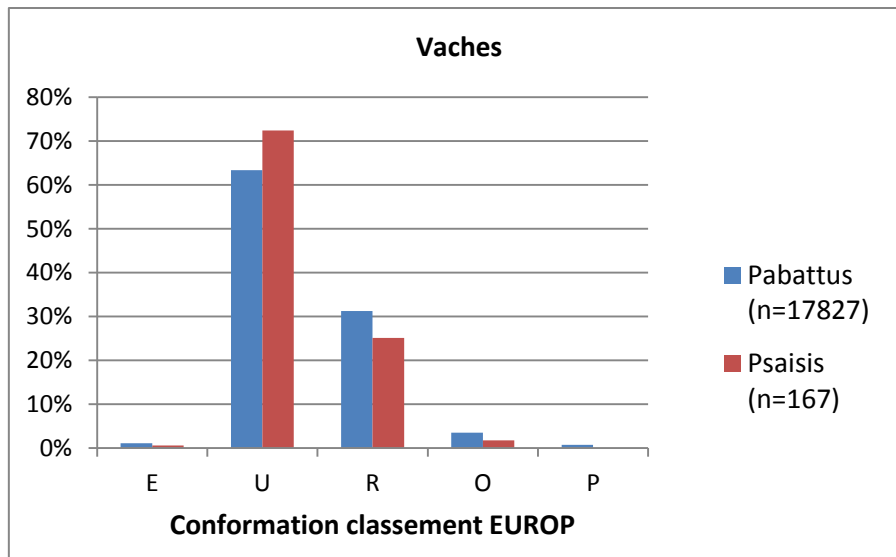


Figure 16 : Répartition des carcasses des vaches de Pabattus et Psaisis en fonction de leur conformation selon le classement EUROP

Cette répartition se retrouve également chez les génisses. Les carcasses sont de très bonne conformation dans les deux populations, avec plus de 75% de carcasses classées E ou U (Figure 17). Il semble qu'ici encore les carcasses de génisses saisies sont de meilleure conformation que celles des génisses non saisies, mais cette différence n'est pas significative (p-value = 0,104).

Par contre, en analysant chacune des conformations, il apparaît que les génisses de conformation U sont significativement plus souvent saisies que les génisses avec des carcasses d'une autre conformation (p-value = 0,0403). Le calcul de l'odds ratio permet de voir que les génisses de conformation U ont un risque près de 6 fois plus important d'être saisies par rapport aux génisses d'autres conformations (OR = 6,29 avec IC à 95% [0,84-46,82]).

Cependant, seulement 22 génisses ont été saisies. Ceci explique notamment l'intervalle de confiance très grand de l'odds ratio. Ces résultats sont donc à nuancer, bien qu'allant dans le même sens que ceux des vaches.

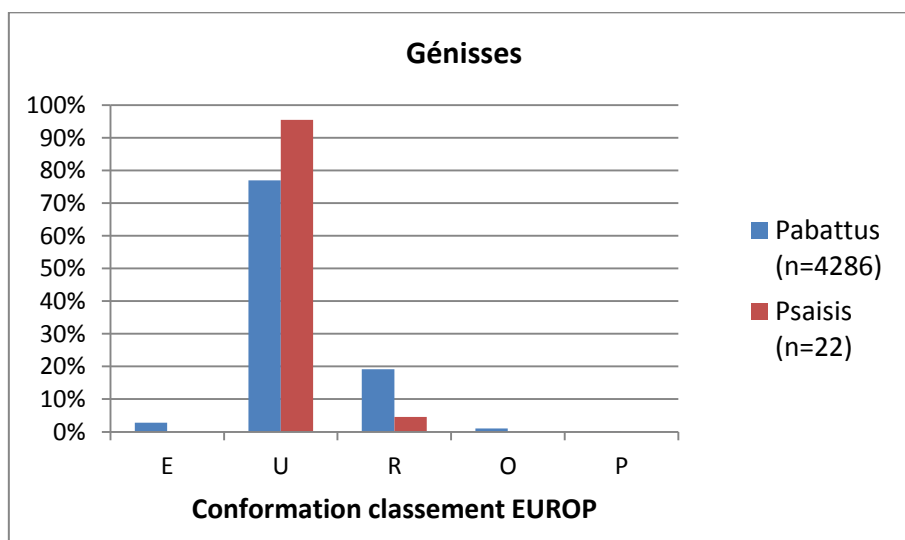


Figure 17 : Répartition des carcasses des génisses de Pabattus et Psaisis en fonction de leur conformation selon le classement EUROP

Bilan :

Après ces analyses, il apparaît, chez les bovins de race Blonde d'Aquitaine, que :

- Lorsqu'une carcasse est saisie, celle-ci est la plupart du temps totale, que ce soit pour les carcasses de vaches ou de génisses.
- En race Blonde d'Aquitaine, les vaches ont un taux de saisie près de 2 fois supérieur au taux de saisie des génisses.
- Les jeunes bovins, taureaux et bœufs ne sont que très rarement saisis.
- Les vaches saisies sont significativement de meilleure conformation que les vaches non saisies.
- Les génisses de classement de conformation U semblent avoir un risque relatif plus important d'être saisie.
- Les vaches saisies semblent avoir un poids de carcasse légèrement supérieur à celui des vaches non saisies.
- Il n'y a aucune différence d'âge et de poids de carcasse entre les génisses saisies et les génisses non saisies.

3.1.2. Comparaison des bovins Blonde d'Aquitaine et Charolais saisis pour myosite éosinophilique

Les populations Pabattus, Psaisis, Pcharo et Pcharosaisis et ainsi que les pourcentages de saisis selon les catégories d'animaux sont présentés dans le Tableau X :

Tableau X : Présentation des effectifs des populations Pabattus, Psaisis, Pcharo et Pcharosaisis et des pourcentages de saisies selon la catégorie d'animaux

Population	Catégorie					
	Jeune Bovin	Taureau	Bœuf	Vache	Génisse	Total
Pabattus	19737	614	239	17827	4286	42703
Psaisis	2	0	1	167	22	192
Pourcentage de saisies	0,0101	0	0,4167	0,9281	0,5107	0,4476
Pcharo	63605	2186	767	47888	9561	124007
Pcharosaisis	2	0	0	25	3	30
Pourcentage de saisies	0,003	0	0	0,052	0,031	0,024

Toutes catégories de bovins confondus, les bovins de race Blonde d'Aquitaine sont significativement plus saisis que les bovins de race Charolaise (p -value = 5.10^{-88}), avec des taux de saisies respectifs de 0,45% et 0,02%. Le calcul de l'odds ratio nous permet de voir que les bovins Blondes d'Aquitaine ont un risque relatif d'être saisis environ 19 fois plus grand par rapport aux bovins Charolais (OR = 18,59, IC à 95% = [12,65 – 27,32]), ce qui est très important. De plus, au sein des deux races, les vaches ont un taux de saisies près de deux fois supérieur au taux de saisies des génisses.

Les jeunes bovins, taureaux et bœufs sont très peu saisis, qu'ils soient de race Blonde d'Aquitaine ou Charolaise. Ces catégories seront donc exclues des analyses afin de se concentrer sur les catégories vache et génisse. Compte tenu du faible nombre de génisses saisis, notamment en race Charolaise, les catégories vache et génisse seront regroupées. Ainsi, le Tableau XI répertorie les nouveaux effectifs qui seront utilisés pour la suite des analyses.

Tableau XI : Présentation des effectifs des populations Psaisis et Pcharosaisis et des taux de saisies, en ne retenant que les vaches et les génisses

Population	Effectifs	Taux de saisies
Psaisis	189	0,848 (189/22302)
Pcharosaisis	28	0,049 (28/57477)

Ce regroupement permet de mettre en évidence une augmentation du taux de saisies dans la population Pcharosaisis. Ceci est expliqué par le nombre élevé de jeunes bovins abattus mais présentant un taux de saisies très faible (0,003%).

La comparaison des deux populations montre que les vaches et génisses de race Blonde d'Aquitaine sont significativement plus saisis que celles de race Charolaise ($p\text{-value} = 3.10^{-84}$), avec des taux de saisies respectifs de 0,848% et 0,049%. Le calcul de l'odds ratio permet d'établir que les vaches et génisses Blondes d'Aquitaine ont un risque relatif de saisies environ 18 fois plus grand que les Charolaises (OR = 17,54, IC à 95% = [11,79 – 26,09]).

3.1.2.1. Type de saisies

Les saisies sont le plus souvent totales, aussi bien pour la race Blonde d'Aquitaine que pour la race Charolaise, avec respectivement 93% et 79% de saisies totales (Figure 18). Cependant, les saisies totales de race Blonde d'Aquitaine sont significativement plus fréquentes que les saisies totales de race Charolaise ($p\text{-value} = 0,022$).

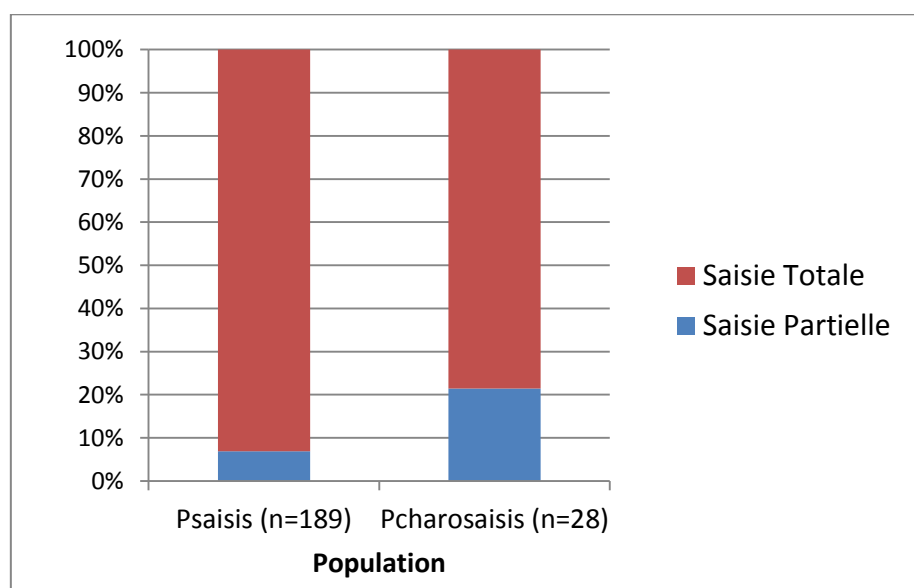


Figure 18 : Répartition des types de saisies dans Psaisis et Pcharosaisis

3.1.2.2. Age

Les âges moyens d'abattage des vaches et génisses saisies des deux races sont similaires (p -value = 0,48), avec une moyenne de 66,7 mois pour les Blondes d'Aquitaines et 62,5 mois pour les Charolaises (Figure 19). De même, l'analyse de la boîte de dispersion permet de voir que les répartitions des âges au sein des deux populations sont très semblables, avec toutefois près de 50% des Blondes d'Aquitaine ayant plus de 60 mois contre près de 25% pour les Charolaises.

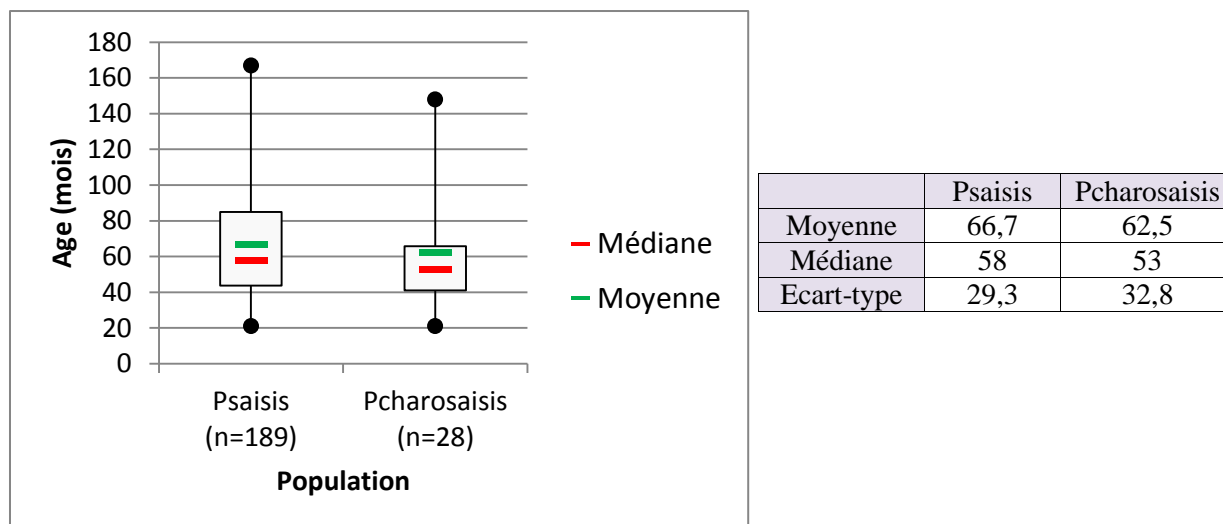


Figure 19 : Boîte de dispersion de l'âge à l'abattage dans les populations Psaisis et Pcharosaisis

En ce qui concerne les vaches et génisses non saisies les âges moyens d'abattage sont très proches, avec près de 75 mois pour les Blondes d'Aquitaines et les Charolaises (Figure 20). De même, les boîtes de dispersion sont très similaires, avec 50% des vaches et génisses des deux races abattues entre 50 et 100 mois.

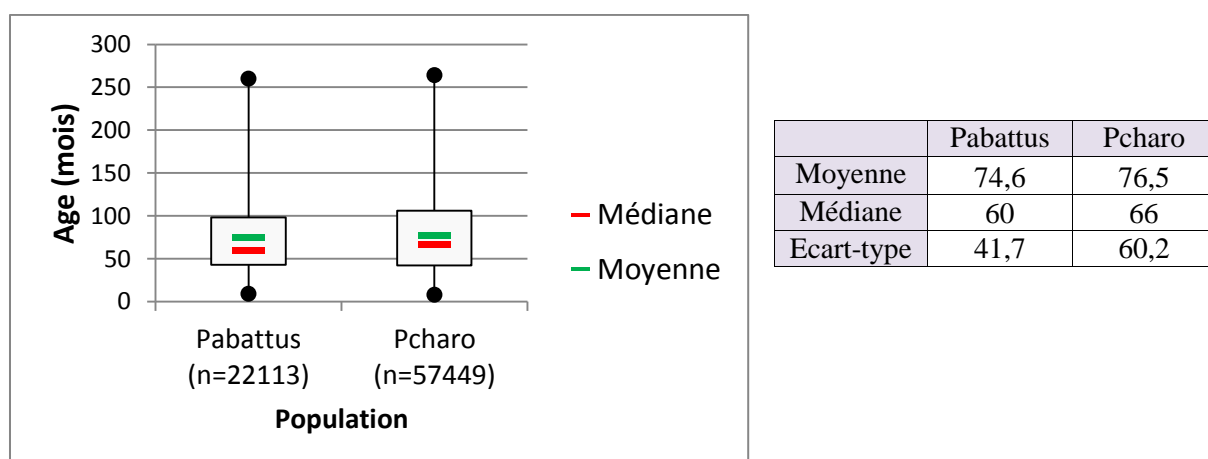
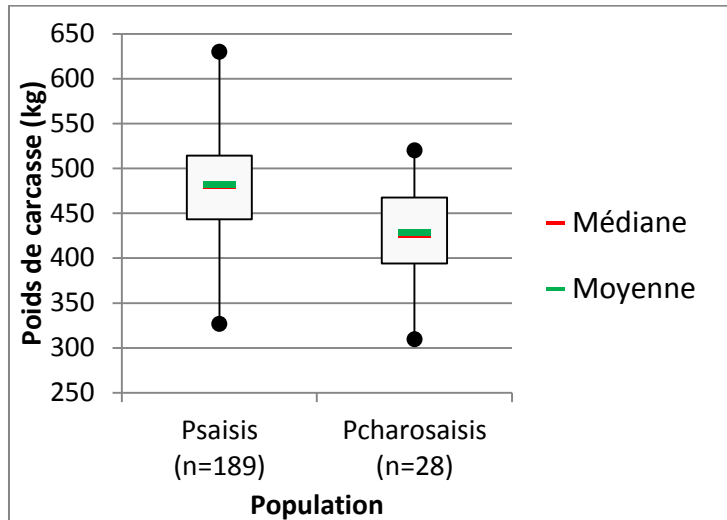


Figure 20 : Boîte de dispersion de l'âge d'abattage dans les populations Pabattus et Pcharo

Que ce soit en race Blonde d'Aquitaine ou en race Charolaise, les animaux saisis ont, en moyenne, le même âge que les animaux non saisis. On peut ne donc pas expliquer la différence des taux de saisies entre ces deux races par l'âge d'abattage.

3.1.2.3. Poids de carcasse

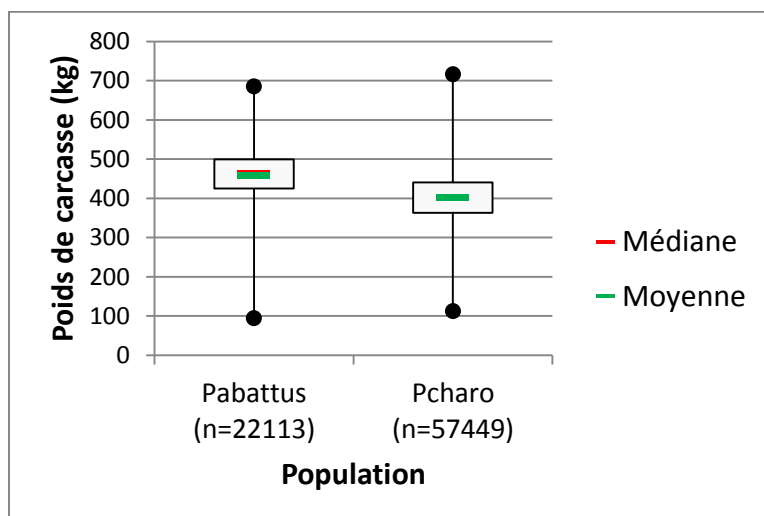
Les vaches et génisses saisies de race Blonde d'Aquitaine sont significativement plus lourdes, avec un poids de carcasse moyen de 481 kg, que les vaches et génisses saisies de race Charolaise, dont le poids de carcasse moyen est de 428 kg ($p\text{-value} = 4,6 \cdot 10^{-6}$). Cette différence est visible sur les boîtes de dispersion (Figure 21) : près de 75% des Blondes d'Aquitaine saisies ont un poids supérieur à 450kg alors que près de 75% des Charolaises saisies ont un poids inférieur à 450 kg.



	Psaisis	Pcharosaisis
Moyenne	481	428
Médiane	480,5	426,25
Ecart-type	56,6	49,4

Figure 21 : Boîte de dispersion du poids de carcasse dans les populations Psaisis et Pcharosaisis

La comparaison de ce résultat aux poids de carcasse des animaux non saisies permet de voir qu'il existe également une différence des poids de carcasses entre les deux races (Figure 22). En particulier, les vaches et génisses de race Blonde d'Aquitaine, avec un poids de carcasse moyen à l'abattage de 458 kg, sont significativement plus lourdes ($p\text{-value} = 2 \cdot 10^{-16}$) que les vaches et génisses de race Charolaise ayant un poids de carcasse moyen de 401 kg. De plus, environ 75% des Blondes d'Aquitaines ont un poids de carcasse supérieur à 425 kg alors que près de 75% des Charolaises ont un poids de carcasse inférieur à 425 kg.



	Pabattus	Pcharo
Moyenne	458	401
Médiane	462,2	402,8
Ecart-type	64	60,2

Figure 22 : Boîte de dispersion du poids de carcasse dans les populations Pabattus et Pcharo

La différence existant entre les poids de carcasses des animaux saisis pour myosite éosinophilique se retrouve donc entre les poids de carcasses des animaux non saisis, avec une différence moyenne de 53 kg entre les carcasses Blonde d'Aquitaine et Charolaise saisies et une différence moyenne de 57 kg pour les carcasses non saisies. Pour les deux races, les carcasses saisies semblent avoir un poids légèrement supérieur au poids des carcasses non saisies. Le poids de carcasse ne semble pas pouvoir expliquer la différence de taux de saisies qu'il existe entre les races Blonde d'Aquitaine et Charolaise.

3.1.2.4. Conformation

Plus de 90% des carcasses sont notées U ou R, pour les deux populations Psaisis et Pcharosaisis (Figure 23).

Mais les carcasses des vaches et génisses saisies de race Blonde d'Aquitaine sont significativement de meilleure conformation que les carcasses des vaches et génisses saisies Charolaise ($p\text{-value} = 6.10^{-6}$). Plus de 75% des Blondes d'Aquitaine saisies sont classées E ou U, contre seulement 29% des Charolaises saisies. En particulier, plus de 75% des carcasses de Blondes d'Aquitaine saisies sont classées U, alors que près de 65% des carcasses Charolaise saisies sont classées R.

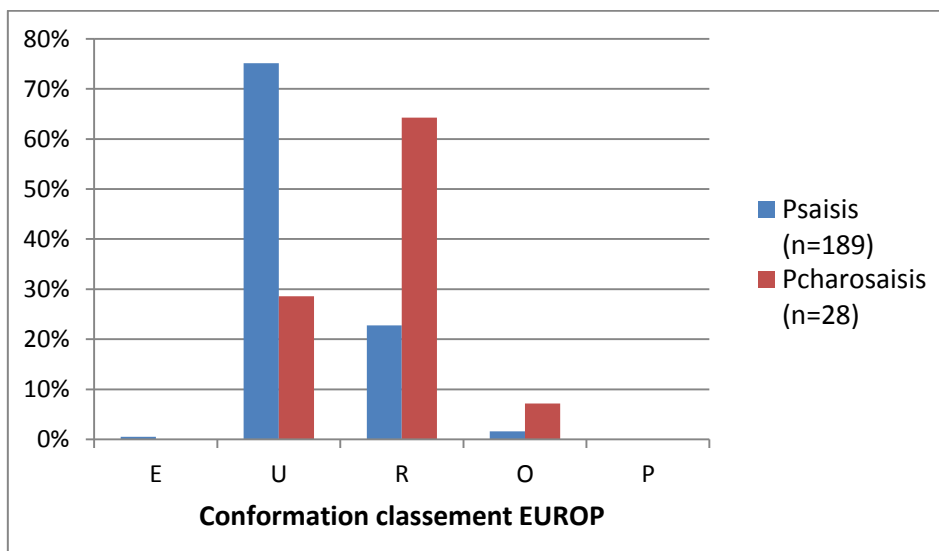


Figure 23 : Répartition des carcasses de Psaisis et Pcharosaisis en fonction de leur conformation selon le classement EUROP

Concernant les carcasses des vaches et génisses non saisies, dans les deux races, 90% également sont classées U ou R (Figure 24). Ici encore, les carcasses de race Blonde d'Aquitaine sont significativement de meilleure conformation que les carcasses de race Charolaise ($p\text{-value} < 1.10^{-20}$). En effet, près de 70% des carcasses de race Blonde d'Aquitaine sont classées E ou U, alors que plus de 80% des carcasses de race Charolaise sont classées R ou O.

Il semble donc que les différences trouvées entre les populations de carcasses saisies se retrouvent entre les populations de carcasses non saisies.

L'analyse des conformations des carcasses saisies et non saisies de race Charolaises permet de voir que près de 30% des carcasses saisies sont de conformations E ou U, contre moins de 15% des carcasses non saisies. Les carcasses de vaches et génisses de race Charolaise sont, comme dans la race Blonde d'Aquitaine, significativement de meilleure conformation (p-value = 0,049).

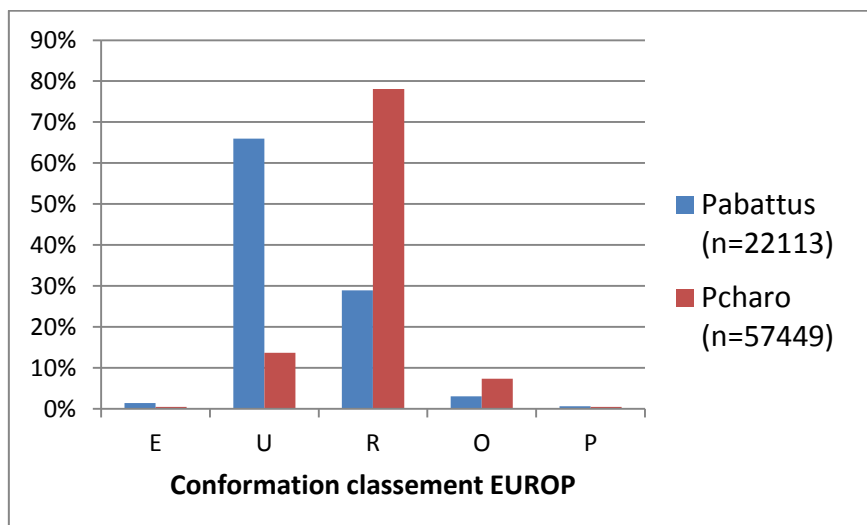


Figure 24 : Répartition des carcasses de Pabattus et Pcharo en fonction de leur classement selon le classement EUROP

Comme pour les poids de carcasse, les différences de conformations qu'il existe entre les carcasses saisies de race Blonde d'Aquitaine et Charolaise sont retrouvées entre les carcasses non saisies de ces deux races. De plus, pour les deux races, les carcasses saisies sont de meilleure conformation que les carcasses non saisies. La conformation des carcasses ne permet donc pas d'expliquer les différences de taux de saisies existant entre les races Blonde d'Aquitaine et Charolaise.

Bilan :

Après ces analyses, il apparaît que :

- Au sein des races Blonde d'Aquitaine et Charolaise, les génisses et vaches sont davantage saisies que les jeunes bovins, taureaux et bœufs.
- Les vaches et génisses Blonde d'Aquitaine présentent un risque de saisies très supérieur aux vaches et génisses Charolaises.
- Les saisies des vaches et génisses Blondes d'Aquitaine sont plus souvent des saisies totales que pour les vaches et génisses Charolaises.
- Il n'y a pas de différences d'âge entre les vaches et génisses saisies des deux races.
- Les vaches et génisses de race Blonde d'Aquitaine sont plus lourdes et de meilleure conformation que les vaches et génisses de race Charolaise.
- Pour une race donnée, Blonde d'Aquitaine ou Charolaise, les vaches et génisses saisies sont légèrement plus lourdes et de meilleure conformation que les vaches et génisses non saisies.
- La comparaison entre ces deux races très proches met donc en évidence une prédisposition de la race Blonde d'Aquitaine à développer des lésions de ME. Un facteur génétique intervenant dans l'apparition des lésions de myosite éosinophilique n'est pas confirmé mais ne peut être exclu.

3.2. Analyses biomoléculaires

3.2.1. Prévalence de la sarcosporidiose

3.2.1.1. Prévalence de *Sarcocystis* spp.

En associant les résultats de l'étude de Bertin, en 2013, et les résultats de notre étude, 123 bovins Blonde d'Aquitaine ont fait l'objet d'au moins un prélèvement, ce qui représente un total de 218 prélèvements. Les résultats de l'analyse par la PCR Multiplex, toutes espèces de *Sarcocystis* confondues, sont résumés dans le Tableau XII :

Tableau XII : Résultats de la PCR Multiplex pour *Sarcocystis* spp.

	Résultat PCR		Prévalence
	Positif	Négatif	
Résultat par bovin	120	3	97,6%
Résultat par prélèvement	194	24	89%

Que ce soit à l'échelle de l'animal ou à l'échelle du prélèvement, la prévalence de la sarcosporidiose est très élevée, avec une valeur proche de 100% à l'échelle de l'animal. Le parasite semble être très présent chez les bovins Blonde d'Aquitaine de notre région d'étude, Les Pays de la Loire.

La prévalence est plus faible à l'échelle du prélèvement qu'à l'échelle de l'animal, de façon significative (p -value = 0,0047). Le protocole d'étude était fondé sur la prise de deux prélèvements par bovins. Ainsi, un bovin peut être positif si un seul de ces prélèvements est positif. Cela permet notamment de limiter les faux négatifs. La différence de prévalence peut s'expliquer comme révélatrice d'un très léger manque de sensibilité de la méthode de digestion - PCR Multiplex.

3.2.1.2. Prévalence par espèce

Les résultats d'analyses par espèces de *Sarcocystis* sont présentés dans le Tableau XIII :

Tableau XIII : Résultats de la PCR Multiplex en fonction des espèces de *Sarcocystis* et de l'échelle d'étude

Espèces de <i>Sarcocystis</i>	Résultats PCR par bovin (n=123)			Résultats PCR par prélèvement (n=218)		
	Positif	Négatif	Prévalence	Positif	Négatif	Prévalence
<i>S. cruzi</i>	75	49	61%	94	124	43,1%
<i>S. hominis</i>	109	14	88,6%	166	52	76,1%
<i>S. hirsuta</i>	2	121	1,6%	2	216	0,9%

A l'échelle du bovin, la prévalence de *S. hominis* est très élevée, avec près de 90% de bovins infectés, et significativement supérieure à la prévalence des deux autres espèces, *S. cruzi* et *S. hirsuta* (p -value = 8.10^{-43}). *S. hominis* est donc l'espèce de *Sarcocystis* la plus présente chez les bovins de la région d'étude.

S. cruzi touche tout de même près des deux tiers des bovins, ce qui en fait une espèce très présente également, alors que *S. hirsuta* n'a été détecté que chez 2 bovins et semble minoritaire chez les Blondes d'Aquitaine en Pays de la Loire.

Ici encore, les prévalences à l'échelle des prélèvements sont plus faibles que les prévalences à l'échelle de l'individu, avec une différence d'au moins 15% pour les prévalences de *S. hominis* et *S. cruzi*. Ces dernières restent tout de même très élevées, avec plus de 75% des prélèvements positifs à la première espèce et plus de 40% de positifs à la seconde. Ces résultats indiquent qu'il semble plus judicieux d'effectuer au moins 2 prélèvements par animal pour limiter les résultats faussement négatifs.

3.2.1.3. Prévalence selon le muscle étudié

Il semble intéressant d'analyser au moins 2 prélèvements par animal afin d'obtenir un résultat le plus exact possible. Mais la question est de savoir si 2 prélèvements du même muscle sont plus intéressants que l'étude de 2 muscles différents. Pour cela, les résultats d'analyses par muscle étudié, toutes espèces de *Sarcocystis* confondues, sont présentés dans le Tableau XIV :

Tableau XIV : Résultats de la PCR Multiplex en fonction du muscle étudié, toutes espèces de *Sarcocystis* confondues

Muscle étudié	Résultat PCR		Prévalence
	Positif	Négatif	
C* (n=98)	87	11	88,8%
L* (n=120)	107	13	89,2%

* : Rappel : C = myocarde, L=muscle lésionnel ou caparaçon pour les témoins.

Les prévalences de la sarcosporidiose, toutes espèces confondues, sont très similaires, qu'elles soient issues de l'étude du myocarde ou d'un muscle squelettique (p-value = 0,92), avec des valeurs proches de 90%. Ce résultat est similaire à la prévalence de la sarcosporidiose tous prélèvements confondus. Si l'objectif est de déterminer si oui ou non un bovin est infecté par une ou plusieurs espèces de *Sarcocystis*, il ne semble pas y avoir de différence entre l'analyse du myocarde ou d'un muscle squelettique.

Le Tableau XV montre les résultats d'analyse par muscle (myocarde ou muscle squelettique) et par espèce.

Tableau XV : Résultats de la PCR Multiplex en fonction du muscle étudié et des espèces de *Sarcocystis*

Muscle étudié	<i>S. cruzi</i>			<i>S. hominis</i>			<i>S. hirsuta</i>		
	Positif	Négatif	Prév.	Positif	Négatif	Prév.	Positif	Négatif	Prév.
C (n=98)	69	29	70,4%	64	34	65,3%	0	98	0%
L (n=120)	25	95	20,8%	102	18	85%	2	118	1,7%

Prév. = Prévalence

Ces résultats permettent de mettre en évidence l'existence de sites électifs de localisation des parasites. *S. cruzi* est significativement plus présent dans le myocarde, avec 70% des prélèvements positifs, que dans les muscles squelettiques dont environ 20% de prélèvements sont positifs (p-value = $1,9.10^{-13}$).

S. hominis a été fortement détecté dans les deux types de muscles, mais il est tout de même significativement davantage localisé dans les muscles squelettiques, avec 85% de prélèvements positifs, que dans le myocarde, pour lequel la prévalence est de 65% environ (p-value = 0,0007).

Quant à *S. hirsuta*, il a été mis en évidence dans seulement deux prélèvements de muscles squelettiques. Il est donc impossible de tirer toute conclusion face à ce résultat.

S. hominis et *S. cruzi* semblent donc avoir des sites de localisations différents, résultats à prendre en compte si l'identification des espèces est recherchée.

Lors de l'analyse de la PCR Multiplex, il s'est avéré qu'une infection mixte, en particulier à *S. hominis* et *S. cruzi*, a souvent été mise en évidence (Tableau XVI).

Tableau XVI : Résultats de la PCR Multiplex en fonction du muscle étudié et en séparant les infections simples et doubles

Espèces de <i>Sarcocystis</i>	Prélèvement de myocarde (C) (n=98)		Prélèvement de muscles squelettiques (L) (n=120)	
	Effectifs	Pourcentage	Effectifs	Pourcentage
<i>S. cruzi</i>	23	23,5%	4	3,3%
<i>S. hominis</i>	18	18,4%	81	63,3%
<i>S. cruzi</i> + <i>S. hominis</i>	46	46,9%	21	17,5%

Lorsque *S. cruzi* est présent, il est la plupart du temps associé à *S. hominis*. *S. hirsuta* a été détecté une fois seul et une fois avec *S. cruzi*. Un animal peut donc être infecté par plusieurs espèces différentes de *Sarcocystis*. Les infections doubles concernent près d'un tiers des prélèvements.

3.2.2. Relation entre myosite éosinophilique et sarcosporidiose

3.2.2.1. Impact de *Sarcocystis spp.*

Le Tableau XVII présente les résultats de la PCR Multiplex, en séparant les animaux saisis pour myosite éosinophilique et les animaux témoins.

Tableau XVII : Résultats de la PCR Multiplex pour *Sarcocystis spp.* selon l'origine du prélèvement (Saisi ou Témoin)

	Résultat PCR pour animaux SAISIS			Résultat PCR pour animaux TEMOINS		
	Positif	Négatif	Prévalence	Positif	Négatif	Prévalence
Par bovin	79	2	97,5%	41	1	97,6%
Par prélèvement	127	21	85,8%	67	3	95,7%

La prévalence de la sarcosporidiose est très élevée aussi bien chez les animaux saisis pour myosite éosinophilique que pour les animaux témoins, avec des valeurs proches des 100% à l'échelle des individus.

Bien que la similitude soit flagrante à l'échelle des individus, une petite différence est présente à l'échelle des prélèvements, mais compte tenu du faible nombre d'échantillons négatifs chez les témoins (3), elle doit être considérée avec précautions.

La sarcosporidiose à *Sarcocystis spp.* ne semble pas être un élément déterminant dans l'apparition des myosites éosinophiliques.

3.2.2.2. Impact des différentes espèces de *Sarcocystis*

Les résultats de l'analyse PCR à l'échelle des bovins sont présentés dans le Tableau XVIII et ceux à l'échelle des prélèvements dans le Tableau XIX.

Tableau XVIII : Résultats de la PCR Multiplex en fonction de l'espèce de *Sarcocystis* chez les bovins saisis et témoins

<i>Echelle des bovins</i>	Résultat PCR pour animaux SAISIS (n=81)			Résultat PCR pour animaux TEMOINS (n=42)		
	Positif	Négatif	Prévalence	Positif	Négatif	Prévalence
<i>S. cruzi</i>	45	36	55,6%	30	12	71,4%
<i>S. hominis</i>	70	11	86,4%	39	3	92,9%
<i>S. hirsuta</i>	0	81	0%	2	40	4,8%

A la première observation des résultats à l'échelle des individus, il semble que les bovins témoins présentent un portage parasitaire plus important que les bovins saisis, et ce pour toutes les espèces de *Sarcocystis*. Cependant, ces différences ne sont pas significatives (p-value = 0,08 / 0,7497 / 0,1147, pour respectivement *S. cruzi*, *S. hominis* et *S. hirsuta*). D'un point de vue statistique, les différentes prévalences ne sont pas différentes au sein des deux populations.

A l'échelle des prélèvements (Tableau XIX), il existe une différence significative cette fois, vis-à-vis de la prévalence de *S. cruzi*. Ainsi, cette espèce est plus présente au sein des prélèvements témoins que les prélèvements d'animaux saisis (p-value = 0,022). Il n'y a aucune différence significative concernant l'infection par *S. hominis* et *S. hirsuta*.

S. cruzi semble être négativement corrélé à l'apparition des myosites éosinophiliques.

Tableau XIX : Résultats de la PCR Multiplex en fonction de l'espèce de *Sarcocystis* pour des prélèvements issus de bovins saisis et témoins

<i>Echelle des prélèvements</i>	Résultat PCR pour animaux SAISIS (n=148)			Résultat PCR pour animaux TEMOINS (n=70)		
	Positif	Négatif	Prévalence	Positif	Négatif	Prévalence
<i>S. cruzi</i>	56	92	37,8%	38	32	54,3%
<i>S. hominis</i>	108	40	73%	58	12	82,9%
<i>S. hirsuta</i>	0	148	0%	2	68	2,9%

Le Tableau XX regroupe les résultats d'analyse PCR selon la positivité ou non à *S. cruzi* et en fonction du muscle étudié (myocarde ou muscles squelettiques).

Tableau XX : Résultats de la PCR Multiplex vis-à-vis d'une infection par *S. cruzi*, selon l'organe prélevé, chez les bovins saisis et témoins

<i>Etude de S. cruzi</i>	Prélèvements de bovins SAISIS	Prélèvements de bovins TEMOINS
Myocardes (C) positifs	43	26
Myocardes (C) négatifs	24	5
Prévalence	64% (43/67)	84% (26/31)
Muscles squelettiques (L) positifs	13	12
Muscles squelettiques (L) négatifs	68	27
Prévalence	16% (13/81)	31% (12/39)

Il apparaît que pour les deux muscles étudiés, *S. cruzi* est davantage mis en évidence dans les prélèvements témoins que dans les prélèvements issus d'animaux saisis. En particulier, cette différence est significative pour les prélèvements de myocardes (p-value = 0,03). Concernant les muscles squelettiques, la différence n'est pas significative mais la tendance est forte (p-value = 0,063). Ce résultat confirme que *S. cruzi* est une espèce plus souvent mise en évidence chez les animaux témoins.

Une association privilégiée de *S. cruzi* et *S. hominis* dans une des deux populations (saisies ou témoins) a été recherchée. Le Tableau XXI présente les résultats de la PCR Multiplex, en séparant les infections simples et les infections doubles à *S. cruzi* et *S. hominis*. Les résultats d'analyse concernant *S. hirsuta* ont été écartés au vu de la faible prévalence de ce parasite dans nos prélèvements.

Tableau XXI : Résultats de la PCR Multiplex, en séparant les infections simples et les infections doubles, pour les prélèvements issus de bovins saisis et témoins

<i>Echelle des prélèvements</i>	Bovins SAISIS (n=148)		Bovins TEMOINS (n=70)	
	Effectifs	Prévalence	Effectifs	Prévalence
<i>S. cruzi</i>	19	12,8%	8	11,4%
<i>S. hominis</i>	71	48%	28	40%
<i>S. cruzi</i> + <i>S. hominis</i>	37	25%	30	42,9%

Il semble que les infections doubles sont davantage mises en évidence dans les prélèvements témoins que dans les prélèvements issus d'animaux saisis. Cependant, ces résultats sont à comparer à la prévalence attendue des infections doubles, calculée en fonction de la prévalence de chacune des deux espèces, *S. cruzi* et *S. hominis* (Tableau XXII).

Tableau XXII : Prévalences de *S. cruzi* et *S. hominis* dans les prélèvements saisis et témoins et prévalence attendue de l'association *S. cruzi* et *S. hominis* dans les deux populations.

<i>Echelle des prélèvements</i>	Bovins SAISIS	Bovins TEMOINS
Prévalence totale de <i>S. cruzi</i>	37,8%	54,3%
Prévalence totale de <i>S. hominis</i>	73%	82,9%
Prévalence attendue de <i>S. cruzi</i> + <i>S. hominis</i>	27,6% (0,378 x 0,73)	45% (0,543 x 0,829)

Les prévalences attendues des infections doubles semblent correspondre aux prévalences des infections doubles mises en évidence par l'analyse de PCR Multiplex. Concernant les prélèvements issus de bovins saisis, la prévalence des infections doubles est de 25% alors qu'elle était attendue à 27,6%, tandis que pour les prélèvements de bovins témoins la prévalence obtenue est de 42,9% alors qu'elle était attendue à 45%.

Il ne semble donc pas y avoir d'association privilégiée de *S. hominis* et *S. cruzi* en comparant les populations témoins et saisies. La différence des prévalences entre les deux populations est due à la différence de prévalence de *S. cruzi* entre ces deux populations. Ainsi, les infections doubles à *S. cruzi* et *S. hominis* ne semblent pas avoir d'influence sur l'apparition des lésions de myosite éosinophilique.

Concernant *S. hominis*, le Tableau XXI semble montrer que cette espèce est plus souvent détectée seule dans les prélèvements de bovins saisis (48%) que dans les prélèvements de bovins témoins (40%). Cependant, cette différence n'est pas significative (p-value = 0,27).

L'étude de la prévalence de *S. hominis* seul dans les différents prélèvements est présentée dans le Tableau XXIII.

Tableau XXIII : Résultats de la PCR Multiplex vis-à-vis d'une infection à *S. hominis* seul, selon l'organe prélevé, chez les bovins saisis et témoins

<i>Etude de <i>S. hominis</i> SEUL</i>	Prélèvements de bovins SAISIS	Prélèvements de bovins TEMOINS
Myocardes (C) positifs	15	3
Myocardes (C) négatifs	52	28
Prévalence	22,4% (15/67)	9,7% (3/31)
Muscles squelettiques (L) positifs	56	25
Muscles squelettiques (L) négatifs	25	14
Prévalence	69,1% (56/81)	64,1% (25/39)

Il semble que *S. hominis* seul soit davantage présent dans les deux types de prélèvements d'animaux saisis que dans les prélèvements d'animaux témoins. Cette différence est néanmoins très faible et non significative concernant le muscle squelettique (p-value = 0,58). Pour les prélèvements de myocordes, la tendance est plus forte, avec plus de 20% des myocordes saisis infectés uniquement par *S. hominis* contre moins de 10% des myocordes témoins (p-value = 0,13).

3.2.3. Observation par élevage

Au cours de l'étude, certains élevages ont eu deux ou plusieurs carcasses saisies ou prélevées comme témoins. Ceci concerne 8 élevages cas et 6 élevages témoins. Ces quelques données permettent de voir si les résultats d'analyse PCR sont similaires au sein d'un même élevage ou s'il existe des différences.

Parmi les différents élevages, deux étaient uniquement engraisseurs, et ils ont tous les deux eu des saisis. Un élevage a eu deux animaux saisis, un était né dans l'exploitation, l'autre a été acheté. Les 11 autres élevages, dont les 6 témoins et 5 cas, sont tous naisseurs-engraisseurs, les animaux n'ont donc pas quitté l'élevage depuis leur naissance.

Concernant les 6 élevages témoins, il y en a 4 pour lesquels les résultats étaient similaires pour tous les animaux prélevés (deux élevages ont eu trois animaux prélevés et les deux autres seulement deux animaux). Pour ces 4 élevages, *S. cruzi* et *S. hominis* ont été mis en évidence.

Dans un des deux autres élevages témoins, 3 animaux ont fait l'objet de prélèvements. Les résultats ont donné un animal négatif et les deux autres infectés par *S. cruzi* et *S. hominis*. Dans l'autre élevage, les deux prélèvements effectués ont montré qu'un animal était infecté par *S. hominis*, l'autre par *S. cruzi* et *S. hominis*.

Pour les 5 élevages cas naisseurs-engraisseurs, seulement deux élevages ont eu des résultats similaires sur chacun de leurs animaux saisis (deux pour chaque élevage), et à chaque fois, *S. cruzi* et *S. hominis* ont été mis en évidence. Un autre élevage a eu deux animaux saisis, qui se sont révélés être infectés l'un par *S. cruzi* et l'autre par *S. hominis*. Un autre a également eu deux saisis, un bovin présentant *S. cruzi* et *S. hominis*, un autre *S. hominis* seul. Enfin, le troisième élevage a fait l'objet de quatre saisis, parmi lesquelles trois ont présenté une infection à *S. hominis* seul et une autre une infection double à *S. cruzi* et *S. hominis*.

L'élevage cas ayant eu un animal acheté et un animal né dans l'exploitation saisis, a eu comme résultat une infection double à *S. cruzi* et *S. hominis* pour l'animal né dans le troupeau et un résultat négatif pour celui acheté.

Enfin, concernant les deux élevages engraisseurs, un élevage a eu deux saisis, présentant chacune une infection à *S. hominis* seul, et le second élevage a eu trois saisis, présentant toutes une infection à *S. cruzi* et *S. hominis*.

Ces résultats semblent indiquer qu'il n'est pas rare que les animaux provenant d'un même élevage présentent des résultats d'analyse différents (5 élevages sur 14). Cependant, tous les animaux n'ont pas fait l'objet de deux prélèvements. La sensibilité de l'analyse étant légèrement plus faible lors de l'analyse d'un seul prélèvement, et *S. cruzi* étant le plus souvent détecté dans le cœur, il faut être prudent quant à l'interprétation de cette observation à l'échelle des élevages.

Bilan :

Ces différentes analyses permettent d'observer qu'au sein de la population d'étude :

- La sarcosporidiose touche près de 100% des bovins, qu'ils soient saisis ou non pour myosite éosinophilique.
- *S. hominis* est l'espèce la plus présente, avec une prévalence proche de 90%, suivie par *S. cruzi* avec environ 60% de portage. *S. hirsuta* est très rare.
- *S. cruzi* est plus souvent détecté dans le myocarde, alors que *S. hominis* est plus souvent détecté dans un muscle squelettique.
- *S. cruzi* est davantage présent chez les animaux témoins.
- *S. hominis* a tendance à être davantage mis en évidence seul chez les animaux saisis.
- Les fréquences des infections doubles sont conformes aux fréquences attendues et il n'y a pas d'association privilégiée des deux espèces *S. cruzi* et *S. hominis* dans une des populations étudiées.

3.3. Etude de la conduite d'élevage

3.3.1. Description de la population

La population d'élevages auxquels le questionnaire a été proposé a été sélectionnée à partir de la liste d'animaux ayant fait l'objet d'un prélèvement. Les éleveurs ont été ensuite appelés au hasard afin de prendre rendez-vous. Parmi les 106 éleveurs contactés, 54 ont accepté de nous recevoir pour remplir le questionnaire, ce qui représente un taux d'acceptation de 51%.

La répartition des élevages est présentée sur la Figure 25. La majorité d'entre eux était située dans le Nord de la Vendée et au Sud de la Loire-Atlantique. Une partie des élevages, notamment des élevages témoins, était située au Sud-Ouest du Maine-et-Loire et au Nord de la Loire-Atlantique.



Figure 25 : Localisation des élevages Cas (Rouge) et Témoins (Bleu) ayant répondu au questionnaire (source : ZeeMaps®)

Il y avait 29 élevages cas, dont 25 récidivistes, et 25 élevages témoins, n'ayant pas eu de saisies au cours des 8 dernières années.

Concernant les élevages cas, le taux de saisies moyen était légèrement supérieur à 2% par an, avec des taux allant de 0,04% pour les élevages ayant eu un seul cas, à plus de 8% pour certains très touchés (Tableau XXIV).

Tableau XXIV : Description des taux de saisies au sein de la population d'élevages cas de l'étude (à partir des données de Bovi-Loire)

Moyenne	2,04%
Médiane	1,67%
Minimum	0,04%
Maximum	8,33%
Ecart-type	1,64

3.3.2. Analyse uni-variée

Une analyse uni-variée de chacune des 199 variables a permis de faire un premier tri. Toutes les variables pour lesquelles toutes les réponses étaient identiques (exemple : « Lavages des mains avant manipulations des aliments pour les animaux ») ont été retirées. De même, les variables pour lesquelles une unique modalité représentait 95% de la totalité des réponses ont été retirées, car elles n'auraient pas été d'un grand intérêt dans l'analyse statistique.

Les variables exclues sont présentées dans le Tableau XXV :

Tableau XXV : Variables issues du questionnaire de la conduite d'élevage et exclues de l'analyse statistique pour manque de variabilité

Rubrique du questionnaire	Présentation de l'élevage	Risques sanitaires liés à l'alimentation et à l'abreuvement	Pâturage et environnement à proximité des pâtures
Variables retirées	Type d'élevage (Naisseur-Engraisseur)	Matériel de distribution Individuel ou Collectif (Individuel)	Passage humain (OUI)
	Achat de femelles pour la reproduction (NON)	Nettoyage matériel de distribution (à l'eau)	
	Autres achats (OUI)	Litière accumulée (OUI)	
	Conduite d'élevage habituelle (Herbage et Stabulation Libre)	Nettoyage des abreuvoirs (si sale)	
		Protocole nettoyage abreuvoirs (à l'eau)	
		Nettoyage du matériel (si sale)	
		Protocole nettoyage matériel (à l'eau)	
	Situation sanitaire de l'élevage	Risque de contamination par l'homme	
	Anticoccidien : Molécule (Diclazuril)	Lavage des mains avant manipulation des aliments (NON)	

() : Les données entre parenthèses sont les réponses données pour 95% ou plus des élevages

De même, toutes les données concernant les taurillons ont été écartées, ces animaux étant très rarement sujet à des saisies pour myosite éosinophilique.

Pour toutes les variables exclues, il n'y a donc aucune différence statistique entre les élevages Cas et Témoins.

3.3.3. Analyse bi-variée des populations «Cas/Témoins» et «Récidivistes/Témoins»

Chaque variable explicative a été testée par rapport aux variables « Cas/Témoins » et « Récidivistes/Témoins » selon les modalités décrites précédemment (voir partie 2.3.3). Pour les résultats dont les p-value seront comprises entre 0,05 et 0,15, les résultats seront décrits comme des tendances, pour les p-value inférieures à 0,05, les résultats seront décrits comme significatifs. La $p\text{-value}_{\text{cas}}$ correspond à la p-value de l'analyse « Cas/Témoins », la $p\text{-value}_{\text{réc}}$ à celle de l'analyse « Récidivistes/Témoins ».

- Présentation de l'élevage

Parmi les différentes variables, la **taille du troupeau** apparaît significativement différente entre les populations (Figure 26). Seulement 25% des troupeaux Témoins comportent plus de 100 vaches mères, alors que plus de 50% des troupeaux Cas et des troupeaux Récidivistes comportent plus de 100 vaches mères ($p\text{-value}_{\text{cas}} = 0,0371$; $p\text{-value}_{\text{réc}} = 0,0054$). Les élevages Cas et Récidivistes ont un effectif significativement plus important que les élevages Témoins. Les cas de saisies pour myosite éosinophiliques étant assez rare (environ 1% de vaches Blonde d'Aquitaine sont saisies), il semble logique que les élevages les plus gros soient davantage concernés par des saisies que les élevages de cheptel plus petit.

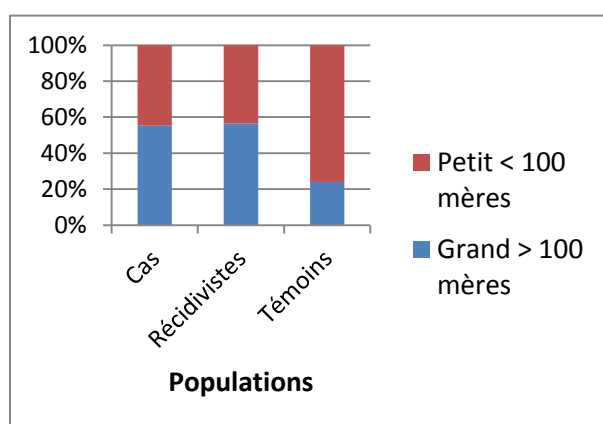


Figure 26 : Répartition des élevages selon l'effectif des mères, dans les populations Cas, Récidivistes et Témoins

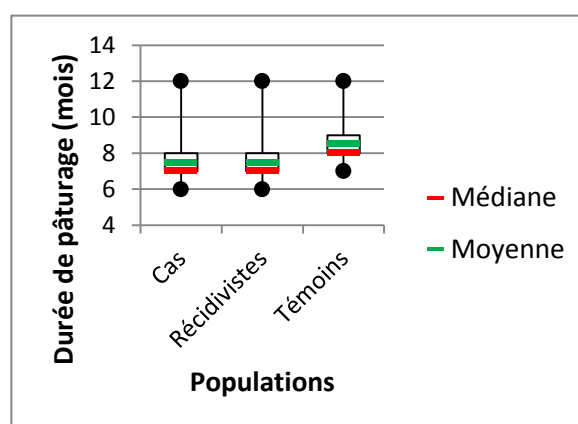


Figure 27 : Boîte de dispersion de la durée de pâturage dans les populations Cas, Récidivistes et Témoins

Concernant la **durée de pâturage**, il apparaît que les animaux des élevages Témoins sont significativement plus souvent au pâturage que les animaux des élevages Cas et Récidivistes, avec des moyennes respectives de 8,6 mois et 7,5 mois ($p\text{-value}_{\text{cas}} = 0,0009$ et $p\text{-value}_{\text{réc}} = 0,003$). De plus, 75% des animaux des élevages Cas et Récidivistes passent moins de 8 mois au pâturage, tandis que 75% des élevages Témoins laissent leurs animaux au pâturage plus de 8 mois (Figure 27). Autrement dit, les animaux des élevages Cas et Récidivistes passent significativement davantage de temps en bâtiments.

Pour le **poids de carcasse moyen des vaches abattues**, aucune différence n'est notée entre les populations Cas et Témoins ($p\text{-value}_{\text{cas}} = 0,296$). Par contre, une tendance se dégage entre les poids des vaches des élevages Récidivistes et Témoins ($p\text{-value}_{\text{réc}} = 0,098$), avec des poids d'abattage moyens de 495 kg et 477 kg respectivement.

Aucune différence n'apparaît concernant la durée de la phase d'engraissement, et le lieu d'engraissement des animaux de réformes (herbage ou stabulation). De même, il semble ne pas y avoir de différence concernant le lieu de naissance des veaux, et tout ce qui concerne la gestion de la reproduction. Ces paramètres ne semblent pas intervenir dans l'apparition des lésions de myosite éosinophilique.

- Alimentation des animaux

Il n'y a aucune différence statistique concernant l'alimentation des veaux et des animaux non destinés à la réforme. Deux tendances apparaissent à propos de la période d'engraissement (Figure 28). Les animaux de réforme des élevages Témoins sont davantage nourris au **foin** ($p\text{-value}_{\text{cas}} = 0,13$) que les animaux des élevages Cas, mais ceci n'est pas vérifié pour les élevages Récidivistes ($p\text{-value} = 0,16$). Cependant, les animaux des élevages Récidivistes reçoivent plus **d'ensilage d'herbe** que les animaux des élevages Témoins ($p\text{-value}_{\text{rec}} = 0,14$), information non vérifiée pour les élevages Cas ($p\text{-value} = 0,24$).

Aucune autre différence significative n'existe pour les autres aliments disponibles.

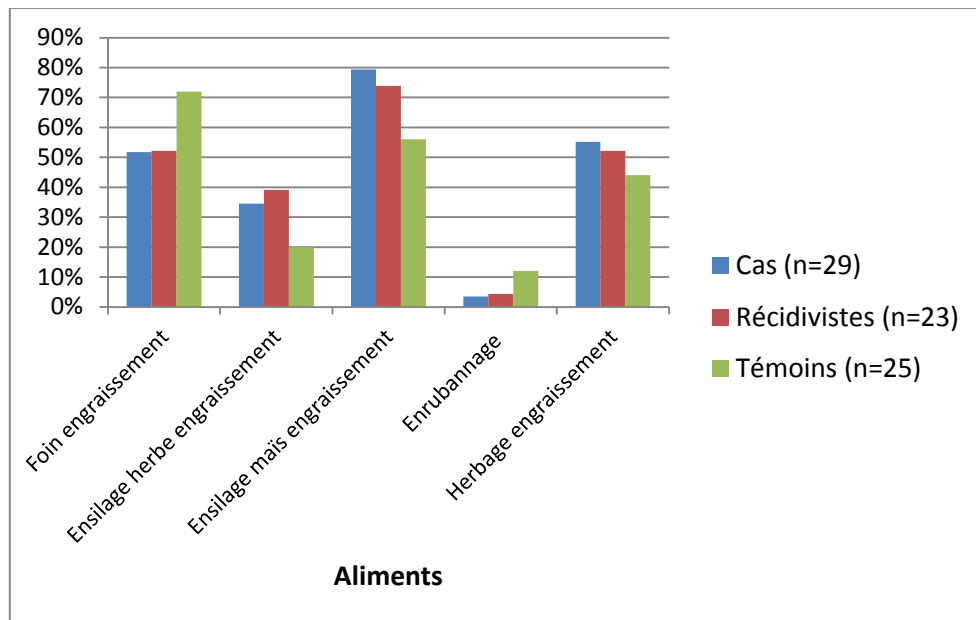


Figure 28 : Alimentation des animaux à l'engraissement dans les élevages Cas, Récidivistes et Témoins

Enrubannage et Ensilage : Aliment conservé à l'état humide, grâce à une fermentation acide. L'enrubannage est un aliment plus sec que l'ensilage ; Foin : Aliment issu de la dessiccation de l'herbe, aliment très sec.

- Risques sanitaires liés à l'alimentation et à l'abreuvement

Parmi les élevages Témoins, 20% **distribuent les fourrages manuellement**, alors que 100% des élevages Cas les distribuent mécaniquement, avec une dessileuse ou une mélangeuse ($p\text{-value}_{\text{cas}} = 0,04$). Cependant, cette pratique est tout de même rare et ne concerne que 4 élevages dans notre étude, ayant tous des cheptels classés « Petit » selon nos critères (moins de 100 mères allaitantes dans le cheptel).

Aucune autre variable, concernant les risques liés à l'alimentation et aux stockages des aliments, n'est apparue significativement différente entre les deux populations. En particulier, la présence de terrains inondés auxquels les animaux ont accès ou le stockage de l'ensilage sur terre ne semblent pas influencer la présence de lésions de myosite éosinophilique au sein des élevages concernés.

Concernant l'abreuvement, deux éléments sont à noter. D'une part, il existe une différence significative concernant **l'abreuvement via les mares**, entre les élevages Témoins et Cas ($p\text{-value}_{\text{cas}} = 0,007$; $p\text{-value}_{\text{rec}} = 0,02$). Ainsi près de 70% des élevages Cas et Récidivistes possèdent des mares pour l'abreuvement des animaux, contre 35% des élevages Témoins (Figure 29).

D'autre part, une tendance apparaît concernant l'abreuvement par **l'eau du réseau public** dans les stabulations (Figure 29). Les élevages Cas et Récidivistes semblent mettre cette source d'abreuvement davantage à disposition de leurs animaux, avec près de 40% des élevages Récidivistes concernés, par rapport aux élevages Témoins, dont 15% des élevages utilisent cette source d'abreuvement ($p\text{-value}_{\text{cas}} = 0,14$; $p\text{-value}_{\text{rec}} = 0,085$).

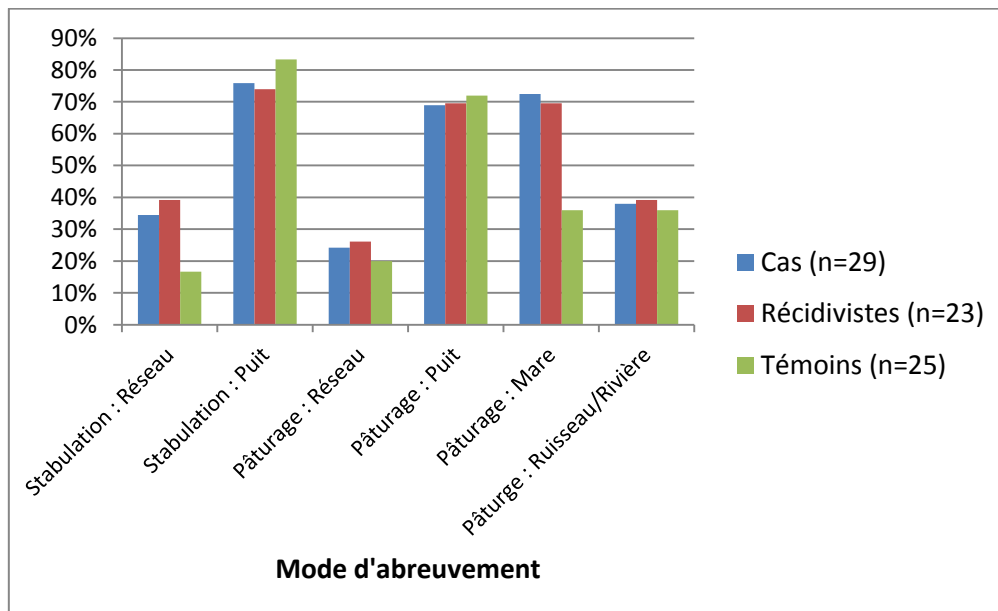


Figure 29 : Différents mode d'abreuvement en stabulation et au pâturage, pour les élevages Cas, Récidivistes et Témoins

- Pâturage et environnement

L'environnement à proximité des pâtures des élevages a été analysé. Il ressort une tendance concernant la présence de **mares et/ou d'étangs**. Il semble que les pâtures des élevages Cas et Récidivistes sont plus souvent situées à proximité de mares et étangs que les pâtures des élevages Témoins ($p\text{-value}_{\text{cas}} = 0,057$; $p\text{-value}_{\text{rec}} = 0,067$). Les mares et étangs sont tout de même très présentes à proximité des pâtures des différents élevages, puisqu'environ 85% des élevages Cas et Récidivistes et plus de 60% des élevages Témoins sont concernés (Figure 30).

Concernant les risques sanitaires au niveau des pâtures, il existe une tendance concernant **l'épandage de fumier**. En effet, environ 20% des élevages Cas épandent du fumier sur leurs pâtures, contre 40% des élevages Témoins ($p\text{-value} = 0,12$). Ce résultat n'est pas vérifié pour la population Récidivistes.

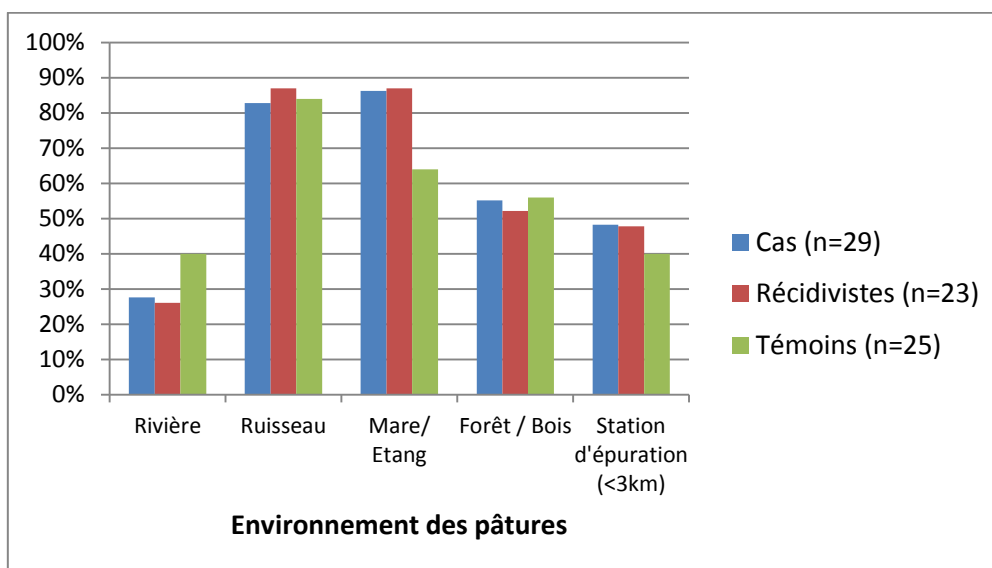


Figure 30 : Environnement à proximité des pâtures des élevages Cas, Récidivistes et Témoins

- Situation sanitaire de l'élevage

Concernant la gestion de la litière des animaux, il existe une différence dans la **composition** de celle-ci. Environ 25% des élevages Cas (soit 7 élevages, dont 4 Récidivistes) présentent une composition de litière différente de tous les autres élevages. Celle-ci est composée, en plus de paille, de roseaux de marais. Cette différence est significative ($p\text{-value}_{\text{cas}} = 0,035$; $p\text{-value}_{\text{réc}} = 0,05$). Les élevages concernés sont situés sur des zones où les marais sont très nombreux, à l'Ouest de la Loire-Atlantique.

La **fréquence de paillage** fait l'objet d'une légère différence entre les élevages Cas et Témoins. Ainsi, 80% des élevages Cas et 78% des Récidivistes pratiquent un paillage journalier, contre 58% des élevages Témoins ($p\text{-value}_{\text{cas}} = 0,098$; $p\text{-value}_{\text{réc}} = 0,14$). Le paillage semble donc plus fréquent dans les élevages Cas et Récidivistes.

La situation vis-à-vis de la présence de maladies récurrentes cliniques, quelles qu'elles soient, ainsi que la présence de maladies de troupeaux ont été étudiées.

Aucune différence significative n'existe concernant la présence ou l'absence de maladies récurrentes cliniques.

Concernant les maladies particulières, à détection davantage sérique que clinique, la **paratuberculose** possède une répartition différente au sein des populations étudiées. En effet, plus de 40% des élevages Cas, et près de 50% pour les Récidivistes, ont actuellement ou ont été confrontés récemment à des animaux atteints de paratuberculose (Figure 31). Parmi les troupeaux Témoins, seulement 10% environ sont confrontés à cette maladie. Les élevages Cas, et de surcroît les élevages Récidivistes, sont donc significativement plus concernés par la paratuberculose que les élevages Témoins ($p\text{-value}_{\text{cas}} = 0,016$; $p\text{-value}_{\text{réc}} = 0,0064$).

Les différences concernant la présence de BVD ou d'IBR au sein des troupeaux ne sont pas significatives.

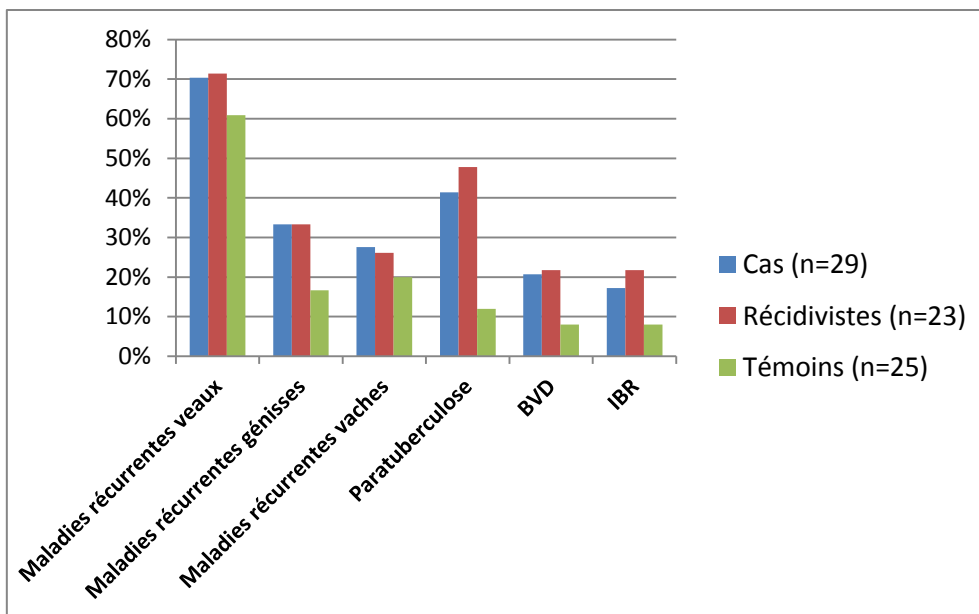


Figure 31 : Situation des élevages Cas, Récidivistes et Témoins vis-à-vis de diverses maladies

Les **pratiques vaccinales** sont également différentes entre les deux populations. Comme le montre la Figure 32, les **vaches et génisses** des troupeaux Témoins sont globalement moins vaccinées que celles des troupeaux Cas et Récidivistes. En particulier, près de 90% des élevages Récidivistes vaccinent leurs vaches, contre environ 50% des troupeaux Témoins ($p\text{-value} = 0,009$). Une vaccination des vaches est donc positivement corrélée à l'apparition de myosites éosinophiliques, à l'échelle d'un troupeau, de façon significative.

Cette corrélation n'est qu'une tendance en ce qui concerne la vaccination des génisses ($p\text{-value}_{\text{réc}} = 0,10$), mais les élevages Récidivistes semblent davantage vacciner les génisses que les élevages Témoins.

Il n'y a aucune différence statistique en ce qui concerne la vaccination des veaux.

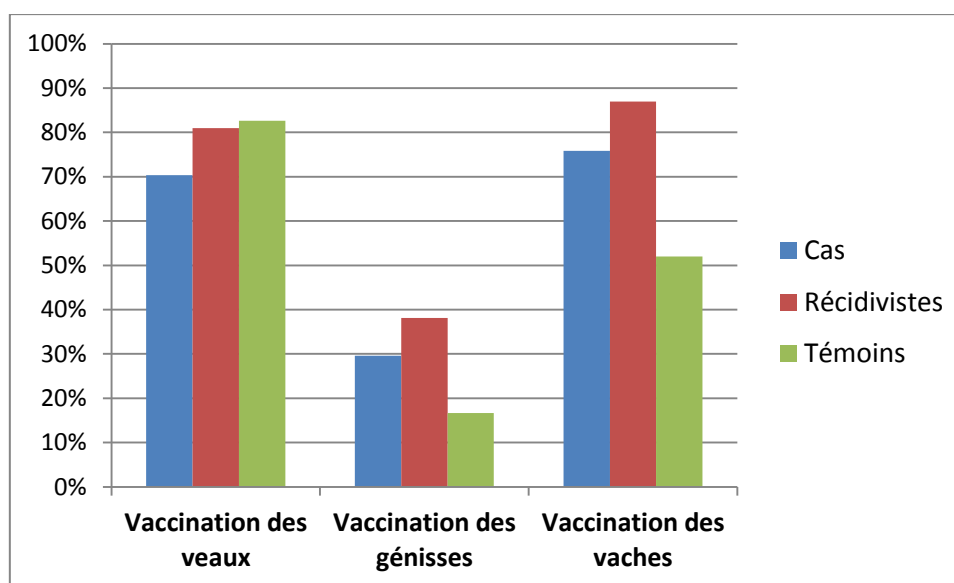


Figure 32 : Pratiques vaccinales selon la catégorie d'animaux dans les élevages Cas, Récidivistes et Témoins

Du point de vue parasitaire, aucune différence n'a été notée concernant la vermifugation contre les nématodes et les trématodes. De même, les animaux de réforme des troupeaux Cas ne sont pas différemment vermifugés avant leur mise à l'engraissement que les animaux de réformes des troupeaux Témoins.

Pour ce qui est des **anticoccidiens chez le veau**, près de 30% des élevages Récidivistes emploient systématiquement des anticoccidiens (6 sur 21), contre 4% des élevages Témoins (1 sur 23). Bien que cette différence soit significative (p-value = 0,04), son interprétation est délicate puisque cette pratique ne concerne que très peu d'élevages (8 sur 54) dans l'étude. En ce qui concerne la population Cas, le résultat est une simple tendance (p-value = 0,053).

Il n'existe aucune différence concernant les retours d'abattoir sur présence de douves ou de cysticercoses. De même, aucune différence n'a été notée à propos de l'hygiène des bâtiments, notamment dans l'existence ou l'absence d'un vide sanitaire, pratique très peu répandue dans les élevages étudiés (7 élevages Cas et 4 élevages Témoins).

Enfin, la gestion des placentas après la mise-bas n'est pas significativement différente entre les deux populations, que ce soit au pâturage, où ils sont souvent laissés sur place, ou en stabulation, où ils sont souvent mis dans le tas de fumier.

Les pratiques de vermifugation chez les élevages Cas ont été davantage explorées. En particulier, il était demandé si le protocole de vermifugation avait changé juste avant l'apparition du premier cas de myosite éosinophilique. Uniquement deux élevages Cas sont concernés par ce changement, ce qui laisse penser que le protocole de vermifugation global n'est pas impliqué dans l'apparition des lésions de myosite éosinophilique.

- Risques sanitaires liés à la présence humaine

Parmi les différents facteurs de risques ayant été étudiés, seule la présence **d'habitations à proximité de l'exploitation** possède une répartition significativement différente entre les populations (Figure 33). Ainsi, près de 90% des élevages Cas et Récidivistes sont situés à moins de 200 mètres d'habitations, contre 60% des élevages Témoins (p-value_{cas} = 0,011 ; p-value_{rec} = 0,036). La présence d'habitations à proximité des élevages est positivement corrélée à l'apparition de lésions de myosite éosinophilique chez les animaux des troupeaux concernés.

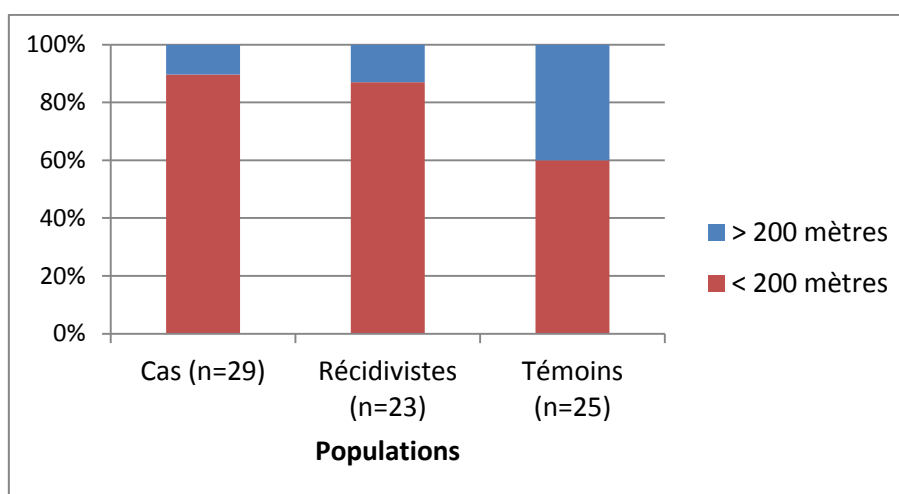


Figure 33 : Présence d'habitations à proximité de l'exploitation, dans les populations Cas, Récidivistes et Témoins

Aucune autre variable concernant la présence humaine à proximité des élevages n'est significativement différente entre les populations étudiées. Le lieu de sortie de la fosse septique de l'exploitation ne semble donc pas avoir d'impact dans l'apparition des myosite éosinophilique.

De même, aucune différence n'a été trouvée concernant les pratiques de consommation de viande bovine des familles des éleveurs.

- Risques sanitaires liés à la présence d'animaux

Parmi les différentes espèces d'animaux sauvages et domestiques qui étaient étudiées, la **présence d'étourneaux sur les pâtures** est significativement différente entre les élevages Cas et Récidivistes et les élevages Témoins ($p\text{-value}_{\text{cas}} = 0,032$; $p\text{-value}_{\text{rec}} = 0,024$). Ainsi, environ 95% des élevages Cas et Récidivistes sont confrontés à une forte présence d'étourneaux sur leurs pâtures, contre seulement 70% environ des élevages Témoins, ce qui reste tout de même important (Figure 34). La présence d'étourneaux semble positivement corrélée à l'apparition de myosite éosinophilique.

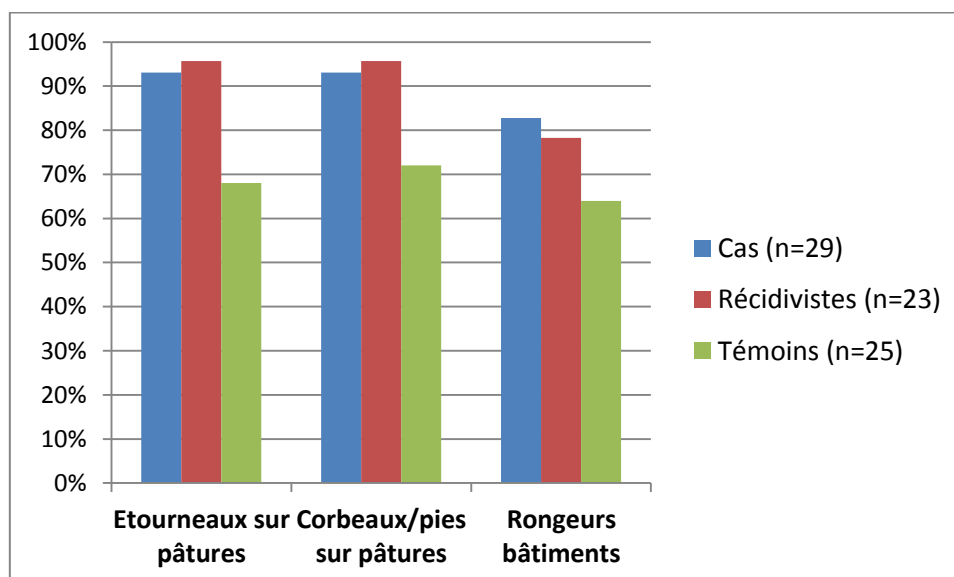


Figure 34 : Présence de certains animaux dans les élevages Cas, Récidivistes et Témoins

De même, les élevages Cas et Récidivistes doivent davantage faire face à la **présence de corbeaux et de pies au niveau des pâtures**, avec environ 95% des élevages concernés, que les élevages Témoins pour lesquels seulement 70% des élevages sont concernés (Figure 34). Cette différence est significative pour l'étude entre les élevages Récidivistes et Témoins ($p\text{-value}_{\text{cas}} = 0,065$; $p\text{-value}_{\text{rec}} = 0,049$), ce qui signifie que la présence de Corbeaux et de pies sur les pâtures est positivement corrélée à l'apparition de lésions de myosite éosinophilique dans les élevages concernés.

Enfin, de manière moins évidente, la **présence de rongeurs dans les bâtiments** a tendance à être répartie différemment entre les deux populations. Comme le montre la Figure 34, près de 85% des élevages Cas disent avoir beaucoup de rongeurs dans leurs bâtiments contre près de 65% des élevages Témoins ($p\text{-value} = 0,12$). Cependant, 100% des éleveurs Cas et Témoins dératisent, ce qui prouve que tous les élevages ont déjà été confrontés à des populations de rongeurs devenues trop importantes. Ce résultat n'est pas vérifié pour la population Récidivistes.

Aucune autre différence concernant la présence d'animaux sauvages et/ou domestiques à proximité des exploitations n'a été notée.

De même, les hôtes définitifs de *S. cruzi* et *S. hirsuta*, à savoir les chiens/renards et les chats respectivement, ne sont pas déclarés comme davantage présents à proximité des élevages Cas par rapport aux élevages Témoins.

Bilan :

Après cette analyse bi-variée, il ressort que les élevages concernés par les saisies pour myosite éosinophilique, par rapport aux élevages témoins :

- ont des cheptels de taille plus importante
- laissent les animaux davantage en bâtiment
- mettent à disposition de l'eau provenant du réseau public en stabulation et de l'eau provenant des mares au pâturage, de façon plus fréquente
- épandent moins souvent du fumier sur les pâtures
- vaccinent davantage les vaches
- sont plus concernés par la présence de paratuberculose
- mettent plus souvent en place un traitement anticoccidien systématique chez leurs veaux
- sont situés davantage à proximité d'habitations environnantes
- sont davantage confrontés à la présence d'étourneaux et de corbeaux/pies sur leurs pâtures
- semblent nourrir leurs animaux avec moins de foin
- semblent pailler plus souvent
- semblent être davantage situés à proximité de mares et étangs

En ce qui concerne les élevages Récidivistes, tous ces résultats sont vérifiés et il apparaît également que ces élevages :

- semblent avoir des poids de carcasses de vaches supérieurs
- semblent nourrir leurs animaux avec davantage d'ensilage d'herbe
- semblent davantage vacciner les génisses de leur cheptel

Les élevages Récidivistes et non Récidivistes semblent avoir le même profil vis-à-vis des différents facteurs de risques.

3.3.4. Analyse multivariée

Les différents facteurs de risque mis en évidence lors de l'analyse bi-variée (Tableau XXVI) ont été introduits dans une analyse multi-variée dans le but d'établir un modèle statistique permettant d'expliquer l'apparition de myosites éosinophiliques. Afin de limiter le biais dû à une saisie accidentelle au sein d'un élevage, seules les données concernant les élevages Récidivistes (23 élevages) seront prises en compte, en comparaison aux données des élevages Témoins (25 élevages).

Les variables quantitatives ont été remplacées par des variables qualitatives, dont les modalités ont été choisies de façon à obtenir la plus grande significativité lors d'un test de χ^2 entre les populations Cas (ou Récidiviste) et Témoin. Ainsi, la variable « durée de pâturage » possède les modalités « inférieure à 8 mois » et « supérieure à 8 mois » ($p\text{-value}_{\text{réc}} = 0,002$) ; la variable fréquence de paillage possède comme modalités « paillage journalier » et « paillage non journalier » ($p\text{-value}_{\text{réc}} = 0,14$) ; la variable poids de carcasse possède deux modalités qui sont « supérieure à 480 kg » et « inférieure à 480 kg » ($p\text{-value}_{\text{réc}} = 0,11$).

Tableau XXVI : Liste des facteurs de risques identifiés lors de l'analyse bi-variée

Facteurs de risques	
Durée de pâturage inférieure à 8 mois	Abreuvement par l'eau du réseau public en stabulation
Anticoccidiens systématiques chez le veau	Paillage journalier
Etourneaux sur pâtures	Poids de carcasse des vaches supérieurs à 480 kg
Habitations à moins de 200m de l'exploitation	Vaccination des génisses
Paratuberculose	Alimentation à base d'ensilage d'herbe
Abreuvement par les mares	Rongeurs dans les bâtiments
Corbeaux/pies sur pâtures	Epandage de fumier sur les pâtures
Vaccination des vaches	Alimentation à base de foin
Troupeau de grande taille	Distribution manuelle du fourrage
Présence de mares et d'étangs près des pâtures	Composition de la litière

3.3.4.1. Régression logistique

Une régression logistique a été effectuée. Cette analyse statistique permet de modéliser une variable expliquée, binaire, ou à deux modalités, en fonction de plusieurs variables dites explicatives. Dans notre étude, la variable expliquée est la variable Lot, avec les modalités « Récidivistes » et « Témoins ». Les variables explicatives sont tous les facteurs de risques identifiés. Cette régression logistique a été appliquée selon le procédé expliqué dans la partie 2.3.3.

La régression logistique a permis de ne retenir que 6 variables explicatives, expliquant la variable Lot (Tableau XXVII).

Tableau XXVII : Variables explicatives et leurs p-value, retenues lors de la régression logistique

Variables	P-value
Episodes de paratuberculose	0,02
Proximité d'habitations	0,02
Vaccination des vaches	0,04
Etourneaux sur pâtures	0,14
Durée de pâturage	0,16
Présence de Mares/Etangs	0,20

Afin de vérifier l'absence de lien entre ces variables, une matrice de corrélation a été réalisée et est présentée en Annexe 6. Cette matrice permet d'observer que seules deux variables étaient liées entre elles : les variables « Présence d'étourneaux sur les pâtures » et « Présence de mares à proximité des pâtures ». Un **test de corrélation de Pearson**, dont la valeur est de 0,339, permet de montrer que la corrélation entre ces deux variables est moyenne. Par conséquent, ces deux variables peuvent être conservées dans le modèle. Le modèle ainsi constitué sera nommé modèle complet.

3.3.4.2. Validité du modèle linéaire complet

Une première étape, fondée sur le rapport des déviations nulle (66,5) et résiduelle (38,6) du modèle complet, montre que celui-ci permet d'expliquer 42% de la variabilité de la population étudiée.

De plus, l'analyse ANOVA entre le modèle complet et le modèle nul a pour p-value 0,0001. En acceptant un risque d'erreur de 5%, le modèle complet est donc significativement différent du modèle nul.

Au vu de ces critères, le modèle complet semble donc valide.

Une Analyse Factorielle Multiple a été effectuée afin d'étudier la répartition des différents élevages selon les variables retenues par le modèle complet. La représentation graphique de cette répartition est présentée dans la Figure 35.

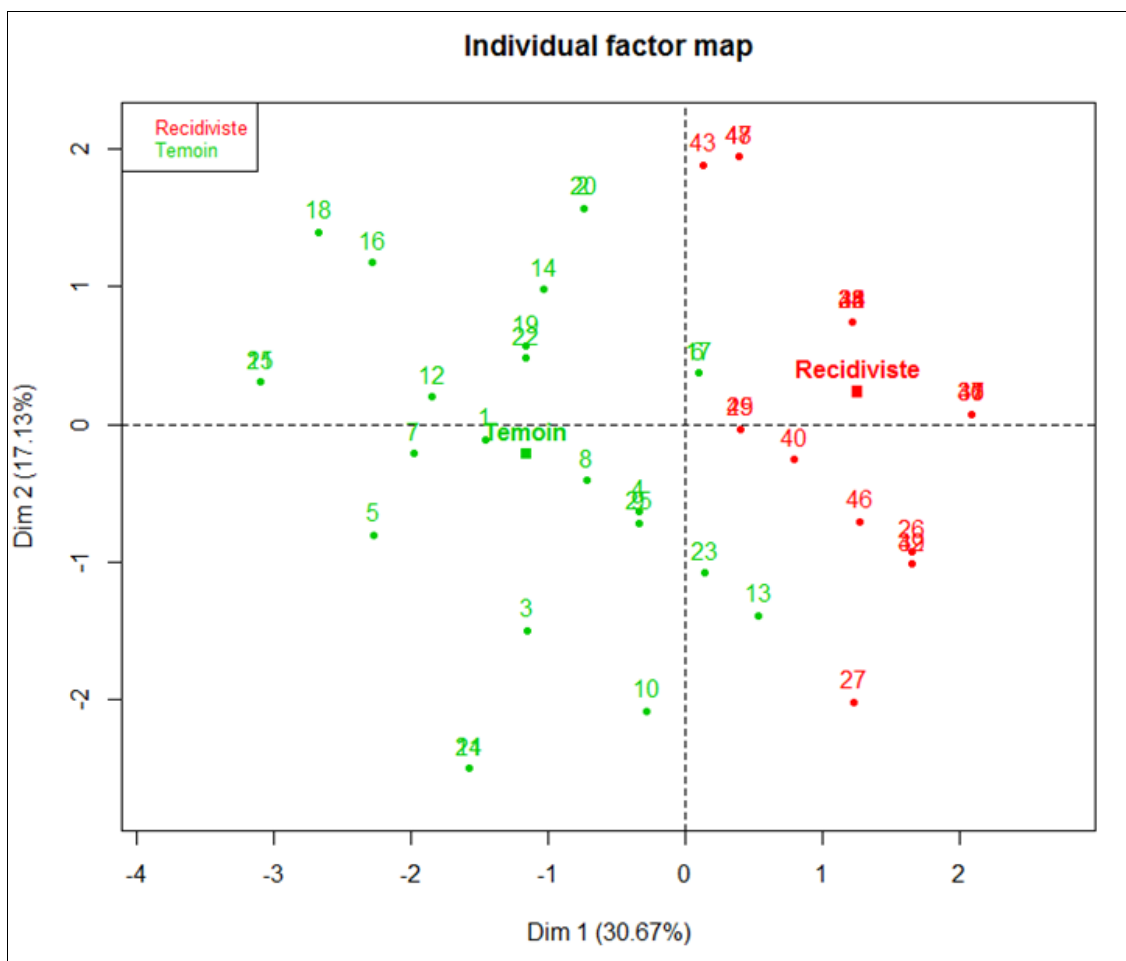


Figure 35 : Représentation graphique de l'AFM de la répartition des élevages Récidivistes (rouge) et Témoins (vert) selon les 6 variables du modèle complet

Cette analyse permet de montrer que les élevages Récidivistes et Témoins sont bien séparés selon les 6 variables du modèle, ce qui conforte la validité du modèle. Cependant, les élevages semblent davantage séparés selon l'axe de dimension 1 (l'axe horizontal de la représentation graphique) que selon l'axe de dimension 2 (l'axe vertical).

L'analyse du cercle des corrélations des variables (Figure 36) permet d'observer que les variables qui influent principalement sur la dimension 1 sont les variables « vaccinations des vaches », « Présence d'étourneaux sur les pâtures », « Paratuberculose » et « Présence de Mares et Etangs à proximité des pâtures ».

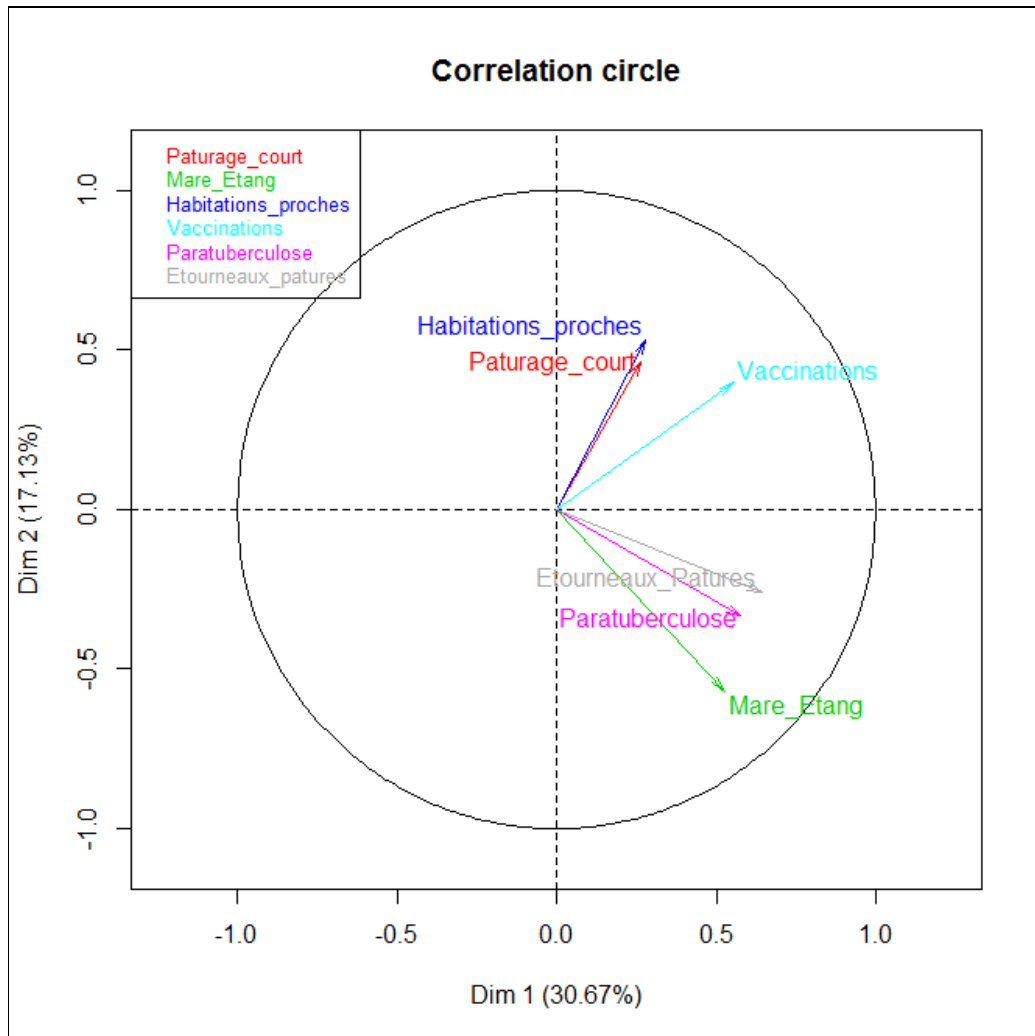


Figure 36 : Cercle des corrélations des variables explicatives introduites dans l'AFM

Face à ces observations, un second modèle, qui sera nommé modèle simplifié, a été introduit en retirant les 2 variables ne semblant intervenir que faiblement dans la répartition des élevages selon l'axe de dimension 1, à savoir les variables « Présence d'habitation à proximité de l'exploitation » et « Durée de pâturage ». Ce nouveau modèle ne comporte donc que 4 variables.

3.3.4.3. Comparaison des modèles linéaires complet et simplifié

Une analyse ANOVA a permis de montrer que ces deux modèles sont significativement différents, avec un risque d'erreur de 5% (p-value = 0,0097).

L'analyse du rapport des déviations nulles et résiduelles des deux modèles montre que le modèle simplifié ne permet d'expliquer que 28% de la variabilité des élevages de notre population, contre 42% pour le modèle complet. Bien qu'elle soit supérieure pour le modèle complet, cette valeur est tout de même élevée pour les deux modèles.

L'analyse des prévisions des deux modèles, grâce à la fonction **predict** du logiciel R®, a été effectuée. Dans le cadre de cette étude, cette fonction permet de classer un élevage comme « Récidiviste » ou « Témoin » selon la réponse du modèle étudié. La comparaison à la situation réelle de chaque élevage permet le calcul de la sensibilité et de la spécificité de chacun des modèles. Cette analyse a ainsi été mise en place pour le modèle complet (Tableau XXVIII) et le modèle simplifié (Tableau XXIX).

Tableau XXVIII : Classement des élevages Récidivistes et Témoins selon leur situation réelle et selon la réponse du modèle complet

<i>Modèle complet</i>		Situation réelle	
		Récidivistes	Témoin
Prévision du modèle	Récidivistes	19	7
	Témoin	4	18

Tableau XXIX : Classement des élevages Récidivistes et Témoins selon leur situation réelle et selon la réponse du modèle simplifié

<i>Modèle simplifié</i>		Situation réelle	
		Récidivistes	Témoin
Prévision du modèle	Récidivistes	19	7
	Témoin	4	18

Cette analyse révèle que, pour les deux modèles, les prévisions sont identiques. Les variables « Présence d'habitation à proximité des pâtures » et « Durée du pâturage », ne semblent pas aussi déterminantes que les autres variables dans la discrimination des élevages.

De plus, les deux modèles ont la même sensibilité et la même spécificité, dont les valeurs sont respectivement de 82% (19/23) et 72% (18/25).

Finalement, après ces différentes analyses, il semble que le modèle simplifié, bien que ne représentant que 28% de la variabilité de la population étudiée, soit tout aussi pertinent que le modèle complet vis-à-vis de la prédiction de la présence de lésion de myosite éosinophilique dans un élevage.

Bilan :

L'analyse multi-variée a permis de mettre en évidence plusieurs facteurs de risques vis-à-vis de l'apparition de lésions de myosite éosinophilique.

Parmi ces différents facteurs, 4 semblent particulièrement pertinents :

- La présence de paratuberculose dans l'élevage,
- La vaccination des animaux, notamment des vaches,
- La présence d'étourneaux sur les pâtures,
- La présence de mares et d'étangs à proximité des exploitations.

Deux autres facteurs de risques ont également été mis en évidence mais leur pertinence semble moins forte :

- Une période de pâturage inférieure à 8 mois,
- La présence d'habitation à proximité (moins de 200 mètres) de l'exploitation.

4. DISCUSSION

Cette étude avait pour objectifs d'étudier le lien potentiel entre la myosite éosinophilique et sarcosporidiose chez la Blonde d'Aquitaine, d'une part grâce à une analyse biomoléculaire et d'autres part via une enquête sous forme de questionnaire afin d'étudier les rôles de l'environnement et de la conduite d'élevage des animaux.

4.1. Caractéristiques des populations d'étude

4.1.1. Caractéristiques des animaux saisis pour myosite éosinophilique

L'objectif de cette analyse était de comparer les caractéristiques des animaux de race Blonde d'Aquitaine saisis et non saisis pour myosite éosinophilique, afin de rechercher des différences pouvant être en lien avec l'apparition des lésions. La principale limite de ces analyses est la taille des populations. En effet, même si la race Blonde d'Aquitaine est particulièrement concernée par les saisies pour ME, celles-ci sont assez rares et les deux populations ont des effectifs très différents. En particulier, il n'a pas été possible d'analyser les populations de taureaux, bœufs et jeunes bovins car les saisies pour ME y sont particulièrement rares. Il faudrait étudier les données sur plusieurs années si on voulait analyser ces populations.

Concernant les populations de vaches et de génisses, nos résultats montrent que les âges d'abattage des animaux saisis et non saisis sont très proches alors que les carcasses saisis sont en moyenne légèrement plus lourdes et de meilleure conformation que les carcasses non saisis. Cette information semble difficile à expliquer mais il serait intéressant d'étudier les modifications de la réponse immunitaire d'animaux à forte croissance et de rechercher si cette réponse peut être, dans certaines conditions, exacerbée.

4.1.2. Prédilection de la race Blonde d'Aquitaine au développement de myosite éosinophilique

L'objectif était de comparer les caractéristiques des bovins de race Blonde d'Aquitaine saisis pour myosite éosinophilique à des bovins d'une autre race, suffisamment répandue en Pays de la Loire, peu sujette à être saisie pour ME et dont la conduite d'élevage est très similaire. Dans cette optique, la race Charolaise a été choisie. En effet, malgré une différence de gabarit (la Charolaise est une race légèrement plus petite et de moins bonne conformation que la Blonde d'Aquitaine), les races allaitantes ont, semble-t-il, des conduites d'élevages similaires en région Pays de la Loire. De plus, la race Charolaise est la race allaitante la plus représentée en Pays de la Loire. Enfin, les saisies pour ME sont très rares et près de 20 fois moins fréquentes que les saisies pour ME en race Blonde d'Aquitaine. Les résultats sont toutefois à interpréter avec précautions compte tenu de la différence d'effectif : le nombre d'animaux saisis sur un an est faible en race Charolaise (30). Ici encore il faudrait étudier les populations sur plusieurs années consécutives.

Nos résultats montrent également que les caractéristiques des carcasses saisis en race Charolaise sont similaires à celles des carcasses saisis en race Blonde d'Aquitaine. L'âge moyen d'abattage est très proche, et les carcasses saisis sont en moyenne légèrement plus lourdes et de meilleure conformation que les carcasses des animaux non saisis de la même race.

Il est donc justifié de suspecter l'intervention d'un facteur génétique. Une étude a montré que les réponses immunitaires chez des veaux de race Angus et Simmental pouvaient être différentes face à des mêmes agents infectieux (Engle et al., 1999). La ME étant la conséquence d'une réponse immunitaire de l'hôte face au parasite, il est envisageable qu'il existe un facteur génétique expliquant que la race Blonde d'Aquitaine soit davantage concernée par l'apparition de ces lésions.

4.1.3. Collecte des échantillons d'analyse par PCR

Initialement, 50 carcasses saisies et 50 carcasses témoins, de vaches ou génisses de race Blonde d'Aquitaine, devaient être introduites à la base de données de l'analyse PCR Multiplex. Cependant, plusieurs difficultés ont été rencontrées.

D'une part, dans le temps imparti à l'étude, il n'y a pas eu suffisamment de saisies dans les abattoirs de la région Pays de la Loire auxquels nous avons accès. Nous avons également été confrontés à un problème de traçabilité des abats, rendant compliqué le prélèvement du cœur correspondant à la carcasse saisie. Afin de combler ces lacunes, les données de l'étude de Bertin, en 2013, ont été jointes à notre base de données (Bertin, 2013). Finalement, nous disposions de 14 carcasses pour lesquelles uniquement un prélèvement de muscle lésionnel avait été réalisé et 66 carcasses ayant fait l'objet de deux prélèvements.

En ce qui concerne les carcasses témoins, l'objectif initial était de prélever des carcasses d'animaux issus d'élevage n'ayant jamais eu de saisies pour sarcosporidiose. Cette sélection stricte a rendu la collecte longue et nous n'avons pas réussi à récupérer suffisamment de prélèvements et ici encore nous avons ajouté des prélèvements issus de l'étude de Bertin, 2013. Comme pour les carcasses saisies, il n'était pas toujours possible d'avoir les deux prélèvements (de myocarde et de muscles squelettiques), par défaut de traçabilité à l'abattoir. Ainsi, seulement 42 carcasses témoins ont été introduites dans la base de données, et 15 d'entre elles n'ont fait l'objet que d'un prélèvement, de muscle squelettique ou bien de myocarde. En effet, certaines carcasses étaient parfois expédiées de l'abattoir avant que le prélèvement puisse avoir lieu : dans ces circonstances, seul le myocarde pouvait être prélevé.

4.1.4. Recrutement des élevages et réponse aux questionnaires

Initialement, nous souhaitions faire compléter le questionnaire par 50 élevages Cas et 50 élevages Témoins. Les différents élevages pour lesquels un animal a fait l'objet de prélèvements ont été contactés par téléphone afin de prendre un rendez-vous pour la présentation du questionnaire.

Le questionnaire était complété lors d'un entretien sur l'exploitation. Ceci permet, à la différence d'un envoi par courrier, de bien cibler les informations à rechercher et d'expliquer certaines questions qui pourraient être incomprises, diminuant fortement la perte d'information. En outre, cela permet d'avoir un taux de réponse plus important que par des envois postaux (Guénégan, 2009). Cependant, la présentation des questionnaires aux éleveurs prenant beaucoup de temps, il était souvent difficile de le présenter dans plus de trois élevages par jour. De plus, la période de présentation du questionnaire (avril à juin) correspond à une période d'activité importante des éleveurs qui étaient donc peu disponibles. Même si les éleveurs concernés par des saisies étaient plus faciles à convaincre, les éleveurs des élevages témoins ne se sentaient pas souvent concernés par ce problème, situation également rencontrée lors d'une autre étude (Guénégan, 2009). Ces raisons expliquent que seulement 54 questionnaires ont été finalement complétés, 29 chez des élevages Cas et 25 chez des élevages Témoins. Ainsi, pour limiter l'influence du faible effectif total lors de l'analyse des données récoltées par le questionnaire, les marges d'erreurs pour la significativité des résultats ont été fixées à 15%.

Afin d'augmenter le nombre de questionnaires remplis, il aurait été judicieux de réaliser leurs présentations au cours de l'hiver, période d'activité plus creuse concernant les cultures et rendant les éleveurs plus disponibles.

Parmi les différents éleveurs ayant répondu au questionnaire, la plupart des éleveurs n'ayant jamais eu de cas de myosite éosinophilique n'avait jamais entendu parler de la sarcosporidiose. Au contraire, de nombreux éleveurs ayant déjà eu une saisie pour myosite connaissaient ce parasite et certains connaissaient bien quelques particularités du cycle, qui leur avaient été expliquées par leur vétérinaire souvent. On peut donc penser que ces éleveurs étaient davantage sensibilisés aux situations à risques, les conduisant notamment à mettre plus en avant les nuisances ressenties (présence de faune sauvage à proximité de l'exploitation par exemple).

4.2. Technique d'analyse des échantillons par PCR Multiplex

Le protocole global de l'analyse PCR Multiplex est long, comportant de nombreuses étapes de complexité variable.

La phase de digestion enzymatique est une étape fastidieuse, essentiellement manuelle mais ne comportant pas de réelle difficulté. Elle nécessite une très bonne organisation du temps, de l'espace et du nettoyage du matériel, mais c'est une technique très largement utilisée et maîtrisée depuis plusieurs années maintenant (Gajadhar & Marquardt, 1992).

Le protocole d'extraction est plus court et assez simple à mettre en place. La principale difficulté est d'éviter la contamination d'une part, des différents échantillons traités, d'autre part des solutions nécessaires à l'extraction. L'entraînement par la répétition de ces étapes permet d'atteindre un temps d'exécution court, ce qui limite la durée d'ouverture des tubes de prélèvements et donc le risque de contamination.

La phase de polymérisation est délicate dans la mesure où il faut trouver une Taq polymérase suffisamment efficace pour réaliser la polymérisation à partir d'extraits d'ADN cibles en très faible proportion par rapport à la quantité d'ADN musculaire bovin. En reprenant la Taq polymérase utilisée en 2013 par Bertin (EurobioTaq® Polymerase), aucune difficulté n'a été rencontrée à ce sujet (Bertin, 2013). Cependant, aucune donnée n'est disponible concernant la quantité d'ADN nécessaire à l'apparition d'une bande de positivité. De même, nous ne savons pas si, lors d'une infection double, cette quantité nécessaire est modifiée par rapport à une infection simple. Il serait donc intéressant d'effectuer ces recherches et d'étudier la sensibilité de la méthode.

4.3. Prévalence de la sarcosporidiose

4.3.1. Prévalence de *Sarcocystis* spp.

Dans notre étude, la prévalence pour la sarcosporidiose chez la Blonde d'Aquitaine est de 97,6%. Aucune donnée n'est disponible dans la littérature scientifique concernant la prévalence chez cette race en France. Cependant, cette valeur s'approche des valeurs d'autres études réalisées sur d'autres races bovines en Europe, notamment en Belgique, où une prévalence de 94% a été mise en évidence (Vangeel et al., 2007) chez des bovins dont la race n'est pas précisée, et en Italie où Bucca *et al.* ont publié une prévalence de 96% (Bucca et al., 2011) chez des animaux de race sicilienne croisée charolaise ou limousine. De même, une étude réalisée sur des vaches de race Piémontaises et provenant du Nord-Ouest de l'Italie a mis en évidence une prévalence de la sarcosporidiose de 89% (Chiesa et al., 2014). Le protocole de PCR semble donc avoir une très bonne sensibilité et permet une bonne détection des animaux porteurs du parasite. Cependant, ces valeurs sont données à l'échelle des individus. Si l'on compare les résultats à l'échelle des prélèvements, la prévalence de la sarcosporidiose dans notre étude est de 89%. Ceci démontre que la détection de *Sarcocystis* à partir d'un seul prélèvement semble risquée car elle augmente la proportion de faux négatifs.

4.3.2. Prévalence des différentes espèces de *Sarcocystis*

Les valeurs de prévalence obtenues dans notre étude sont très variables selon l'espèce de *Sarcocystis*. Ainsi, *S. hominis* est l'espèce la plus présente, avec une prévalence de 88,6%, suivie par *S. cruzi* qui est présent chez 61% des bovins étudiés, puis *S. hirsuta* dont la prévalence est très faible, avec 1,6%. Ces résultats sont similaires à l'étude de Bertin en 2013, qui a mis en évidence des prévalences, en Pays de la Loire, de 93% pour *S. hominis*, 33% pour *S. cruzi* et 0 % pour *S. hirsuta* (Bertin, 2013). La plus forte prévalence de *S. cruzi* dans notre étude peut être liée à la localisation privilégiée de cette espèce dans le myocarde (Vercruyssen et al., 1989). En effet, dans son étude, Bertin disposait de peu de prélèvements de myocarde. On peut donc penser qu'à l'échelle des individus, *S. cruzi* a pu être sous-détecté.

S. hirsuta semble être très peu présent en région Pays de la Loire. Ce résultat est proche de celui de l'étude de Chiesa *et al* (2014), qui a mis en évidence une prévalence de 4% sur des bovins provenant du Nord-Ouest de l'Italie (Chiesa et al., 2014). De même, une autre étude, réalisée sur des prélèvements de bovins provenant d'Argentine, a publié une prévalence de cette espèce de 3,7% (Moré et al., 2013). Cependant, une étude ayant eu lieu au Vietnam a publié quant à elle une prévalence beaucoup plus importante, d'une valeur de 44% (Jehle et al., 2009).

Nos résultats montrent que chaque espèce de *Sarcocystis* semble avoir un site d'élection différent pour le développement des kystes intramusculaires. En effet, *S. cruzi* a été détecté dans 70,4% des prélèvements de myocarde contre 20,8% des prélèvements de muscles lésionnels (caparaçon le plus souvent). Ces résultats concordent avec ceux de l'étude de Bertin (2013) qui a montré que *S. cruzi* était présent dans près de 60% des prélèvements de myocarde contre environ 25% des prélèvements de muscles squelettiques (Bertin, 2013).

S. hominis a été mis en évidence dans 85% des prélèvements de muscles lésionnels contre 65,3% des prélèvements de myocarde. Ces résultats sont également en accord avec ceux de l'étude de Bertin qui a mis en évidence une prévalence de cette espèce d'environ 80% dans les muscles squelettiques contre près de 50% dans le myocarde.

Ces résultats justifient l'importance d'effectuer plusieurs prélèvements musculaires, dont au moins un prélèvement de myocarde, pour une recherche parasitaire. Il pourrait être intéressant d'effectuer des analyses sur des prélèvements d'autres muscles, également considérés comme site de localisation privilégiée de kystes sarcocystiques, comme les muscles masséters et la langue (Bucca et al., 2011), afin d'identifier les espèces enkystées et rechercher une éventuelle présence de *S. hirsuta*.

Une étude récente a mis en évidence qu'il existait une quatrième espèce pouvant avoir les bovins comme hôte intermédiaire : *S. sinensis* (Moré et al., 2014). L'hôte définitif de cette espèce, qui a déjà été décrite chez le buffle domestique (*Bubalus bubalis*), n'est pas encore connu (Yang et al., 2001). Dans leur étude, Moré *et al.* publient que *S. sinensis* peut infecter les bovidés et qu'il s'agit d'une espèce particulièrement présente chez les bovins élevés en Allemagne, avec une prévalence de 37%, contre 6,2% pour *S. hominis*. Ainsi, selon Moré *et al.*, les fortes similitudes histologiques des kystes et les très faibles différences biomoléculaires qui existent entre ces deux espèces pourraient avoir conduit à une surestimation de la prévalence de *S. hominis*, au dépend de *S. sinensis*. Cependant, cette hypothèse est contredite par une autre étude, qui considère que comme la description de *S. sinensis* n'a jamais été publiée selon les règles en vigueur du code international de nomenclature zoologique (ICZN), on ne peut pas considérer *S. sinensis* comme une nouvelle espèce (Dubey et al., 2014). D'autres études seront nécessaires afin d'approfondir cette situation et de déterminer si *S. sinensis* est une nouvelle espèce ou une sous-espèce de *S. hominis*.

4.4. Apparition des lésions de myosite éosinophilique

4.4.1. Selon le parasitisme à *Sarcocystis*

Notre étude a montré qu'il n'y avait pas d'association privilégiée de *S. cruzi* et *S. hominis* vis-à-vis des populations saisies et témoins. Les infections doubles ne semblent donc pas avoir d'influence dans l'apparition des lésions de myosite éosinophilique. Ce résultat est notamment en accord avec l'étude de Bertin, qui avait montré qu'une double infection n'était pas une condition nécessaire à la formation des lésions de ME (Bertin et al., 2014). Nos résultats montrent également que *S. cruzi* est significativement plus présent chez les animaux témoins que chez les animaux saisis, avec près de 55% des prélèvements témoins infectés par cette espèce contre moins de 38% des prélèvements saisis. Ce résultat est également en accord avec l'étude de Bertin, qui avait mis en évidence la présence de *S. cruzi* dans 61% des prélèvements témoins contre 23% des prélèvements issus de bovins saisis (Bertin et al., 2014). Cependant, contrairement à ce qui avait été mis en évidence dans cette étude, nous n'avons pas obtenu de différence significative en ce qui concerne la présence de *S. hominis* seul, bien qu'il semble être plus souvent isolé seul chez les bovins saisis que chez les bovins témoins. Pourtant, une autre étude (Chiesa et al., 2014) montre, comme Bertin, la prédominance de *S. hominis* dans les lésions de ME, en ayant prélevé l'échantillon de muscle au centre de la lésion. Ces différents résultats suggèrent un rôle protecteur de l'infection par *S. cruzi* et l'influence de *S. hominis* dans l'apparition des lésions de ME. Ces éléments semblent être des facteurs qui seraient particulièrement intéressants à explorer.

4.4.2. Selon les conditions d'élevage

L'analyse du questionnaire d'enquête a permis de mettre en évidence plusieurs facteurs de risques. Parmi ces facteurs de risque, la présence de paratuberculose et la vaccination des animaux (notamment des vaches) semblent être des facteurs de risques particulièrement pertinents vis-à-vis de l'apparition de lésions de myosite éosinophilique.

De plus, une durée de pâturage court, et donc une durée d'élevage en bâtiment longue semble positivement corrélée à l'apparition de lésions de ME.

Ces différents résultats suggèrent que les élevages concernés par des saisies pour ME ont des animaux dont l'activité du système immunitaire pourrait être accrue, par la présence d'agents infectieux, dont le développement est particulièrement intense dans les phases d'élevage en bâtiment, et la présence de paratuberculose notamment.

A l'heure actuelle, aucun lien entre une infection à *Mycobacterium avium subs paratuberculosis* (agent responsable de la paratuberculose des ruminants) et l'apparition de ME n'a été mis en évidence. Une étude conjointe menée par l'ESA (Ecole Supérieure d'Agriculture, d'Angers), en 2014, a également montré que les élevages concernés par des saisies pour ME étaient significativement plus concernés par la présence de paratuberculose (Anonyme, 2014). Du point de vue immunologique, les ME sont des granulomes où de très nombreux granulocytes éosinophiliques sont amassés. Ces cellules, qui possèdent également un rôle dans les processus d'hypersensibilité (Day & Schultz, 2011), ont été mises en évidence dans les lésions chroniques de la maladie de Crohn. Cette maladie humaine est caractérisée par une inflammation importante des intestins, comme ce qu'on peut voir lors de paratuberculose bovine. Bien qu'on en ignore encore l'étiologie, le rôle de *Mycobacterium avium subs paratuberculosis* est toujours suspecté. Ainsi, les travaux de Rubio (2003) ont mis en évidence la présence de granulocytes éosinophiliques dans 57% de biopsies réalisés sur des patients atteints de la maladie de Crohn (Rubio, 2003). En particulier, 40% des biopsies montraient une éosinophilie très sévère. Il serait donc intéressant, d'une part, d'étudier le statut des animaux saisis pour myosite éosinophilique vis-à-vis de la paratuberculose, et d'autre part, de rechercher s'il existe des réactions croisées entre les antigènes sarcocystiques et paratuberculeux, expliquant une réaction immunitaire modifiée de ces individus face aux parasites et causant l'apparition des lésions de ME.

De plus, en ce qui concerne l'immunité anti-parasitaire, il est admis que certaines interleukines (notamment IL 4 et IL 10), et certains lymphocytes T de type Th2 peuvent avoir un rôle régulateur dans la réponse immunitaire de l'hôte (Bach, 1999). Ces facteurs interviennent également dans la réponse immunitaire lors de la paratuberculose (Collins, 2011). Il serait également intéressant d'étudier une éventuelle relation entre les facteurs sécrétés par les différentes cellules immunitaires lors d'une inflammation causée par *Mycobacterium avium subs paratuberculosis* et les facteurs intervenant dans les formations de granulomes éosinophiliques. De même ces liens pourraient être recherchés pour toutes autres causes d'inflammations chroniques ou répétées, qui pourraient provenir d'un environnement défavorable (durée d'élevage en bâtiment plus longue par exemple).

D'autres facteurs de risques ont été identifiés. Parmi ceux-ci, la présence de faunes sauvages sur pâtures (étourneaux notamment) et la présence de mares et d'étangs à proximité des animaux et auxquels ils ont accès semblent être des facteurs de risques importants vis-à-vis de l'apparition de lésions de myosite éosinophilique. De plus, la présence d'habitations à proximité des exploitations semble également être un facteur de risque, mais d'importance moindre. Ces différents éléments peuvent être considérés comme des facteurs de forte présence d'ookystes à proximité des animaux. En effet, les animaux de la faune sauvage ont déjà été décrits comme véhicules biologiques d'ookystes de *Sarcocystis* (Euzéby, 1998). De même, les zones humides, comme les mares et les étangs, sont des milieux favorables à la survie des ookystes (Savini et al., 1997 (b)). Il est donc envisageable que ces zones soient des lieux de forte concentration en ookytes de *Sarcocystis*. Enfin, concernant la présence d'habitations à proximité des exploitations, *S. hominis* ayant l'homme pour hôte définitif, il est possible que la présence humaine favorise la présence d'ookystes, en particulier d'ookystes appartenant à *S. hominis*, à proximité des animaux.

Ces résultats suggèrent donc que les animaux saisis pour myosite éosinophilique proviennent d'élevages où les conditions sont propices à une forte pression parasitaire à proximité des animaux. Par conséquent, ces bovins pourraient être soumis à une exposition répétée au parasite et pourraient ingérer des doses infectantes d'ookystes plus importantes par rapport aux bovins des élevages n'étant pas situés dans des conditions similaires.

L'immunité mise en place par les bovins face à *Sarcocystis* est une immunité de prémunition et la qualité de cette réaction est notamment proportionnelle à la quantité d'ookystes ingérés (Euzéby, 1998). Les kystes issus d'une ingestion d'ookystes ne dégèrent qu'après une période minimale de 3 mois, mais peuvent persévérer plus d'un an. Un bovin peut donc accumuler des parasites sur de longues périodes. On peut ainsi supposer qu'une accumulation importante d'ookystes pourrait être à l'origine d'une réaction immunitaire assez forte de l'animal, se traduisant par ces réactions éosinophiliques dont le but est la destruction des parasites. Il serait donc intéressant d'essayer de quantifier la densité de l'infection des prélèvements, par la mise en place d'une PCR quantitative par exemple.

Une autre donnée, manquante à notre étude, pourrait avoir son importance. Il s'agit de la période de la première infection des hôtes. En effet, les jeunes animaux sont très peu concernés par les myosites éosinophiliques, mais nous ne savons pas s'ils sont indemnes ou parasités par *Sarcocystis*. Des analyses sérologiques ont déjà été mises au point et pourraient être employées dans une étude future (Savini et al., 1997 (a)). Dans l'hypothèse où la lésion de myosite éosinophilique serait en partie due à une forte accumulation de parasites, cette information aurait toute son importance. De même, un suivi sérologique des bovins depuis leur naissance permettrait d'identifier les premières contaminations (correspondant à une séroconversion) et de savoir si elles ont lieu plutôt en bâtiments ou au contraire au pâturage. En outre, très peu d'informations sont disponibles concernant une transmission transplacentaire. Si une telle transmission s'avérait possible, comme pour *Neospora caninum* par exemple, toute l'analyse agro-environnementale établie pour la sarcosporidiose n'aurait plus la même signification. Une étude pourrait facilement être mise en place à partir de prélèvements réalisés à l'abattoir sur des veaux non nés.

CONCLUSION

L'objectif de cette étude était d'approfondir les connaissances sur l'apparition des lésions de myosite éosinophilique chez la Blonde d'Aquitaine. En accord avec des études précédentes, nous avons montré que la prévalence de l'infection à *Sarcocystis* chez cette race avoisine les 100% et que les saisies pour myosite éosinophilique concernent près de 0,5% des carcasses de Blonde d'Aquitaine abattues en région Pays de la Loire en 2013, entraînant des conséquences économiques non négligeables.

Cette race apparaît en effet particulièrement sujette à développer des lésions de myosite éosinophilique bien que le profil des animaux saisis ainsi que leur conduite d'élevage ne semblent pas être différents des données concernant une race très peu saisie, en l'occurrence la race Charolaise. Un facteur génétique ne doit pas être exclu et devra être exploré.

L'analyse par PCR Multiplex de 218 prélèvements de muscles striés squelettiques et cardiaques, provenant d'un total de 123 bovins, a permis de confirmer l'existence de sites électifs différents pour *S. cruzi*, principalement localisé dans le myocarde, et pour *S. hominis*, localisé dans les muscles squelettiques le plus souvent. *S. hirsuta* n'a été mis en évidence que chez deux bovins et semble une espèce très peu présente en région Pays de la Loire. De plus, *S. cruzi* a davantage été mis en évidence dans les prélèvements témoins alors que *S. hominis* semble être plus souvent isolé seul chez les bovins saisis pour myosite éosinophilique que chez les bovins témoins. Cela suggère un rôle protecteur de *S. cruzi* dans l'apparition de la myosite éosinophilique.

L'étude de la conduite d'élevage, grâce à un questionnaire présenté dans 54 élevages de Blondes d'Aquitaines, a permis de mettre en évidence des pistes de recherche pouvant expliquer l'apparition des lésions de myosite éosinophilique. D'une part, le rôle de l'immunité semble un des éléments déclencheurs, et des animaux ayant une stimulation excessive de leur système immunitaire seraient plus concernés par le développement de lésions de myosite éosinophilique. En particulier, les élevages atteints de paratuberculose et vaccinant régulièrement leurs animaux seraient davantage concernés par les myosites éosinophiliques. D'autre part, il est envisageable que les lésions de myosite éosinophilique apparaissent suite à une exposition importante à *Sarcocystis*. En effet, il semble que les élevages ayant eu des saisies présentent des conduites d'élevages plus à risques vis-à-vis d'une éventuelle contamination des animaux.

L'apparition de la myosite éosinophilique apparaît donc répondre à un déterminisme multifactoriel. Nous avons en effet mis en relief l'intervention de l'espèce de *Sarcocystis*, de la dose infectante et de l'exposition répétée au parasite, de la stimulation du système immunitaire, de la présence de l'agent de la paratuberculose et de la race du bovin. Afin d'exploiter ces pistes, d'autres études seront nécessaires. Il serait intéressant de connaître le statut des bovins saisis vis-à-vis de la paratuberculose et d'explorer la piste d'une réaction croisée ou d'un dérèglement du système immunitaire des animaux infectés par *Mycobacterium avium subs paratuberculosis*. De même, une étude permettant de connaître la période de la première infection des bovins, par suivi sérologique, pourrait apporter de nouvelles connaissances concernant la contamination des animaux et l'apparition des lésions de myosite éosinophilique.

Afin d'explorer le rôle protecteur de *S. cruzi*, il pourrait être intéressant d'essayer de mettre au point une technique permettant d'évaluer la densité de l'infection des différentes espèces de *Sarcocystis*, chez des animaux saisis et des animaux témoins.

Annexes

Annexe 1 : Protocole de digestion enzymatique

Matériel :

- Falcon de 1 L
- Flacon de 200 mL avec bouchon
- Eprouvette de 100 mL
- Pipette graduée de 5 mL
- Eau distillée
- Pepsine 2 000 FIP U/g
- NaCl
- HCl 37%
- Balance
- Couteau
- Mixeur à viande
- Sachet de décongélation pour viande hachée
- Bain-marie 37°C avec agitateur
- Tamis avec mailles de 400 µm
- Ampoule à décanter
- Tubes de prélèvement de 20 mL
- Pipettes graduées de 2 mL
- Tubes de 1,5 mL pour congélation

Technique :

- Mettre le bain marie à chauffer à 37 °C.

- 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 2 000 FIP U/g, Merck®)
 - 5 g de NaCl
 - 4,7 mL 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® 1 000 W).

- Prélever 20 g et les placer dans un flacon de 200 mL avec 100 mL de S₀ (Placer les 180 g restants en sachets de congélation et les congeler à -20 °C).

- 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 cones
- Tube Eppendorf de 1,5 mL
- Bain-marie sec à 70°C
- Vortex
- Ethanol à 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 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 de 1,5 mL.
 - Ajouter 180 µL de Buffer T1.
 - Ajouter 25 µL de protéinase K.
 - Incuber une heure à 56°C (Il est possible, dans un souci d'organisation, de laisser les prélèvements incuber pendant la nuit).

 - **Lyse de l'échantillon**
 - Vortex.
 - Ajouter 200 µL de B3.
 - Vortex.
 - Incubation 10 minutes au bain-marie sec à 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 à la membrane de 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.
 - Eliminer 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 des colonnes dans des tubes Eppendorf auxquels on retirera le couvercle.
- Ajouter 100 μL 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 Eppendorf.

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

Annexe 3 : Protocole de PCR Multiplex *Sarcocystis spp.*

Matériel :

- Tubes PCR
- Micropipettes et cônes
- Tube Eppendorf de 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 :

Réactifs	Concentration finale	Quantité (en μL)
H ₂ O		11,4
Tampon PCR	1 mM	2,5
MgCl ₂ (à 25 mM)	1,5 mM	1,5
Amorce 1	1 μM	1
Amorce 2	1 μM	1
Amorce 3	1 μM	1
Amorce 4	1 μM	1
dNTP	0,2 mM	0,5
Taq polymérase (EurobioTaq®)	0,5 unité/ 25 μL	0,1

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

Amorce 1 : Amorce réverse *Sarcocystis spp.*
5' AACCTAATTCCCCGTTA 3'

Amorce 2 : Amorce sens *Sarcocystis cruzi*.
5' ATCAGATGAAAATCTACTACATGG 3'

Amorce 3 : Amorce sens *Sarcocystis hominis*.
5' ACAGAACCAACACGCTC 3'

Amorce 4 : Amorce sens *Sarcocystis hirsuta*.
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 d'ADN dans chaque tube PCR.

Pour le témoin positif, ajouter 1 µL d'ADN de témoin positif.

Pour le témoin négatif, ajouter 5 µL d'eau autoclavée.

- Amplification :

Introduire les tubes dans le thermocycleur (iCycler de BIORAD®), 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 à 2% dans du TBE 0,5 X

Introduire dans chaque puits 20 µL de produit PCR + 5 µL de solution de dépôt.

Consacrer un puits au dépôt du marqueur : en déposer 7 µL.

Faire migrer dans un tampon TBE 0,5 X, pendant 45 minutes à 100 Volts et 400 mA.

- Interprétation :

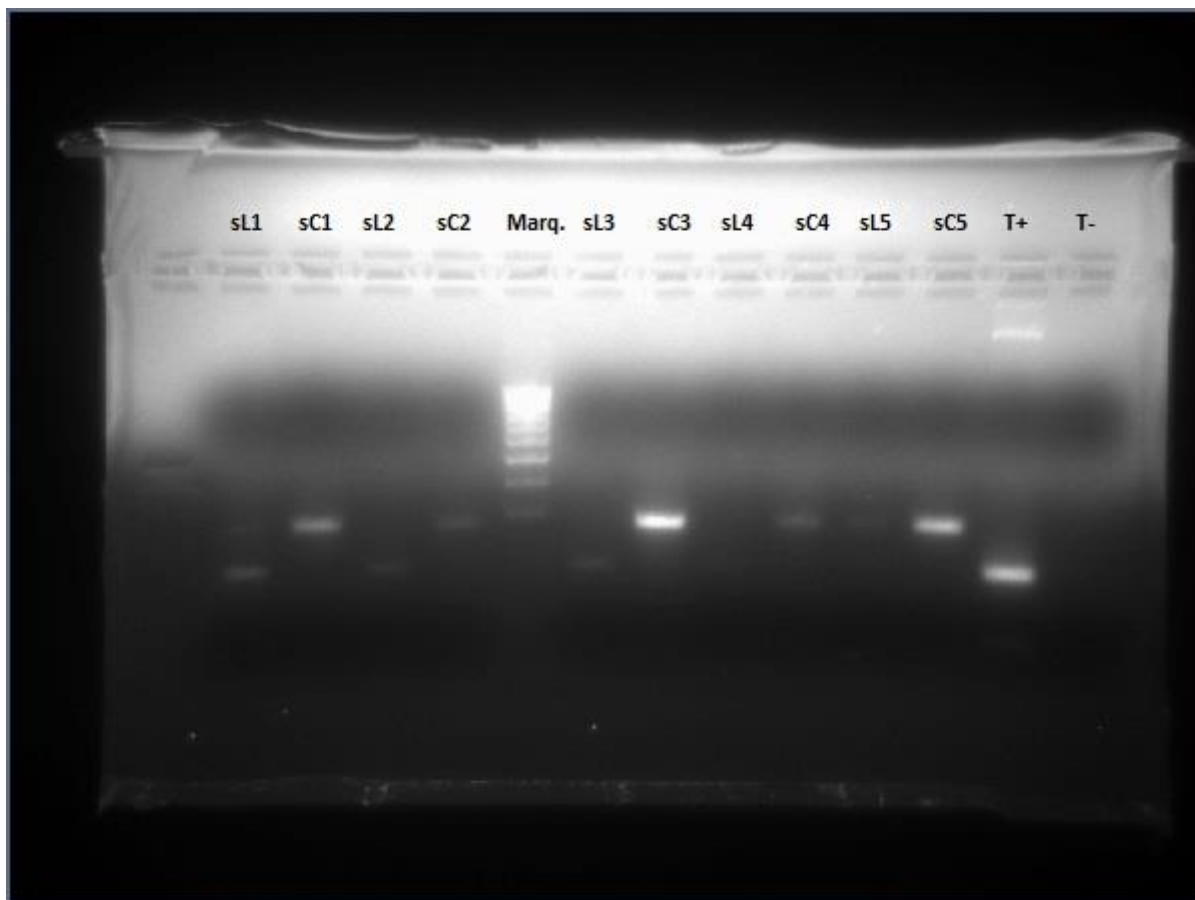
Fragments amplifiés selon l'espèce de *Sarcocystis* :

Sarcocystis hirsuta 108 pb

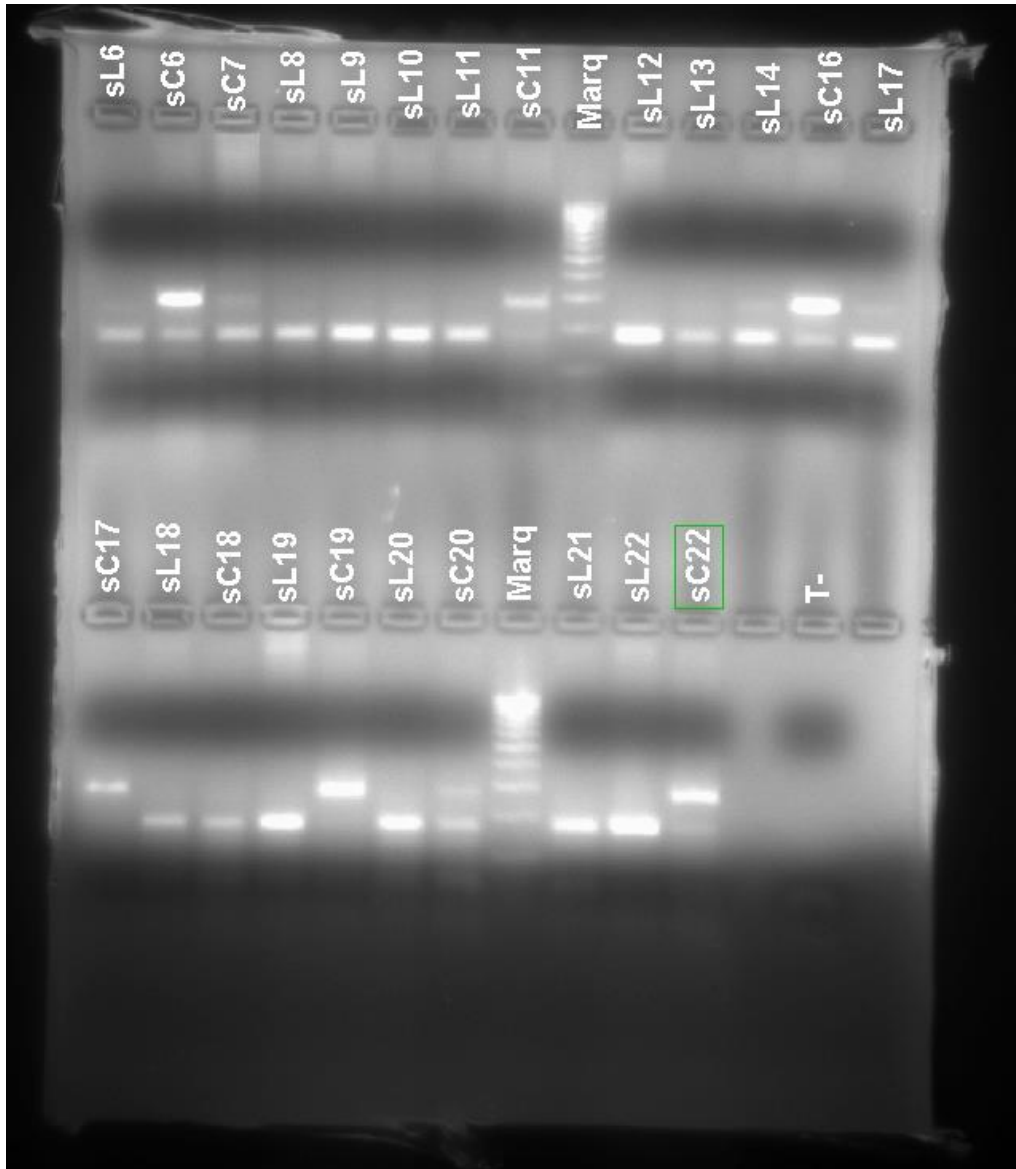
Sarcocystis hominis 182 pb

Sarcocystis cruzi 284 pb

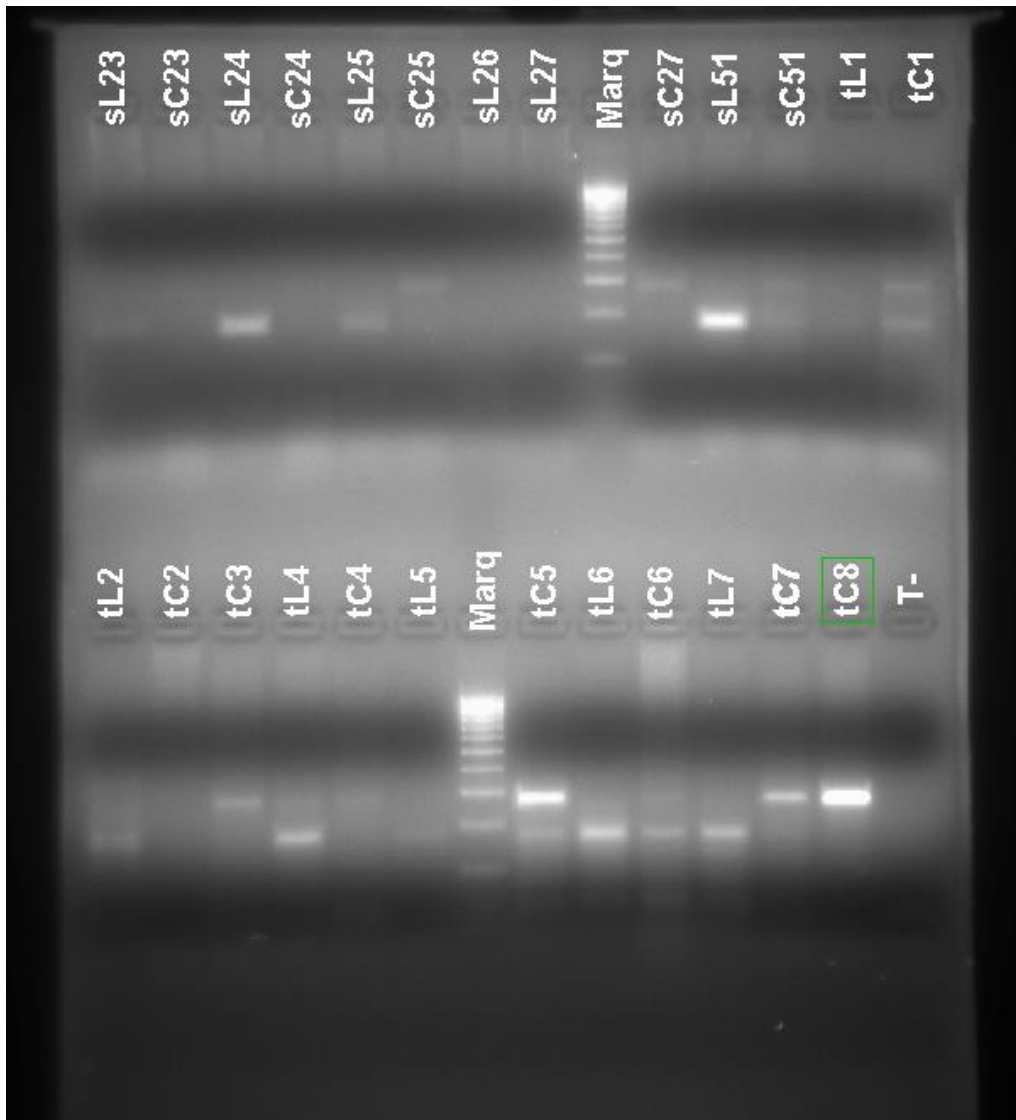
Annexe 4 : Résultats des électrophorèses observées à la lumière UV



PCR n° 1			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
sL1	Positif (182 + 284 pb)	sL4	Négatif
sC1	Positif (284 pb)	sC4	Positif (284 pb)
sL2	Positif (182 pb)	sL5	Positif (284 pb)
sC2	Positif (284 pb)	sC5	Positif (284 pb)
sL3	Positif (182 pb)	T+ (témoin positif)	Positif
sC3	Positif (284 pb)	T- (témoin négatif)	Négatif

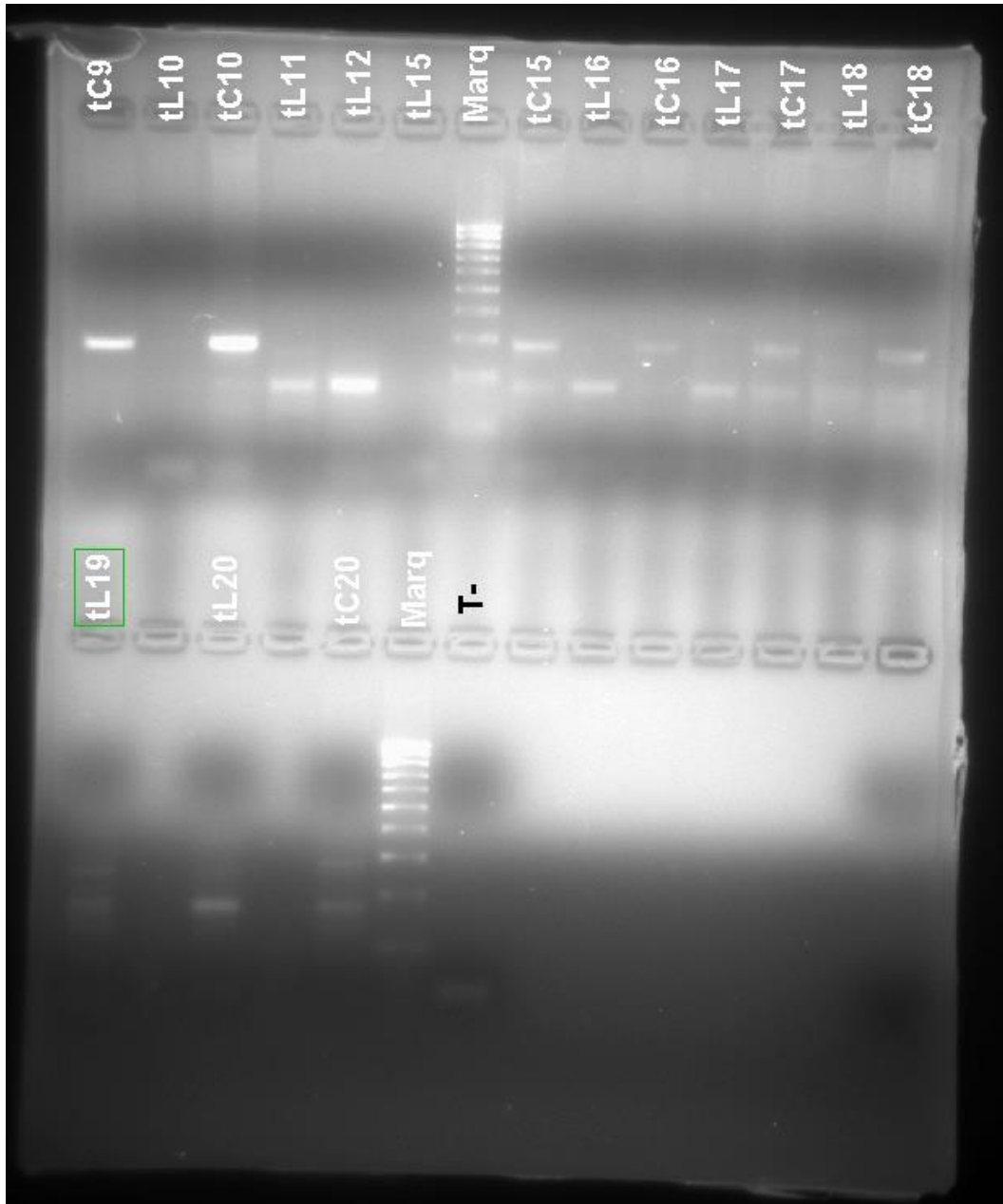


PCR n° 2			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
sL6	Positif (182 pb)	sL17	Positif (182 + 284 pb)
sC6	Positif (182 + 284 pb)	sC17	Positif (284 pb)
sC7	Positif (182 + 284 pb)	sL18	Positif (182 pb)
sL8	Positif (182 pb)	sC18	Positif (182 pb)
sL9	Positif (182 pb)	sL19	Positif (182 pb)
sL10	Positif (182 pb)	sC19	Positif (284 pb)
sL11	Positif (182 pb)	sL20	Positif (182 pb)
sC11	Positif (182 + 284 pb)	sC20	Positif (182 + 284 pb)
sL12	Positif (182 pb)	sL21	Positif (182 pb)
sL13	Positif (182 pb)	sL22	Positif (182 pb)
sL14	Positif (182 + 284 pb)	sC22	Positif (182 + 284 pb)
sC16	Positif (182 + 284 pb)	T-	Négatif

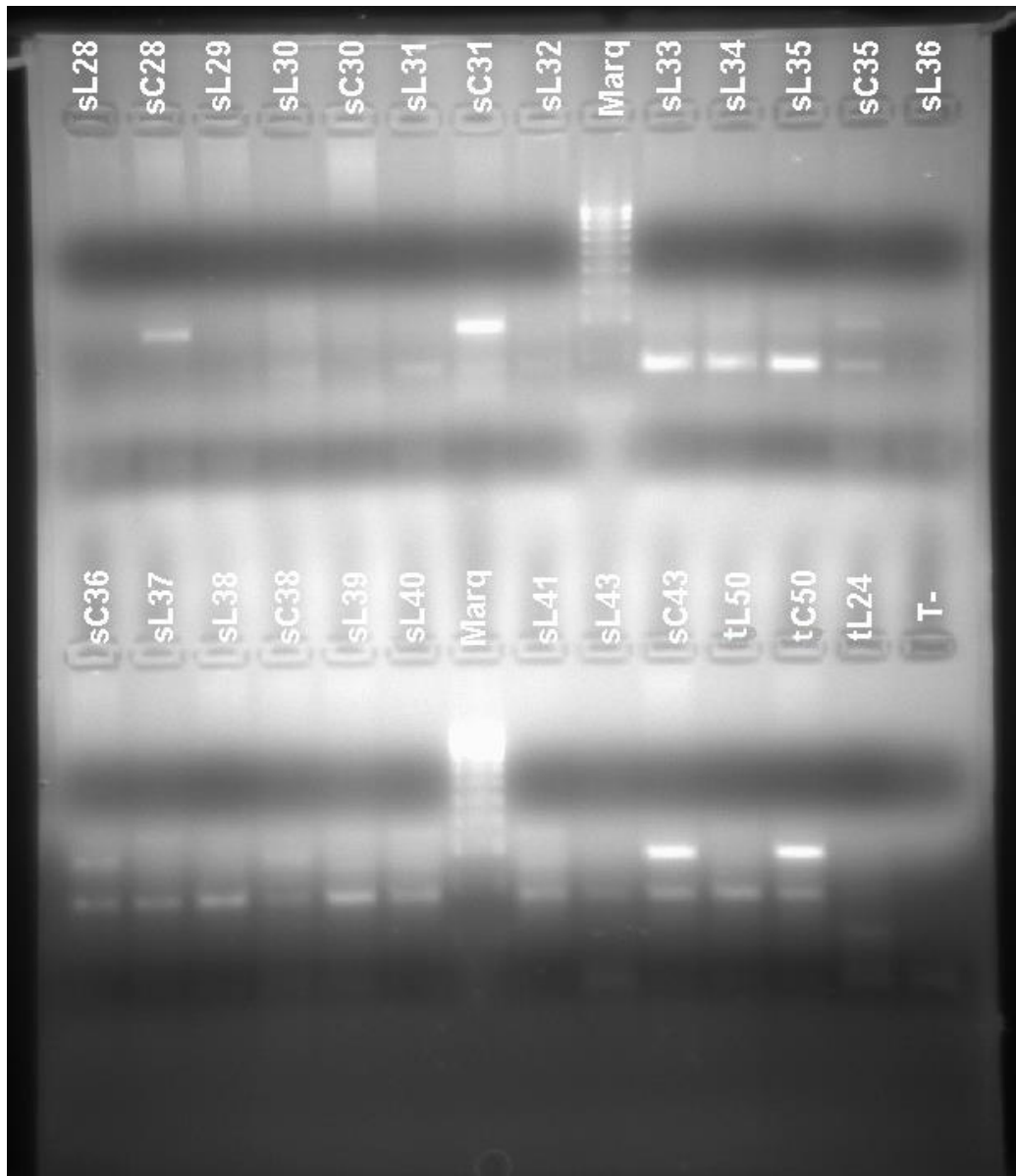


PCR n°3			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
sL23	Positif (182 pb)	tL2	Positif (182 pb)
sC23	Négatif	tC2	Négatif
sL24	Positif (182 pb)	tC3	Positif (284 pb)
sC24	Négatif	tL4	Positif (182 + 284 pb)
sL25	Positif (182 pb)	tC4	Positif (284 pb)
sC25	Positif (284 pb)	tL5	Positif (182 pb)
sL26	Négatif	tC5	Positif (182 + 284 pb)
sL27	Négatif	tL6	Positif (182 pb)
sC27	Positif (284 pb)	tC6	Positif (182 + 284 pb)
sL51	Positif (182 pb)	tL7	Positif (182 pb)
sC51	Positif (182 + 284 pb)	tC7	Positif (284 pb)
tL1	Positif (182 pb)	tC8	<i>Exclu a posteriori*</i>
tC1	Positif (182 + 284 pb)	T-	Négatif

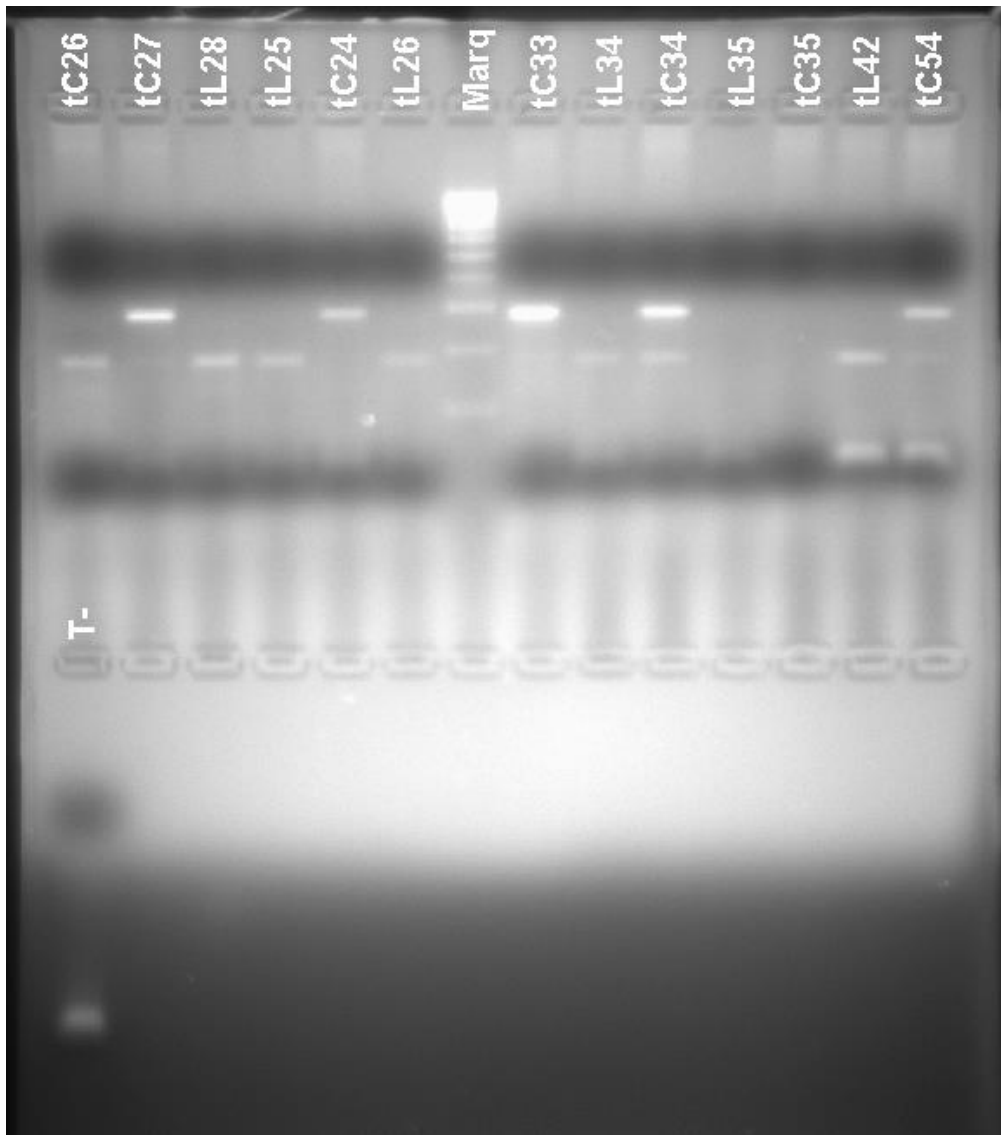
* Prélèvements exclus par non-respect des critères d'inclusions à l'étude.



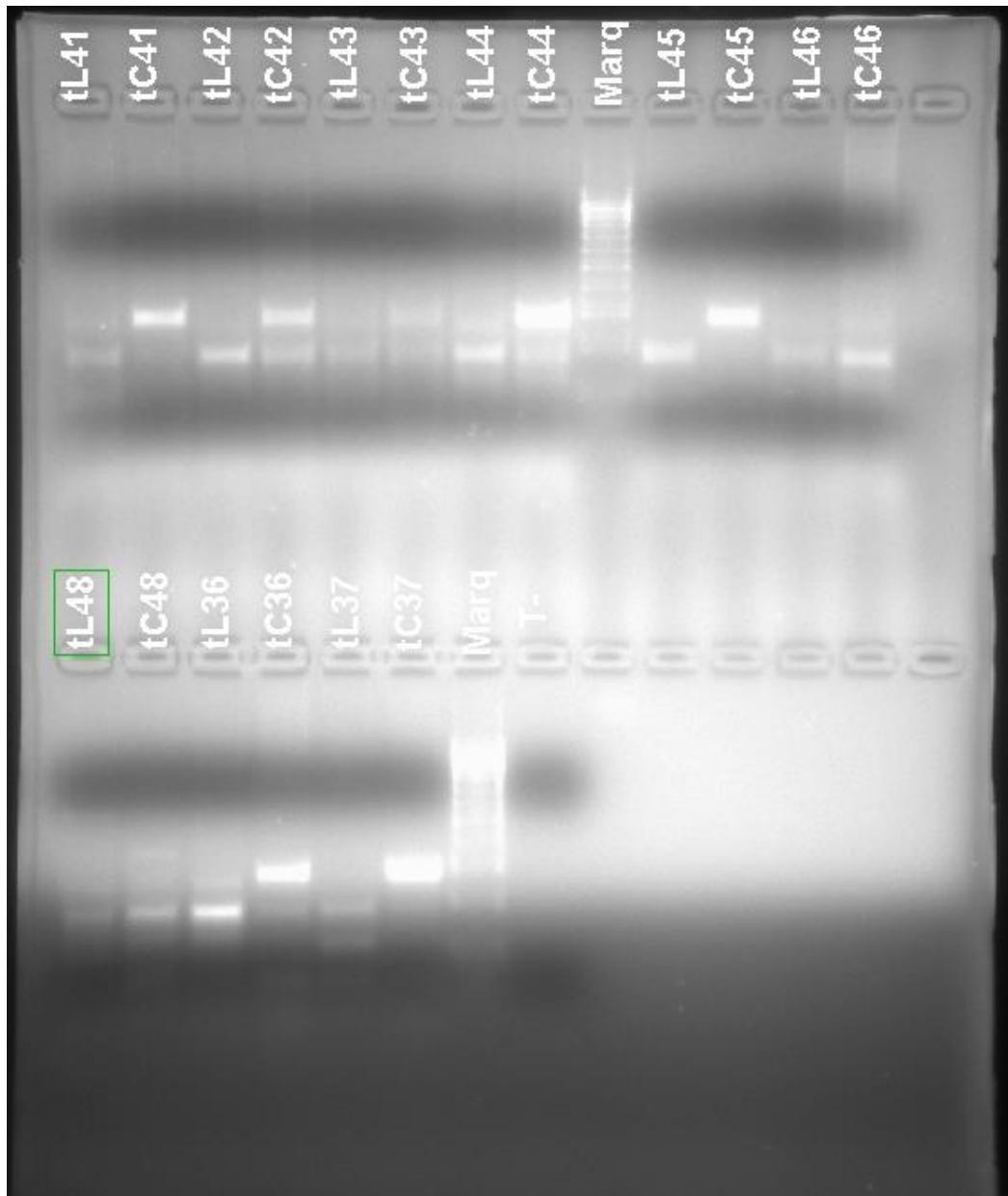
PCR n°4			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
tC9	<i>Exclu a posteriori</i>	tC17	Positif (182 + 284 pb)
tL10	<i>Exclu a posteriori</i>	tL18	Positif (182 pb)
tC10	<i>Exclu a posteriori</i>	tC18	Positif (182 + 284 pb)
tL11	Positif (182 pb)	tL19	Positif (182 + 284 pb)
tL12	Positif (182 pb)	tL20	Positif (182 pb)
tL15	<i>Exclu a posteriori</i>	tC20	Positif (182 + 284 pb)
tC16	<i>Exclu a posteriori</i>	T-	Négatif
tL17	Positif (182 pb)		



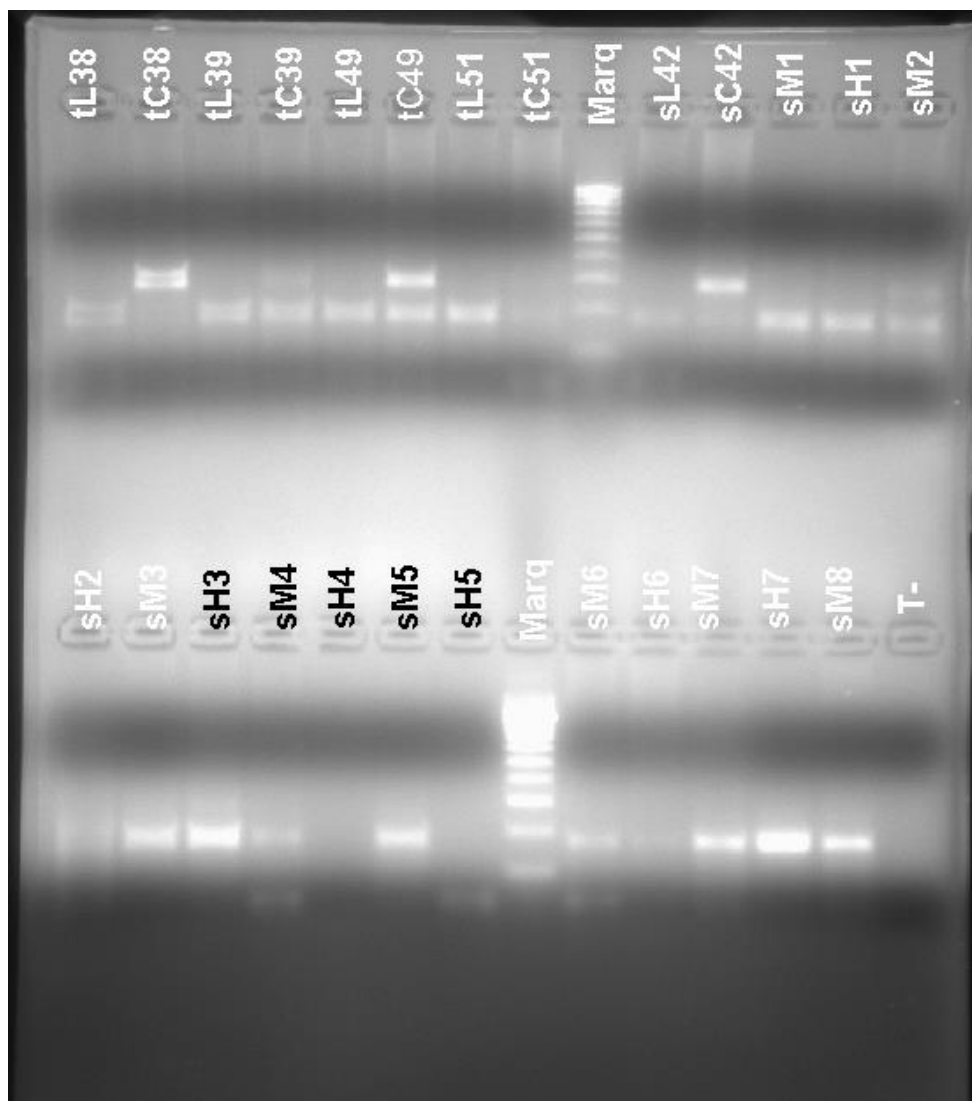
PCR n°5			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
sL28	Négatif	sC36	Positif (182 + 284 pb)
sC28	Positif (284 pb)	sL37	Positif (182 pb)
sL29	Négatif	sL38	Positif (182 pb)
sL30	Positif (182 pb)	sC38	Positif (182 + 284 pb)
sC30	Négatif	sL39	Positif (182 pb)
sL31	Positif (182 pb)	sL40	Positif (182 pb)
sC31	Positif (182 + 284 pb)	sL41	Positif (182 pb)
sL32	Positif (182 pb)	sL43	Positif (182 pb)
sL33	Positif (182 pb)	sC43	Positif (182 + 284 pb)
sL34	Positif (182 pb)	tL50	Positif (182 pb)
sL35	Positif (182 pb)	tC50	Positif (182 + 284 pb)
sC35	Positif (182 + 284 pb)	tL24	Positif (104 pb)
sL36	Négatif	T-	Négatif



PCR n°6			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
tC26	Positif (182 pb)	tL34	Positif (182 pb)
tC27	Positif (182 +284 pb)	tC34	Positif (182 +284 pb)
tL28	Positif (182 pb)	tL35	Négatif
tL25	<i>Exclu a posteriori</i>	tC35	Négatif
tC24	Positif (284 pb)	tL42	Positif (182 pb)
tL26	Positif (182 pb)	tC54	<i>Exclu a posteriori</i>
tC33	Positif (182 +284 pb)	T-	Négatif

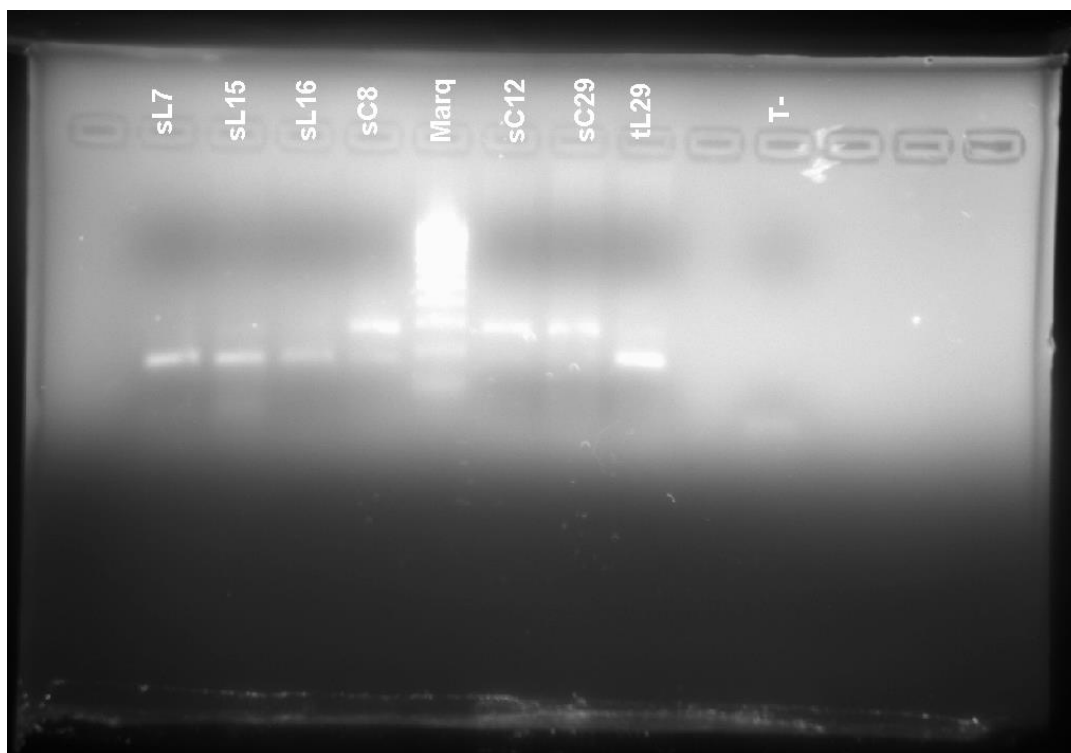


PCR n°7			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
tL41	Positif (182 +284 pb)	tL46	Positif (182 pb)
tC41	Positif (284 pb)	tC46	Positif (182 pb)
tL42	Positif (182 pb)	tL48	Positif (182 +284 pb)
tC42	Positif (182 +284 pb)	tC48	Positif (182 +284 pb)
tL43	Positif (182 +284 pb)	tL36	Positif (182 +284 pb)
tC43	Positif (182 +284 pb)	tC36	Positif (182 +284 pb)
tL44	Positif (182 +284 pb)	tL37	Positif (104 + 182 pb)
tC44	Positif (182 +284 pb)	tC37	Positif (182 +284 pb)
tL45	Positif (182 pb)	T-	Négatif
tC45	Positif (284 pb)		



PCR n°8			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
tL38	Positif (182 pb)	sH2	<i>Exclu de l'étude*</i>
tC38	Positif (284 pb)	sM3	<i>Exclu de l'étude*</i>
tL39	Positif (182 pb)	sH3	<i>Exclu de l'étude*</i>
tL39	Positif (182 + 284 pb)	sM4	<i>Exclu de l'étude*</i>
tL49	Positif (182 pb)	sH4	<i>Exclu de l'étude*</i>
tC49	Positif (182 + 284 pb)	sM5	<i>Exclu de l'étude*</i>
tL51	Positif (182 pb)	sH5	<i>Exclu de l'étude*</i>
tC51	Positif (182 pb)	sM6	<i>Exclu de l'étude*</i>
sL42	Positif (182 pb)	sH6	<i>Exclu de l'étude*</i>
sC42	Positif (182 + 284 pb)	sM7	<i>Exclu de l'étude*</i>
sM1	<i>Exclu de l'étude*</i>	sH7	<i>Exclu de l'étude*</i>
sH1	<i>Exclu de l'étude*</i>	sM8	<i>Exclu de l'étude*</i>
sM2	<i>Exclu de l'étude*</i>	T-	Négatif

* : H = hampe, M = masséter, ces prélèvements ont été retirés de l'étude par manque de prélèvements, notamment chez les animaux témoins.



PCR n° 9			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
sL7	Positif (182 pb)	sC12	Positif (182 + 284 pb)
sL15	Positif (182 pb)	sC29	Positif (182 + 284 pb)
sL16	Positif (182 pb)	tL29	Positif (182 pb)
sC8	Positif (182 + 284 pb)	T- (témoin négatif)	Négatif

Annexe 5 : Questionnaire d'enquête

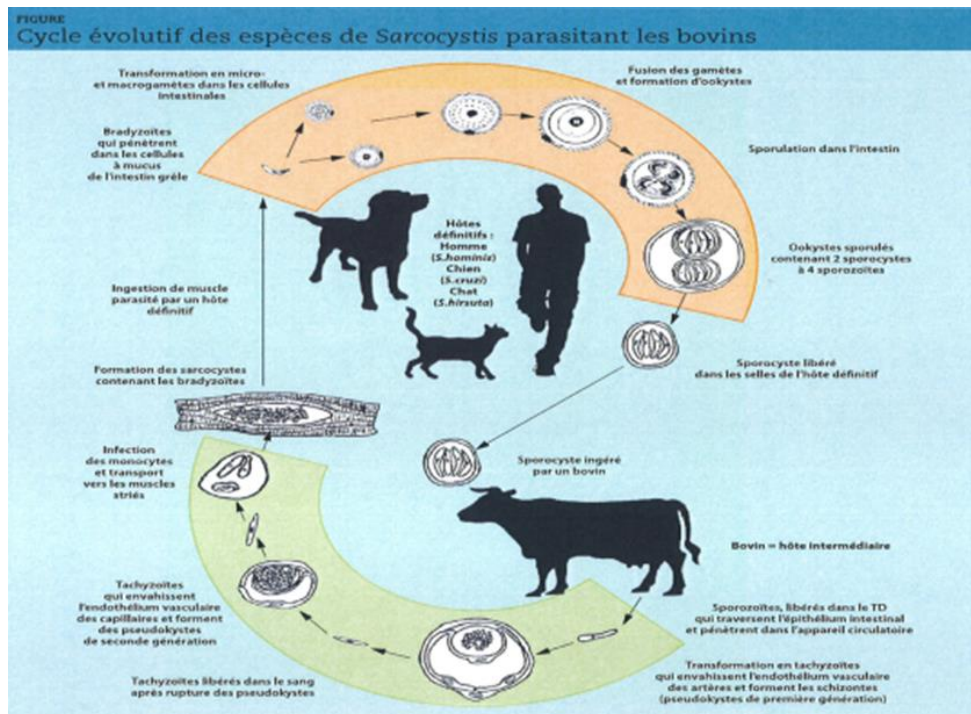


Élevage :	CAS	TEMOIN
Nom et adresse :		
Numéro d'élevage :		

Historique sarcosporidiose :

IPG	Élevage naisseur	Élevage engraisseur	Date abattage	Âge à l'abattage	Temps de présence

Existe-t-il un lien de parenté entre les animaux saisis? OUI / NON



Source : Cappelier (2012, ONIRIS)

Surfaces :

Surface d'exploitation	
Surface céréalière	
Surface fourragère (prairie + ensilage)	
Autres	

Partie 2 : Alimentation des animaux

Protocole alimentaire :

Veaux	Âge au sevrage :	
	Aliment complémentaire (type, à partir de quel âge) :	
Taurillons	Aliments :	
	Quantité moyenne par jour :	
Vaches	Ration habituelle Aliments :	Engraissement Aliments : Concentrés : Quantité par jour :
Génisses	Ration habituelle Aliments :	Engraissement Aliments : Concentrés : Quantité par jour :

Partie 3 : Risques sanitaires liés à l'alimentation et l'abreuvement

Provenance des aliments :

	Foin	Paille	Ensilage Maïs	Ensilage Herbe	Enrubannage	Concentré	Autres
Production sur place							
Achat							

Distribution des aliments :

Concentrés	Fourrage/ensilage
Manuel <input type="checkbox"/>	Manuel <input type="checkbox"/>
Mécanique : Dessileuse <input type="checkbox"/> Autres <input type="checkbox"/> Mélangeuse <input type="checkbox"/>	Mécanique : Dessileuse <input type="checkbox"/> Autres <input type="checkbox"/> Mélangeuse <input type="checkbox"/>
Matériel INDIVIDUEL / COLLECTIF Protocole de nettoyage si existant (fréquence, produit) :	Matériel INDIVIDUEL / COLLECTIF Protocole de nettoyage si existant (fréquence, produit) :

Abreuvement : Source principale : 1 Source secondaire/intermittente : 2

	Réseau public	Puits / Forage	Mare/Étang	Ruisseau	Autres
Stabulation					
Près					

• L'eau de boisson des animaux est-elle analysée : OUI / NON

Fréquence :

Conformité : OUI / NON

• Stockage de l'ensilage :

Préciser la surface (béton, terre...)

• Possédez-vous des terrains inondés auxquels les bovins ont accès: OUI / NON

Si oui, combien d'hectares :

Partie 4 : Pâturage et environnement

Environnement à proximité des pâtures :

	Sur pâture	Le long des pâtures (clôture)	À distance (en km)	
Forêt / Bois				
Rivière				
Ruisseau				
Marre/Étang				
Station épuration				En AVAL / AMONT des pâtures

• Traitements sur pâtures (type chaux...) : OUI / NON

Fréquence :

Type de traitement :

• Possédez-vous une fumière : OUI / NON

Avez-vous un système de récupération du purin : OUI / NON

Si oui, précisez :

Enrichissement des sols :

	Pâture	Délais pâturage	Culture
Épandage fumier			
Épandage lisier / purin			
Épandage boue de STEP			
Épandage/vidange fosse septique			
Épandage d'échanges inter-élevage			
Autres :			

Partie 5 : Situation sanitaire de l'élevage

Litière :

Composition	Fréquence de paillage	Provenance (Produite / Achat)

Les animaux sont-ils sur litière accumulée : OUI / NON

• Fréquence de curage/raclage de la litière :

Protocole de nettoyage :

	Fréquence	Protocole (eau claire/ désinfection...), si existant
Bâtiments		
Abreuvoirs		
Matériel (tracteur, godet....)		

Devenir des délivrances :

En stabulation :

Au champ :

Protocoles vaccinaux (troubles respiratoires, diarrhées, BVD, IBR, entérotoméie...):

Veaux	
Taurillons	
Génisses	
Vaches	

Maladies ou troubles récurrents dans l'élevage (diarrhées, troubles respiratoires, ectoparasites (gale, teigne...), parasites internes...etc) :

Veaux	
Taurillons	
Génisses	
Vaches	

Situation vis-à-vis des affections suivantes :

	Épisodes passés (fréquence annuelle ou année de l'épisode)	Épisodes présents (fréquence annuelle)
Paratuberculose		
BVD		
IBR		
Coccidioses		
Infertilité		
Avortements		

Protocole de vermifugation :

	Entrée en stabulation	Pendant la période de stabulation	Mise à l'herbe	Pendant la saison de pâturage
Jeune <1an				
Jeune <2ans				
Adulte <3ans				
Adulte >3ans				
Vermifuge : molécule / nom déposé / forme galénique				

- Les animaux de réforme sont-ils vermifugés systématiquement avant l'engraissement ? OUI / NON

Anticoccidiens chez le veau:

Systématique	Cas par cas individuel	Cas par cas collectif (traitement de tout le lot)	Molécule / Forme galénique
Age :			

La vermifugation était-elle différente avant l'apparition du premier cas de myosite éosinophilique ?
OUI / NON

Si oui :

	Entrée en stabulation	Pendant la période de stabulation	Mise à l'herbe	Pendant la saison de pâturage
Jeune <1an				
Jeune <2ans				
Adulte <3ans				
Adulte >3ans				
Vermifuge : molécule / nom déposé / forme galénique				

- Avez-vous des retours d'abattoir concernant la douve ? OUI / NON

Si oui, précisez :

- Avez-vous déjà eu des cas de cysticercoses ? OUI / NON

Partie 6 : Risques sanitaires liés à la présence humaine

Distance habitations/exploitation :

	Distance à l'exploitation (en centaine de m)
Votre habitation	
Autres habitations	

Raccordement des sanitaires :

	Fosse septique	Tout-à-l'égout	Fosse à lisier
Votre habitation			
Sanitaire de l'exploitation			
Autres habitations			
Autres (gîte,...)			

- Connaissez-vous le lieu de sortie de votre fosse septique ? OUI NON
- Précisez : AMONT / AVAL des pâtures

- Avez-vous développé une activité de type vente directe, chambre d'hôte, camping à la ferme, vacances à la ferme, visite de ferme sur votre exploitation. (Une activité qui amène à recevoir de nombreuses personnes extérieures à l'exploitation) ? OUI NON

Présence humaine à proximité des pâtures :

- Route très fréquentée
- Aire de repos
- Aire de jeux
- Camping aménagé
- Camping sauvage
- Ligne SNCF
- Passage de chasseurs
- Passage de pêcheurs
- Passage de randonneurs
- Autres (précisez) :

Consommation de viande BOVINE :

					Quantité/semaine
Après congélation	Toujours	Souvent	Quelques fois	Jamais	
Fraîche	Toujours	Souvent	Quelques fois	Jamais	

Vous mangez votre viande : BLEUE / SAIGNANTE / A POINT / CUITE

Consommez-vous de la viande issue de votre cheptel : OUI UNIQUEMENT / OUI + Achats / NON

Lavage des mains :

Vous lavez-vous les mains avant de manipuler les aliments des animaux : OUI / NON

Partie 7 : Risques sanitaires liés à la présence d'animaux

Présence d'animaux :

	Exploitation	Bâtiments	Silo	Fourrage/Ensilage	Pâtures
Chien en liberté					
Chien (chenil/attaché)					
Chat domestique					
Chats errants					
Volailles hors-sol					
Volailles plein-air					
Ovins					
Caprins					
Porcins					
Équins					
Renards					
Ragondins					
Rongeurs					
Corbeaux / Pies					
Mouettes / Goélands					
Pigeons					
Étourneaux					
Sangliers					
Lapins / Lièvres					
Chevreaux / Cervidés					
Autres					

• Dératisation : OUI / NON

Fréquence :

Alimentation des carnivores domestiques :

	Croquettes	Boîtes	Viande crue	Restes de repas	Chasse
Chien					
Chat					

Élimination des excréments des carnivores domestiques :

	Oui	Non	Si oui, où :
Chien			
Chat			

Situation sanitaire des carnivores domestiques :

	Vermifugation (fréquence)	Vaccination	Maladies intercurrentes
Chien			
Chat			

Annexe 6 : Matrice de corrélations des variables explicatives retenues lors de la régression logistique

	Durée pâturage	Episodes de paratuberculose	Etourneaux sur Pâtures	Présence de Mare/ Etang	Vaccination des vaches	Proximité habitations
Durée pâturage	/	0,8782	0,9573	0,8469	0,2563	0,9875
Episodes de paratuberculose	0,8782	/	0,1939	0,0691	0,3568	0,8847
Etourneaux sur Pâtures	0,9573	0,1939	/	0,0184*	0,0841	0,6482
Présence de Mare/ Etang	0,8469	0,0691	0,0184*	/	0,8610	0,8551
Vaccination des vaches	0,2563	0,3568	0,0841	0,8610	/	0,5215
Proximité habitations	0,9875	0,8847	0,6482	0,8551	0,5215	/

*Coefficient de corrélation de Pearson : **0,3390**

BIBLIOGRAPHIE

- ACHA, P.N., SZYFRES, B., 2005. Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux, 3ème édition, Vol. III : Zoonoses parasitaires. OIE, 399 p.
- ANONYME, 2014. Etude de l'influence des pratiques d'élevages, des techniques agronomiques et de l'environnement sur l'expression de la sarcosporidiose bovine dans les élevages de Blonde d'Aquitaine en Pays de la Loire. Travail d'étude réalisé par les étudiants de 3ème année (promotion 114) option herbivores du groupe ESA (Ecole Supérieure d'Agriculture d'Angers) 56 p.
- BACH, J.F., 1999. Immunologie. 3ème Edition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris (France), p. 172.
- 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, Nantes. 136 p.
- BERTIN, M., ROSSERO, A., ALBARIC, O., OUDOT, N., WILLEMSE, C., CHIESA, F., CAPPELIER, J.M., 2014. *Sarcocystis hominis* is frequently associated with bovine eosinophilic myositis. Food Micro, 24th International ICFMH Conference, Nantes, Abstract book 473.
- 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.
- 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. Experimental Parasitology, 115 (4), 393–398.
- CHIESA, F., BIASIBETTI, E., CAPUCCHIO, M.T., CIVERA, T., 2014. Eosinophilic myositis in Piedmontese cattle breed: the role of *Sarcocystis hominis*. Food Micro, 24th International ICFMH Conference, Nantes, Abstract book, 437.
- CHIESA, F., DALMASSO, A., DOMENIS, I., 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.
- COLLINS, M.T., 2011. Johne's Disease. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 27 (3), 540–541.
- DAUGSCHIES, A., HINTZ, J., HENNING, M., ROMMEL, M., 2000. Growth performance, meat quality and activities of glycolytic enzymes in the blood and muscle tissue of calves infected with *Sarcocystis cruzi*. Veterinary parasitology, 88, 7–16.
- DAY, M.J., SCHULTZ, R.D., 2011. Veterinary Immunology: Principles and Practice. Manson Publishing.
- DEPARTEMENT ECONOMIE DE L'INSTITUT DE L'ELEVAGE, 2013. 2012, L'année économique viande bovine, Perspectives 2013. Le dossier Economie de l'Élevage 80 p.
- DESPORTES-LIVAGE, I., DATRY, A., 2005. Infections à microsporidies, *Isospora* et *Sarcocystis*. EMC-Maladies Infectieuses, 2, 178–196.

- DUBEY, J.P., FAYER, R., ROSENTHAL, B.M., CALERO-BERNAL, R., UGGLA, A., 2014. Identity of *Sarcocystis* species of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle (*Bos taurus*) and the suppression of *Sarcocystis sinensis* as a *nomen nudum*. *Veterinary Parasitology* 1–6.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., 2006. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 22, 645–671.
- DUBEY, J.P., SPEER, C., FAYER, R., 1989. *Sarcocystosis of animals and man*. CRC Press Inc., 215 p., Boca Raton, Florida.
- ENGLE, T.E., SPEARS, J.W., BROWN, T.T., LLOYD, K.E., 1999. Effect of breed (Angus vs Simmental) on immune function and response to a disease challenge in stressed steers and preweaned calves. *Journal of animal science* 77 (3), 516–521.
- 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., 1998. Les parasites des viandes : épidémiologie, 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 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. Thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de Médecine de Nantes, ENVN, Nantes, 155 p.
- GAJADHAR, A.A., MARQUARDT, W.C., 1992. Ultrastructural and transmission evidence of *Sarcocystis cruzi* associated with eosinophilic myositis in cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 56, 41–46.
- 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.
- GJERDE, B., 2013. Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. *International Journal for Parasitology*, 43 (7), 579–591.
- GRANSTROM, D.E., RIDLEY, R.K., BAOAN, Y., GERSHWIN, L.J., NESBITT, P.M., WEMPE, L.A., 1989. Type-I hypersensitivity as a component of eosinophilic myositis (muscular sarcocystosis) in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 50 (4), 571–574.
- GÜCLÜ, F., ALDEM-R, O.S., GULER, 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.
- GUENEGAN, C., 2009. Facteurs de risque de saisie en abattoir pour sarcosporidiose chez les bovins : étude en région Pays de la Loire. Thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de Médecine de Nantes, ENVN, Nantes. 122 p.
- HONORE, A., 2011. Etude de l'implication de *Sarcocystis spp.* dans le développement des myosites éosinophiliques chez les bovins. Thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de Médecine de Nantes, Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique, Nantes. 104 p.
- 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 07 septembre 2014.

- 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. *American Journal of Veterinary Research* 47 (3), 587–593.
- LATIF, B., VELLAYAN, S., HEO, C.C., KANNAN KUTTY, M., OMAR, E., ABDULLAH, S., TAPPE, D., 2013. High prevalence of muscular sarcocystosis in cattle and water buffaloes from Selangor, Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 30 (4), 699–705.
- MARY, N., 2005. La sarcosporidiose bovine : Rôle dans les lésions de myosites éosinophiliques et espèces impliquées. Thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de Médecine de Nantes, ENVN, Nantes. 83 p.
- MORE, G., ABRAHAMOVICH, P., JURADO, S., BACIGALUPE, D., MARIN, J.C., RAMBEAUD, M., VENTURINI, L., VENTURINI, M.C., 2011. Prevalence of *Sarcocystis spp.* in Argentinean cattle. *Veterinary Parasitology*, 177, 162–165.
- MORE, G., BACIGALUPE, D., BASSO, W., RAMBEAUD, M., BELTRAME, F., RAMIREZ, B., VENTURINI, M.C., VENTURINI, L., 2009. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, 160 (1-2), 51–54.
- MORE, G., PANTCHEV, A., SKUBALLA, J., LANGENMAYER, M.C., MAKSIMOV, P., CONRATHS, F.J., VENTURINI, M.C., SCHARES, G., 2014. *Sarcocystis sinensis* is the most prevalent thick-walled *Sarcocystis* species in beef on sale for consumers in Germany. *Parasitology Research*, 113 (6), 2223–2230.
- MORE, G., SCHARES, S., MAKSIMOV, A., CONRATHS, F.J., VENTURINI, M.C., SCHARES, G., 2013. Development of a multiplex real time PCR to differentiate *Sarcocystis spp.* affecting cattle. *Veterinary Parasitology*, 197, 85–94.
- 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. *Veterinary parasitology*, 66 (1), 19–24.
- ONO, M., OHSUMI, T., 1999. Prevalence of *Sarcocystis spp.* cysts in Japanese and imported beef (Loin: *Musculus longissimus*). *Parasitology international*, 48 (1), 91–94.
- PARLEMENT EUROPEEN, 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. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, L226, disponible en ligne: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0083:0127:FR:PDF>.
- RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., HINCHCLIFF, K.W., CONSTABLE, P.D., 2007. *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*. 10th Edition. Saunders, pp. 1507–1509.
- RUBIO, C.A., 2003. A method for the detection of eosinophilic granulocytes in colonoscopic biopsies from IBD patients. *Pathology-Research and Practice* 199 (3), 145–150.
- SAITO, M., SHIBATA, Y., KUBO, M., SAKAKIBARA, I., YAMADA, A., ITAGAKI, H., 1998. First Isolation of *Sarcocystis hominis* from Cattle in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61 (3), 307–309.

- 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. *Veterinary Parasitology*, 64, 319–327.
- SAVINI, G., ROBERTSON, I.D., DUNSMORE, J.D., 1997a. Sensitivities and specificities of two ELISA tests for detecting infection with *Sarcocystis* in cattle of Western Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, 32, 35–40.
- SAVINI, G., ROBERTSON, I.D., DUNSMORE, J.D., 1997b. Viability of the sporocysts of *Sarcocystis cruzi* after exposure to different temperatures and relative humidities. *Veterinary Parasitology* 67, 153–160.
- TENTER, A.M., 1995. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *International Journal for Parasitology*, 25 (11), 1311–1330.
- VANGEEL, L., HOUF, K., CHIERS, K., VERCRUYSSSE, J., D'HERDE, K., DUCATELLE, R., 2007. Molecular-based identification of *Sarcocystis hominis* in Belgian minced beef. *Journal of Food Protection* 70 (6), 1523–1526.
- VANGEEL, L., HOUF, K., GELDHOF, P., DE PRETER, K., VERCRUYSSSE, J., DUCATELLE, R., CHIERS, K., 2013. Different *Sarcocystis spp.* are present in bovine eosinophilic myositis. *Veterinary Parasitology*, 197 (3-4), 543–548.
- VANGEEL, L., HOUF, K., GELDHOF, P., NOLLET, H., VERCRUYSSSE, J., DUCATELLE, R., CHIERS, K., 2012. Intramuscular inoculation of cattle with *Sarcocystis* antigen results in focal eosinophilic myositis. *Veterinary Parasitology*, 183 (3-4), 224–230.
- VERCRUYSSSE, J., FRANSEN, J., VAN GOUBERGEN, M., 1989. The prevalence and identify of *Sarcocystis* cysts in cattle in Belgium. *Journal of Veterinary Medicine B* 36, 148–153.
- WOUDA, W., SNOEP, J.J., DUBEY, J.P., 2006. Eosinophilic myositis due to *Sarcocystis hominis* in a beef cow. *Journal of Comparative Pathology*, 135, 249–253.
- XIANG, Z., CHEN, X., YANG, L., HE, Y., JIANG, R., ROSENTHAL, B.M., LUAN, P., ATTWOOD, S.W., ZUO, Y., ZHANG, Y., YANG, Z., 2009. Non-invasive methods for identifying oocysts of *Sarcocystis spp.* from definitive hosts. *Parasitology international*, 58 (3), 293–296.
- XIANG, Z., HE, Y., ZHAO, H., ROSENTHAL, B.M., DUNAMS, D.B., LI, X., ZUO, Y., FENG, G., CUI, L., YANG, Z., 2011. *Sarcocystis cruzi*: Comparative studies confirm natural infections of buffaloes. *Experimental Parasitology*, 127, 460–466.
- YANG, Z.-Q., LI, Q.-Q., ZUO, Y.-X., CHEN, X.-W., CHEN, Y.-J., NIE, L., WEI, C.-G., ZEN, J.-S., ATTWOOD, S.W., ZHANG, X.-Z., ZHANG, Y.-P., 2002. Characterization of *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. *Experimental Parasitology*, 102 (3-4), 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. *Molecular and Biochemical Parasitology* 115, 283–288.

Vu : **Le Professeur Rapporteur**

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

Professeur

J.-Y. Capelle



Vu : **Le Directeur Général**

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

Et par délégation

PROFESSEUR LUCILE MARTIN
Unité de nutrition & endocrinologie

J. MARTIN

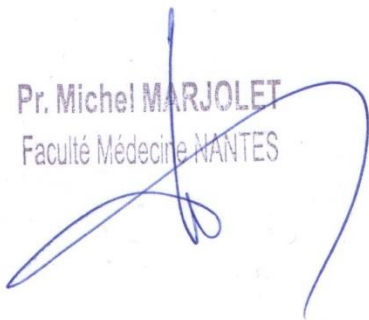


Nantes, le 22 SEP. 2014

Vu : **Le Président de la Thèse**

Professeur

Pr. Michel MARJOLET
Faculté Médecine NANTES



Vu : Le Doyen de la Faculté de
Médecine de Nantes

Professeur Pascale JOLLIET

Vu et permis d'imprimer

NOM : LENIEUX

Prénom : Dimitri

MYOSITE EOSINOPHILIQUE ET SARCOSPORIDIOSE BOVINE : ETUDE CIBLEE CHEZ LA BLONDE D'AQUITAINE

EOSINOPHILIC MYOSITIS AND BOVINE SARCOCYSTIOSIS : STUDY FOCUSED ON THE BLONDE D'AQUITAINE BREED

RESUME

La Blonde d'Aquitaine est une race bovine particulièrement concernée par les saisies pour myosite éosinophilique. L'implication de *Sarcocystis* dans ces lésions est fortement suspectée mais n'est pas encore confirmée. Une première étude, réalisée avec une analyse par PCR Multiplex sur un total de 218 prélèvements provenant de 123 bovins, a permis de montrer que *S. cruzi* est plus souvent mis en évidence chez les animaux non saisis alors que *S. hominis* seul semble davantage présent chez les animaux saisis. Une seconde étude, réalisée à l'aide d'un questionnaire d'enquête proposé à 54 éleveurs de Blondes d'Aquitaines en Pays de la Loire, fait apparaître que le déterminisme de l'apparition de la myosite éosinophilique est multifactoriel, faisant intervenir différents facteurs comme la dose infectante, l'exposition répétée au parasite, la stimulation du système immunitaire et la présence de l'agent de la paratuberculose.

MOTS-CLES

Sarcosporidiose, *Sarcocystis*, bovin, myosite éosinophilique, parasite, Blonde d'Aquitaine, saisies de carcasse, prévalence de maladies, réaction de polymérisation, sondage (enquête), questionnaire, conduite d'élevage, paratuberculose.

SUMMARY

Blonde d'Aquitaine is a cattle breed which is often condemned for bovine eosinophilic myositis. Although *Sarcocystis* is thought to be involved in eosinophilic myositis development, its implication is not completely known. A first 218 muscle samples study using a Multiplex PCR, coming from 123 cattle, showed that *S. cruzi* is more often detected in control samples and *S. hominis* seems to be more often detected alone in condemned cattle. A second study, realised with an enquiry questionnaire and proposed to 54 Blonde d'Aquitaine breeder in Pays de la Loire, showed that bovine eosinophilic myositis determinism is multifactorial : infectious dose, repeated exposure to parasite, immune system activity and the presence of Johne's disease agent seem to play a role.

KEY WORDS

Sarcocystiosis, *Sarcocystis*, cattle, eosinophilic myositis, parasite, Blonde d'Aquitaine, condemned carcasses, disease prevalence, polymerisation reaction, enquiry, questionnaire, livestock breeding, Johne's disease.

JURY :

Président : Monsieur Michel MARJOLET, Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes
Rapporteur : Monsieur Jean-Michel CAPPELIER, Maître de Conférences à Oniris-Nantes
Assesseur : Monsieur Albert AGOULON, Maître de Conférences à Oniris-Nantes
Membre invité : Monsieur Nicolas OUDOT, Vétérinaire conseil à Bovi-Loire (Angers)

ADRESSE DE L'AUTEUR :

31 rue Erik Satie
14740 BRETTEVILLE L'ORGUEILLEUSE

NOM DE L'IMPRIMEUR :

Imprimerie d'Oniris - Nantes