

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

ANNEE 2016

**SARCOSPORIDIOSE BOVINE :
ETUDE DE LA TRANSMISSION TRANSPLACENTAIRE**

THESE
pour le
diplôme d'Etat
de
DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement
le 10 octobre 2016
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Léa, Amandine, Cécilia POIRIER

Née le 12 décembre 1990 à Le Mans (72)

JURY

Président : Monsieur Didier LEPELLETIER
Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

Membres : Rapporteur : Monsieur Jean-Michel CAPPELIER
Professeur à Oniris-Nantes

Assesseur : Monsieur Albert AGOULON
Maître de Conférences à Oniris-Nantes

Membre invité : Monsieur Nicolas OUDOT
Vétérinaire Conseil à Interbev Pays de la Loire

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

ANNEE 2016

SARCOSPORIDIOSE BOVINE : ÉTUDE DE LA TRANSMISSION TRANSPLACENTAIRE

THESE
pour le
diplôme d'Etat
de
DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement
le 10 octobre 2016
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Léa, Amandine, Cécilia POIRIER

Née le 12 décembre 1990 à Le Mans (72)

JURY

Président : Monsieur Didier LEPELLETIER
Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

Membres : Rapporteur : Monsieur Jean-Michel CAPPELIER
Professeur à Oniris-Nantes

Assesseur : Monsieur Albert AGOULON
Maître de Conférences à Oniris-Nantes

Membre invité : Monsieur Nicolas OUDOT
Vétérinaire Conseil à Interbev Pays de la Loire



ENSEIGNANTS-CHERCHEURS DE Oniris

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

Directrice Générale : Dominique BUZONI-GATEL

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 (MC) Martine KAMMERER (Pr)	Hervé POULIQUEN (Pr) Jean-Claude DESFONTIS (Pr)
PHYSIOLOGIE FONCTIONNELLE, CELLULAIRE et MOLECULAIRE	Lionel MARTIGNAT (Pr) Jean-Marie BACH (Pr)	Grégoire MIGNOT (MC) Julie HERVE (MC)
HISTOLOGIE ET ANATOMIE PATHOLOGIQUE	Jérôme ABADIE (MC)	Frédérique NGUYEN (MC) Marie-Anne COLLE (Pr)
PATHOLOGIE GENERALE, MICROBIOLOGIE et IMMUNOLOGIE	François MEURENS (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) Clément CATANEO (MC)
MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE INDUSTRIELLE	Xavier DOUSSET (Pr) Bénédicte SORIN (Chef de travaux) Bernard ONNO (MC)	Hervé PREVOST (Pr) Emmanuel JAFFRES (MC) Nabila BERREHRAH-HADDAD (MC)
DEPARTEMENT DE SANTE DES ANIMAUX D'ELEVAGE ET SANTE PUBLIQUE		
HYGIENE ET QUALITE DES ALIMENTS	Michel FEDERIGHI (Pr) Bruno LE BIZEC (Pr) Catherine MAGRAS-RESCH (Pr)	Eric DROMIGNY (MC) Marie-France PILET (MC) Jean-Michel CAPPELLIER (Pr)
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 (Pr) 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) Suzanne BASTIAN-ORANGE (MC)
MALADIES REGLEMENTEES, REGLEMENTATION SANITAIRE ZONOSSES	Jean-Pierre GANIERE (Pr émérite) Carole PEROZ (MC)	Nathalie RUVOEN-CLOUET (MC)
ZOOTECNIE	Aurélien MADOUASSE (MCC) Xavier MALHER (Pr) François BEAUDEAU (Pr)	Christine FOURICHON (MC) Nathalie BAREILLE (Pr)
DEPARTEMENT DE SCIENCES CLINIQUES		
ANATOMIE COMPAREE	Eric BETTI (MC)	Claire DOUART (MC) Claude GUINTARD (MC)
CHIRURGIE, ANESTHÉSIOLOGIE	Olivier GAUTHIER (Pr) Béatrice LIJOUR (MC) Eric AGUADO (MC) Caroline TESSIER (MC)	Gwenola TOUZOT-JOURDE (MCC) Olivier GEFFROY (Pr) Eric GOYENVILLE (MC) Pr Pierre BARREAU (Pr A)
PARASITOLOGIE, AQUACULTURE, FAUNE SAUVAGE	Patrick BOURDEAU (Pr)	Vincent BRUET (MC)
MEDECINE INTERNE, IMAGERIE MÉDICALE et LEGISLATION PROFESSIONNELLE	Yves LEGEAY (Pr) Dominique FANUEL (Pr) Anne COUROUCE-MALBLANC (MC) Catherine IBISCH (MC) Nicolas CHOUIN (MC)	Marion FUSELLIER-TESSON (MC) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Odile SENECAT (MC) Françoise ROUX (MC)
BIOTECHNOLOGIES et PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION	Daniel TAINURIER (Pr) Francis FIENI (Pr) Jean-François BRUYAS (Pr)	Lamia BRIAND-AMIRAT (MC) Djemil BENCHARIF (MC)

DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCÉDES ALIMENTAIRES		
Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET PLOQUIN (MC) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Dominique DELLA VALLE (MC) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr) Dr TOUBLANC Cyril (MC)	Vanessa JURY (MC) Alain LEBAIL (Pr) Catherine LOISEL (MC) Jean-Yves MONTEAU (MC) Denis PONCELET	
DEPARTEMENT DE MANAGEMENT, STATISTIQUES ET COMMUNICATION		
MATHÉMATIQUES, STATISTIQUES - INFORMATIQUE	Véronique CARIOU (MC) Philippe COURCOUX (MC) El Mostafa QANNARI (Pr)	Michel SEMENOU (MC) Chantal THORIN (PCEA) Evelyne VIGNEAU (Pr)
ÉCONOMIE – GESTION - LEGISLATION	Pascal BARILLOT (MC) Yvan DUFEU (MC) Florence BEAUGRAND (MC)	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Sonia EL MAHJOUR (MC) Samia ROUSSELIÈRE (MC) Sybille DUCHAINE (MC)
COMMUNICATION - LANGUES	Franck INSIGNARES (PCEA) Linda MORRIS (PCEA) David GUYLER (PCEA)	Marc BRIDOU (PCEA) Shaun MEEHAN (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 :

POIRIER, L. (2016). Sarcosporidiose bovine : étude de la transmission transplacentaire. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine de Nantes. Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique. 152p.

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

REMERCIEMENTS

A Monsieur Didier LEPELLETIER

Professeur au service de Bactériologie, Virologie et Hygiène Hospitalière à la Faculté de Médecine de Nantes

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

Hommage respectueux.

A Monsieur Jean-Michel CAPPELIER,

Professeur au service Hygiène et Qualité des Aliments à ONIRIS,

Pour nous avoir fait l'honneur d'encadrer cette étude, pour avoir participé à notre jury de thèse, pour tous ses précieux conseils, sa gentillesse, sa patience et sa disponibilité.

Sincères remerciements

A Monsieur Albert AGOULON,

Maître de Conférences au service de Parasitologie-Aquaculture-Faune sauvage à ONIRIS,

Pour nous avoir fait l'honneur de participer à notre jury de thèse, pour tous ses conseils et ses relectures minutieuses.

Sincères remerciements.

A Monsieur Nicolas OUDOT,

Docteur vétérinaire conseil à Interbev Pays de la Loire,

Pour nous avoir fait l'honneur de participer à notre jury de thèse, pour son implication et ses conseils avisés tout au long de cette étude.

Sincères remerciements.

A Monsieur Philippe TESSEREAU,
Directeur d'Interbev Pays de la Loire,
Pour avoir été l'investigateur de cette étude.
Hommage respectueux.

A Monsieur Albert ROSSERO,
Ingénieur de recherche à ONIRIS,
Pour tous ses conseils techniques, sa gentillesse et sa disponibilité.
Sincères remerciements.

A Madame Agnès BOUJU,
Technicienne formation recherche
Pour sa gentillesse, sa patience et ses précieux conseils.
Sincères remerciements.

A Madame Lamia BRIAND-AMIRAT,
Maître de Conférences à ONIRIS
Pour son aide et ses conseils avisés.
Sincères remerciements.

A Nicolas BODIN,
Stagiaire dans l'unité UMR INRA 1014 SECALIM,
Pour son implication, son aide précieuse et sa gentillesse tout au long de cette étude.
Remerciements chaleureux.

A toute l'équipe de l'UMR INRA 1014 SELICAM, en particulier à Lucie, Benjamin,
Luiza, Simon, Nicolas, Valérie et Sandrine,
Pour leur accueil, leur gentillesse et leur bonne humeur.
Remerciements chaleureux.

Au personnel des abattoirs du Grand Ouest,
Pour leur aide durant les prélèvements, pour leur gentillesse et leur disponibilité.
Sincères remerciements.

A ma famille,

A mes parents,

Pour votre soutien en toute circonstance, pour votre écoute, votre gentillesse et votre affection. Merci de m'avoir donné les moyens d'arriver jusque-là. C'est grâce à vous que j'ai pu concrétiser tous mes projets, je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi.

A mes frères Victor et Arthur et ma sœur Lola,

Pour votre soutien, pour les bons moments passés ensemble et pour m'avoir supportée pendant toutes ces années.

A mes grands-parents, Lucien et Esther,

Pour vos encouragements et pour tous les bons moments passés ensemble.

A mes grands-parents, René et Marie-Thérèse

Pour tous ces bons souvenirs que je garde du temps passé avec vous. J'aurais aimé partager ce moment avec vous.

A Marina,

Pour ton soutien. Para los momentos agradables pasados en tu compañía, tengo el placer de conocerte.

A Nicool,

Pour m'avoir si souvent et si bien accueilli dans votre maison et dans votre famille. Pour votre soutien et votre gentillesse pendant toutes mes années d'étude. Pour votre aide si précieuse en anglais.

A Cédric,

Pour avoir toujours cru en moi, pour ton amour, ta gentillesse et ton soutien à toute épreuve. Pour tout ce que tu m'apportes depuis ces cinq années, pour tous les merveilleux moments passés ensemble et pour tous ceux qui restent à venir.

A mes amis,

A Soazig,

Pour tous les excellents moments passés en ta compagnie. Pour ton extrême gentillesse et ta bonne humeur. Pour tous nos fous rires et parce que sans toi, la prépa n'aurait pas été la même.

A Karen et Orianne,

Pour ces cinq superbes années passées avec vous. Pour m'avoir incluse dans votre petit duo. Pour toutes nos discussions, nos soirées télé, nos soirées à l'école et ailleurs et pour tous nos fous rires. Pour nos sorties sportives aussi bien avec l'une qu'avec l'autre. Et enfin pour avoir toujours été là pour moi. Ces cinq années n'auraient pas été pareilles sans vous. Vous allez me manquer.

A Franky, Audrey et Clémence,

Pour tous les bons moments passés ensemble, pour toutes nos soirées et pour tous nos fous rires. Vous allez me manquer.

A Marion, Pénélope, Nadia, Fanny et Camille,

Pour tous les bons moments passés en votre compagnie.

Au groupe « porc » (Caro, Marie, PCR, Mathilde et Héloïse)

Pour ces 3 mois de travaux de groupe qui se sont déroulés dans la joie et la bonne humeur grâce à vous tous. Ce fut un plaisir de travailler avec vous et de vous connaître un peu plus. Mention spéciale à Caro pour ces 3 superbes années de coloc' en ta compagnie.

Au groupe 3-4

Pour les bons moments passés ensemble.

A mes amis du lycée, en particulier à Antoine, Anne-Sophie, Ingrid et Angélique,

Pour toutes ces belles années passées avec vous, j'espère que nos chemins se croiseront à nouveau.

A tous mes maîtres de stage,

Et en particulier au docteur Lévêque, au docteur Arzul et au docteur Moriceau,

Pour leur accueil chaleureux, leur gentillesse et tous leurs précieux conseils. J'ai énormément appris à vos côtés.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	18
LISTE DES TABLEAUX	19
LISTE DES ANNEXES	21
LISTE DES ABREVIATIONS.....	22
INTRODUCTION.....	24

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 27

1. Caractères morphologiques et biologiques de <i>Sarcocystis</i> spp	29
1.1. Historique	29
1.2. Taxonomie	29
1.3. Etapes du cycle parasitaire.....	30
1.3.1. Chez l'hôte intermédiaire.....	31
1.3.2. Chez l'hôte définitif.....	32
1.4. Différentes modalités de transmission du parasite	32
1.5. Morphologie	33
1.5.1. Chez l'hôte intermédiaire.....	33
1.5.2. Chez l'hôte définitif.....	36
2. Pathogénie	37
3. Signes cliniques	37
3.1. Chez l'hôte intermédiaire : le bovin	37
3.1.1. Sarcosporidiose aiguë	37
3.1.2. Sarcosporidiose chronique	38
3.1.3. Myosite éosinophilique.....	39
3.2. Chez les hôtes définitifs.....	41
3.2.1. Chez les carnivores	41
3.2.2. Chez l'homme.....	42
4. Immunité.....	42
4.1. Chez l'hôte intermédiaire	42
4.2. Chez l'hôte définitif.....	43
5. Diagnostic	44
5.1. Chez l'hôte intermédiaire	44
5.1.1. Diagnostic clinique	44

5.1.2. Diagnostic <i>post-mortem</i>	44
5.1.3. Diagnostic de laboratoire	44
5.2. Chez l'hôte définitif.....	49
5.2.1. Diagnostic clinique	49
5.2.2. Diagnostic de laboratoire	49
6. Traitement.....	49
6.1. Chez l'hôte intermédiaire	49
6.2. Chez l'hôte définitif.....	50
7. Importance de la sarcosporidiose	50
7.1. Epidémiologie.....	50
7.1.1. Facteurs de risque de l'infection des bovins par <i>Sarcocystis</i>	51
7.1.2. Facteurs de risque du développement de lésions de myosite éosinophilique.....	52
7.2. Prévalence.....	52
7.2.1. Prévalence chez les bovins	52
7.2.1.1. Prévalence toutes espèces confondues	52
7.2.1.2. Prévalence en fonction des espèces.....	55
7.2.2. Prévalence chez l'homme	55
7.3. Importance économique.....	56
7.3.1. Pertes dues à l'infection par <i>Sarcocystis</i>	57
7.3.2. Pertes dues aux saisies à l'abattoir.....	57
7.4. Importance médicale.....	57
8. Méthodes de lutte.....	58
8.1. Prophylaxie médicale.....	58
8.1.1. Chez l'hôte intermédiaire.....	58
8.1.2. Chez l'hôte définitif.....	58
8.2. Prophylaxie sanitaire	58
8.2.1. Chez l'hôte intermédiaire.....	58
8.2.2. Chez l'hôte définitif.....	59

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE 63

1. Cadre et objectifs de l'étude.....	65
2. Matériels et méthodes.....	65
2.1. Echantillonnage	65
2.1.1. Prélèvements.....	65
2.2. Analyses.....	70
2.2.1. Digestion enzymatique	70
2.2.2. Extraction de l'ADN	70

2.2.3. PCR genre et PCR Multiplex Touch down.....	71
2.3. Etude statistique.....	75
3. Résultats.....	76
3.1. Caractéristiques des animaux prélevés	76
3.2. Etude des résultats des analyses moléculaires	78
3.2.1. Prévalence de la sarcosporidiose chez les mères	78
3.2.1.1. Prévalence de la sarcosporidiose toutes espèces confondues chez les mères	78
3.2.1.2. Prévalence de la sarcosporidiose par espèce chez les mères.....	78
3.2.1.3. Existence d'associations privilégiées d'espèces de <i>Sarcocystis</i> chez les mères	79
3.2.1.4. Prévalence de la sarcosporidiose chez les mères en fonction des types raciaux	80
3.2.2. Prévalence de la sarcosporidiose chez les fœtus.....	82
3.2.2.1. Prévalence de la sarcosporidiose toutes espèces confondues chez les fœtus	82
3.2.2.2. Prévalence de la sarcosporidiose par espèce chez les fœtus	82
3.2.2.3. Transmission de <i>Sarcocystis</i> aux fœtus lors de gémellité.....	83
3.2.2.4. Concordance entre l'espèce de <i>Sarcocystis</i> présente chez les mères et l'espèce retrouvée chez les fœtus positifs	83
3.2.3. Prévalence de la sarcosporidiose dans le placenta.....	84
3.3. Relation entre transmission transplacentaire et âge des mères.....	86
3.4. Relation entre transmission transplacentaire et stade de gestation.....	88
3.5. Relation entre transmission transplacentaire et race de la mère.....	89
3.6. Relation entre transmission transplacentaire et espèce de <i>Sarcocystis</i> parasitant les mères.....	91
3.7. Relation entre la présence de <i>Sarcocystis</i> dans le placenta et les caractéristiques des mères et des fœtus	92
4. Discussion	94
4.1. Collecte des échantillons	94
4.1.1. Prélèvements de mères.....	94
4.1.2. Prélèvements de fœtus	94
4.1.3. Détermination de l'âge des fœtus	95
4.1.4. Prélèvements de placenta.....	95
4.2. Techniques d'analyse.....	96
4.2.1. Digestion enzymatique	96
4.2.2. Extraction d'ADN.....	96
4.2.3. PCR Genre et Multiplex	97
4.3. Mise en évidence d'une transmission transplacentaire de la sarcosporidiose bovine.....	98
4.4. Prévalence de la sarcosporidiose	99
4.4.1. Prévalence obtenue chez les mères	99

4.4.2. Prévalence obtenue chez les fœtus.....	99
4.4.3. Prévalence obtenue dans le placenta.....	101
4.5. Comparaison de la transmission transplacentaire de <i>Sarcocystis</i> avec celles de deux autres protozoaires : <i>Toxoplasma</i> et <i>Neospora</i>	102
4.6. Conclusions et perspectives de notre étude	103
CONCLUSION	105
ANNEXES	107
BIBLIOGRAPHIE.....	142

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : SCHEMA DU CYCLE EVOLUTIF DE <i>SARCOCYSTIS</i> INFECTANT LES BOVINS (CAPPELIER ET HONORE, 2011).....	30
FIGURE 2 : BRADYZOÏTES DE <i>S. CRUZI</i> AU MICROSCOPE A CONTRASTE INTERFERENTIEL, X 1000 (FAYER, 2004).....	36
FIGURE 3 : OOKYSTES CONTENANT DEUX SPOROCYSTES ADJACENTS AU MICROSCOPE A CONTRASTE INTERFERENTIEL, X 1000 (FAYER, 2004)	36
FIGURE 4 : ASPECT MACROSCOPIQUE DE MYOSITE EOSINOPHILIQUE MULTIFOCALE.....	39
FIGURE 5 : ASPECT MACROSCOPIQUE DE MYOSITE EOSINOPHILIQUE DIFFUSE	40
FIGURE 6 : FICHE DE DETERMINATION DE L'AGE DES FŒTUS.....	66
FIGURE 7 : ESTIMATION DE L'AGE DES FŒTUS (REALISEE A PARTIR DE LA FIGURE 6).....	68
FIGURE 8 : EXEMPLE DE GEL DE PCR GENRE REALISE SUR LES ECHANTILLONS DE FŒTUS ET DE SON TABLEAU D'INTERPRETATION	73
FIGURE 9 : EXEMPLE DE GEL DE PCR MULTIPLEX TOUCH DOWN REALISE SUR LES ECHANTILLONS DE MERES ET DE SON TABLEAU D'INTERPRETATION.....	74
FIGURE 10 : REPARTITION DES AGES DES FŒTUS PRELEVES	76
FIGURE 11 : REPARTITION DES RACES DES MERES PRELEVEES	77
FIGURE 12 : REPARTITION DES AGES DES MERES PRELEVEES	77
FIGURE 13 : PREVALENCE DE LA SARCOSPORIDIOSE EN FONCTION DES TYPES RACIAUX DES MERES PRELEVEES.....	80
FIGURE 14 : PREVALENCE DES DIFFERENTES ESPECES DE <i>SARCOCYSTIS</i> EN FONCTION DES TYPES RACIAUX DES MERES.....	81
FIGURE 15 : RELATION ENTRE L'AGE DES MERES ET LA TRANSMISSION DU PARASITE A LEURS FŒTUS.....	86
FIGURE 16 : BOITE DE DISPERSION DE L'AGE DES MERES POSITIVES POUR <i>SARCOCYSTIS</i> AYANT TRANSMIS LE PARASITE A LEURS FŒTUS ET CELLES POSITIVES POUR <i>SARCOCYSTIS</i> MAIS N'AYANT PAS TRANSMIS LE PARASITE A LEURS FŒTUS.....	87
FIGURE 17 : RELATION ENTRE LE STADE DE GESTATION ET LA TRANSMISSION DE <i>SARCOCYSTIS</i> AUX FŒTUS	88
FIGURE 18 : RELATION ENTRE LA TRANSMISSION TRANSPLACENTAIRE DE <i>SARCOCYSTIS</i> ET LA RACE DES MERES	89
FIGURE 19 : RELATION ENTRE LA TRANSMISSION TRANSPLACENTAIRE DE <i>SARCOCYSTIS</i> ET TYPE RACIAL DES MERES.....	90

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : CARACTERISTIQUES DES ESPECES POSSEDANT DES KYSTES A PAROI FINE (INFERIEURE A 1 MM) (DUBEY ET AL., 1989B).....	34
TABLEAU II : CARACTERISTIQUES DES ESPECES POSSEDANT DES KYSTES A PAROI EPAISSE (DUBEY ET AL., 2015B).....	35
TABLEAU III : DIFFERENTES TECHNIQUES DE TRAITEMENT DES VIANDES AVANT OBSERVATION AU MICROSCOPE OPTIQUE.....	45
TABLEAU IV : PREVALENCE DANS DIVERSES REGIONS DU MONDE DE L'INFECTION PAR SARCOCYSTIS SPP., CHEZ DES ANIMAUX DE RENTE (D'APRES BERTIN, 2013).....	53
TABLEAU V : PREVALENCE DE SARCOCYSTIS SPP. SELON L'ESPECE DE MAMMIFERE HOTE INTERMEDIAIRE EN JEU ET LE SITE MUSCULAIRE ETUDIE (D'APRES BERTIN, 2013).....	54
TABLEAU VI : PREVALENCE DE S. HOMINIS ET S. CRUZI SELON LE MUSCLE ETUDIE, CHEZ LES BOVINS (D'APRES BERTIN, 2013).....	54
TABLEAU VII : PREVALENCE PAR ESPECE DE SARCOCYSTIS SUR DES CARCASSES DE BOVINS SAISIES POUR MYOSITE EOSINOPHIQUE, DETERMINATION PAR PCR MULTIPLEX (D'APRES LEMIEUX, 2014) (ETUDE REALISEE SUR 123 BLONDES D'AQUITAINE EN PAYS DE LA LOIRE)	55
TABLEAU VIII : PREVALENCE DANS DIFFERENTES REGIONS DU MONDE DE L'INFECTION INTESTINALE PAR SARCOCYSTIS SPP. CHEZ L'HOMME.....	56
TABLEAU IX : POSITION DES AMORCES ET TAILLE DES AMPLICONS OBTENUS PAR LA PCR MULTIPLEX TOUCH DOWN.....	72
TABLEAU X : TAILLE DES AMPLICONS OBTENUS PAR LES PCR GENRE ET LES PCR MULTIPLEX TOUCH DOWN.....	73
TABLEAU XI : PREVALENCE DE LA SARCOSPORIDIOSE EN FONCTION DES ESPECES CHEZ LES MERES (N=140)	79
TABLEAU XII : COMPARAISON DES PREVALENCES THEORIQUES ET DES PREVALENCES REELLES CONCERNANT LES DIFFERENTES COMBINAISONS POSSIBLES D'ESPECES DE SARCOCYTIS.....	79
TABLEAU XIII : P-VALUES OBTENUES PAR COMPARAISON DES TYPES RACIAUX QUANT A LA PREVALENCE POUR S. CRUZI (TEST EXACT DE FISHER).....	81
TABLEAU XIV : PREVALENCE DE L'INFECTION PAR SARCOCYSTIS TOUTES ESPECES CONFONDUES CHEZ LES FETUS.....	82
TABLEAU XV : PREVALENCE DE LA SARCOSPORIDIOSE EN FONCTION DES ESPECES CHEZ LES FETUS	82
TABLEAU XVI : RESULTATS DES PCR MULTIPLEX CONCERNANT LES JUMEAUX.....	83

TABLEAU XVII : COMPARAISON DES ESPECES DE <i>SARCOCYSTIS</i> RETROUVEES CHEZ LES FŒTUS ET CHEZ LEURS MERES RESPECTIVES	84
TABLEAU XVIII : P-VALUES OBTENUES PAR COMPARAISON DES STADES DE GESTATION DEUX A DEUX QUANT AUX CAS DE TRANSMISSION TRANSPLACENTAIRE (TEST EXACT DE FISHER).....	89
TABLEAU XIX : P-VALUES OBTENUES PAR COMPARAISON DES RACES DE VACHES ENTRE ELLES AVEC LES CAS DE TRANSMISSIONS TRANSPLACENTAIRES (TEST EXACT DE FISHER).....	90
TABLEAU XXI : P-VALUES OBTENUES PAR COMPARAISON DES TYPES RACIAUX DES MERES AVEC LES CAS DE TRANSMISSIONS TRANSPLACENTAIRES	91
TABLEAU XXII : TABLEAU COMPARATIF DE LA TRANSMISSION TRANSPLACENTAIRE DE <i>SARCOCYSTIS</i> EN FONCTION DES ESPECES PRESENTES CHEZ LES MERES	91

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : PROTOCOLE DE DIGESTION ENZYMATIQUE	109
ANNEXE 2 : PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN	110
ANNEXE 3 : PROTOCOLE DE PCR GENRE <i>SARCOCYSTIS SPP.</i>.....	115
ANNEXE 4 : PROTOCOLE DE PCR MULTIPLEX « TOUCHDOWN » <i>SARCOCYSTIS SPP.</i>	112
ANNEXE 5 : RESULTATS DES ELECTROPHORESES APRES ANALYSES PAR PCR MULTIPLEX	115
ANNEXE 6 : TABLEAU RECAPITULATIF DES DONNEES CONCERNANT LES PRELEVEMENTS ET RESULTATS DES ANALYSES	135

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

CFT : Complement Fixation Test

CKP : Créatine Phosphokinase

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FAR : Fond d'Assainissement Régional

GMQ : Gain moyen quotidien

IFAT : Indirect Fluorecent Antibody Technique

IHAT : Indirect Hemagglutination Test

LDH : Lactate Déshydrogénase

Pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

INTRODUCTION

La sarcosporidiose est une maladie parasitaire cosmopolite chez les bovins, due à un protozoaire, du genre *Sarcocystis*. Ce parasite présente un cycle de développement à deux hôtes et peut infecter de nombreux vertébrés tels que les mammifères, les oiseaux ou les poissons. Les bovins sont les hôtes intermédiaires de *Sarcocystis hominis*, *Sarcocystis cruzi* et *Sarcocystis hirsuta* dont les hôtes définitifs sont les hommes, les canidés et les félidés respectivement. Récemment deux nouvelles espèces ayant les bovins comme hôtes intermédiaires ont été découvertes : *Sarcocystis rommeli* dont l'hôte définitif est encore inconnu (Dubey *et al.*, 2015b) et *Sarcocystis heydorni* dont l'hôte définitif est l'homme (Dubey *et al.*, 2015a).

Sarcocystis présente une prévalence très élevée dans le monde entier. En France, la prévalence chez les bovins est estimée entre 80 % et 100 % (Euzéby, 1998). De plus, il apparaît que les bovins se contaminent très précocement car des anticorps sont déjà présents chez des bovins de seulement 7 mois d'âge (Moré *et al.*, 2009).

L'infection par *Sarcocystis* est généralement asymptomatique. Elle se caractérise par la présence de kystes de taille variable dans les muscles, souvent sub-microscopiques (Euzéby, 1998). Le diagnostic de la sarcosporidiose n'est donc que rarement établi. Il est cependant possible de réaliser un diagnostic par histologie, par PCR ou par IFAT.

Chez certains bovins, l'infection semble se caractériser par la présence d'une myosite éosinophilique. La découverte de cette myosite se fait alors de façon fortuite à l'abattoir. Cette myopathie subclinique se caractérise macroscopiquement le plus souvent par de nombreuses petites décolorations multifocales blanches à verdâtres ou plus rarement par des plages diffuses pouvant mesurer jusqu'à 15 cm (Vangeel *et al.*, 2012 ; Cappelier *et al.*, 2015). Ces lésions sont le plus souvent responsables de saisies totales à l'abattoir (Bertin, 2013). En Pays de la Loire, en 2015, 0,076 % des bovins abattus ont présenté une myosite éosinophilique, ce qui représentait une perte de 181,41 tonnes de carcasses saisies et ainsi une perte économique importante pour la filière.

Interbev Pays de la Loire est le représentant régional d'Interbev (Association Nationale Interprofessionnelle du Bétail et de la Viande) et est le garant de la qualité des viandes bovines commercialisées en Pays de la Loire. Interbev Pays de la Loire gère le F.A.R. (Fond d'Assainissement Régional) de sa région. Ce F.A.R. assure une prise en charge partielle des pertes financières lors de certaines saisies à l'abattoir pour raison sanitaire, pour les éleveurs ayant cotisé à hauteur de 1,80 € par bovin abattu. Le montant de ces cotisations permet de financer l'intégralité des indemnités versées aux éleveurs. En 2015, 939 bovins ont été pris en charge par le F.A.R. et la moitié des remboursements concernait des bovins saisis pour myosite éosinophilique (avec 89 % de saisies totales). Les éleveurs étant dédommagés à 80 % du prix de la carcasse par le F.A.R., le remboursement des carcasses de bovins saisis pour myosite éosinophilique en 2015 s'élevait à 654 203 € et la perte pour les éleveurs s'élevait à 163 550 € soit une perte totale de 817 753 € pour la filière viande bovine.

Depuis 2005, Interbev Pays de la Loire est à l'initiative de plusieurs études afin de mieux connaître la sarcosporidiose et de comprendre les mécanismes responsables de l'apparition de lésions de myosite éosinophilique. Ainsi, quatre études menées en 2005, 2009, 2011 et 2013 sur l'implication de *Sarcocystis* dans les lésions de myosite éosinophilique et la

recherche de facteurs de risque ont permis de mettre en évidence que *Sarcocystis* était dans la majorité des cas à l'origine de ces lésions et que certains facteurs de risque tels que l'âge, le sexe et la race des bovins avaient une influence. L'utilisation de technique de PCR Multiplex et de séquençage d'ADN a également permis de montrer que *Sarcocystis hominis* était significativement plus présent que les autres espèces lors de myosite éosinophilique. En 2014, une nouvelle étude, cette fois ciblée sur la Blonde d'Aquitaine a permis de confirmer la prédisposition de cette race pour le développement des myosites. De plus, la présence de sites de localisation préférentielle du parasite a été démontrée. Enfin, cette étude a également confirmé la prédominance de *S. hominis* ainsi qu'un éventuel rôle de l'immunité dans l'apparition des lésions.

Ces cinq études ont permis d'approfondir les connaissances sur la sarcosporidiose mais surtout sur l'apparition des lésions de myosite éosinophilique, bien que beaucoup d'interrogations - notamment sur les facteurs de risque - persistent. Or les lésions de myosite éosinophilique semblent être étroitement liées à l'infection par *Sarcocystis*. Le traitement et la prophylaxie de la sarcosporidiose étant limités, un contrôle des facteurs de risque est donc nécessaire pour contrôler la maladie et ainsi tenter de diminuer le nombre de saisies pour myosite éosinophilique dans les abattoirs, car le nombre de cas, bien que stable depuis plusieurs années, demeure élevé.

C'est donc dans cette optique de déterminer les facteurs de risque d'infection par *Sarcocystis* que notre étude a été menée en partenariat avec Interbev Pays de la Loire. L'objectif principal est de comprendre pourquoi la prévalence de la sarcosporidiose est aussi élevée et l'infection si précoce. En particulier, nous avons recherché s'il pouvait exister une transmission transplacentaire expliquant cette forte prévalence observée chez les bovins. Nous avons également cherché à connaître le rôle du placenta dans la transmission du parasite. Pour étudier la transmission transplacentaire de la sarcosporidiose, nous avons réalisé des détections et identifications moléculaires des parasites sur des mères, leurs fœtus et leurs placentas, puis nous avons recherché les facteurs de risque pouvant être liés à la transmission.

PREMIERE PARTIE :
ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Caractères morphologiques et biologiques de *Sarcocystis* spp

1.1. Historique

Sarcocystis fut découvert pour la première fois en Suisse, par Miescher en 1843, qui décrit des kystes filiformes sur les muscles striés squelettiques d'une souris domestique. Vingt ans plus tard, une structure similaire fut décrite sur un muscle de porc par Kühn qu'il nomma *Synchytrium miescherianum* (Dubey, 1989 ; Fayer, 2004). C'est en 1882 que Lankester donna le nom de *Sarcocystis* (Sarco=muscle en grec) pour désigner ces parasites intramusculaires. En 1967, suite à l'examen des bradyzoïtes par microscopie électronique à transmission, l'hésitation sur la nature exacte de *Sarcocystis* fut levée : il s'agissait d'un protozoaire et non pas d'un champignon (Desportes, 2005). De plus, la mise en évidence d'un complexe apical semblable à celui de *Toxoplasma* et *Eimeria* permit de classer *Sarcocystis* parmi les Apicomplexa. Enfin, ce n'est qu'à partir de 1972 que le cycle de ce parasite fut connu. Heydorn *et al.* furent les premiers à mettre en évidence trois espèces pour lesquelles les bovins étaient hôtes intermédiaires : *S. cruzi*, *S. hirsuta*, *S. hominis* ayant respectivement les canidés, les félidés et les primates comme hôtes définitifs (Heydorn *et al.*, 1972).

1.2. Taxonomie

La position taxonomique de *Sarcocystis* est la suivante :

Phylum : Apicomplexa

Classe : Protozoaires

Sous classe : Coccidies

Famille : Isosporidés

Sous famille : Sarcocystidés

Genre : *Sarcocystis*

Le genre *Sarcocystis* présente plus de 100 espèces. Il existe différents hôtes intermédiaires et hôtes définitifs pour chaque espèce de *Sarcocystis*.

Le parasite présente un cycle dixène de type « prédateur-proie ». Il a donc besoin de deux hôtes pour réaliser son cycle de développement : un hôte intermédiaire, souvent une proie (un herbivore ou un omnivore) chez lequel le cycle asexué se déroule et un hôte définitif, généralement un prédateur (mammifère, oiseaux, marsupiaux, animaux poïkilothermes) où se produit le cycle sexué (Dubey et Lindsay, 2006).

Les bovins peuvent être les hôtes intermédiaires de plusieurs espèces de *Sarcocystis* : *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis hirsuta*, *Sarcocystis hominis*, dont les hôtes définitifs sont respectivement les canidés, les félidés et les primates.

Récemment deux nouvelles espèces de *Sarcocystis* ayant les bovins comme hôtes intermédiaires ont été découvertes : *Sarcocystis rommeli* dont l'hôte définitif est encore inconnu (Dubey *et al.*, 2015b) et *Sarcocystis heydorni* dont l'hôte définitif est l'homme (Dubey *et al.*, 2015a).

Les espèces de *Sarcocystis* présentent généralement une spécificité plus étroite pour leur hôte intermédiaire que pour leur hôte définitif. Par exemple, les hôtes intermédiaires de *S. cruzi* ne peuvent être que les vaches et les bisons alors que les hôtes définitifs peuvent être les

chiens, les loups, les coyottes, les rats laveurs, les chacals et les renards (Dubey et Lindsay, 2006).

1.3. Etapes du cycle parasitaire

Le cycle de *Sarcocystis* est un cycle comprenant deux hôtes : un hôte intermédiaire chez lequel a lieu la multiplication asexuée et qui développera une sarcosporidiose musculaire et un hôte définitif où s'effectue la multiplication sexuée et qui développera une sarcosporidiose intestinale (figure 1) (Euzéby, 1997).

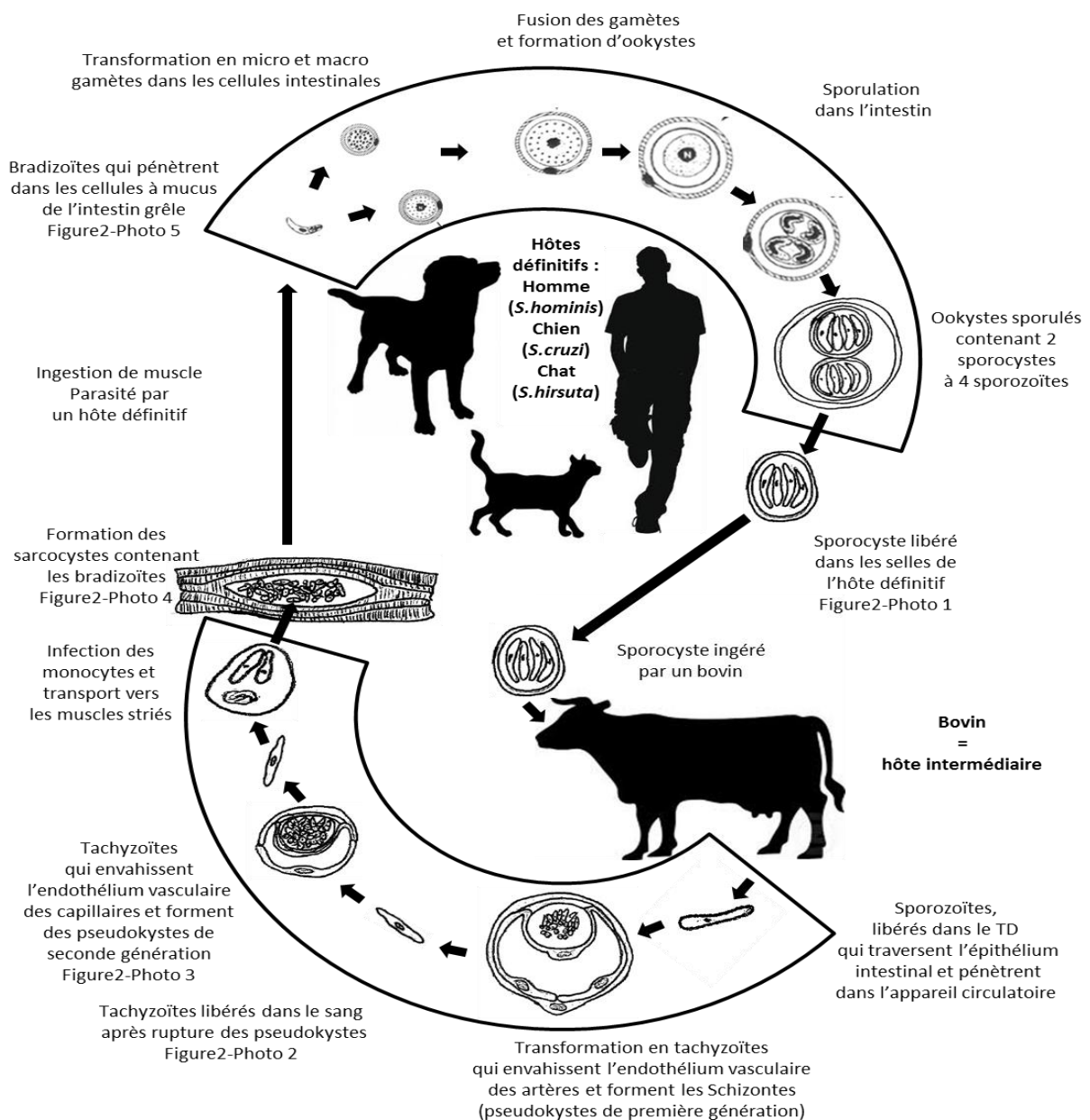


Figure 1 :
Schéma du cycle évolutif de *Sarcocystis* infectant les bovins (Cappelier et Honoré, 2011)

1.3.1. Chez l'hôte intermédiaire

Les bovins, en tant qu'hôtes intermédiaires, s'infectent en ingérant des ookystes sporulés ou des sporocystes (forme de résistance du parasite dans le milieu extérieur) présents sur les aliments ou dans des eaux contaminés par les matières fécales de l'hôte définitif. Une fois dans l'intestin grêle, la rupture de la paroi des sporocystes permet la libération de 4 sporozoïtes mobiles qui migrent dans la paroi de l'intestin grêle. Ils entrent ensuite dans les cellules endothéliales des petites artérioles ou des capillaires situés à proximité en 4 à 7 jours (Fayer, 2004 ; Dubey *et al.*, 1989b). A l'intérieur de ces cellules, se produit la première schizogonie au cours de laquelle les sporozoïtes évoluent en mérozoïtes ou tachyzoïtes, première génération de cellules issues de la reproduction asexuée, 7 à 15 jours après ingestion.

Libres dans le cytoplasme des cellules endothéliales, les mérozoïtes évitent la destruction et se multiplient activement transformant la cellule endothéliale parasitée en pseudokyste ou schizonte. Les schizontes, ayant une paroi fine et fragile, se rompent et libèrent les mérozoïtes qui pénètrent dans les cellules endothéliales saines des capillaires de l'ensemble du système vasculaire. Il se produit alors la seconde schizogonie 19 à 46 jours après inoculation. Les mérozoïtes de seconde génération ainsi formés se retrouvent alors soit dans le flux sanguin, soit dans les cellules mononuclées. Quelques jours à une semaine plus tard, une troisième génération apparaît : ce sont des schizontes immatures ou matures contenant des mérozoïtes se répartissant dans l'ensemble de l'organisme par le flux sanguin mais ayant une localisation privilégiée dans les glomérules rénaux. L'ensemble du flux vasculaire est ainsi envahi permettant la pénétration des mérozoïtes dans les cellules musculaires et parfois dans le système nerveux central (plus rare). Au sein des cellules musculaires, les mérozoïtes se rassemblent et forment tout d'abord une seule cellule ronde, un métrocyte (ou cellule mère). Une série de divisions donne naissance à de nombreux métrocytes qui initient la formation du sarcocyste (kyste tissulaire) en même temps qu'une paroi se développe isolant ainsi le sarcocyste du reste du muscle. Les sarcocystes apparaissent 45 à 65 jours après ingestion des sporocystes.

Les métrocytes donnent alors naissance par multiplication intense (endodyogénie) à de très nombreux bradyzoïtes, formes infectieuses des métrocytes. Les sarcocystes sont dits mûres et sont donc infectieux lorsqu'ils contiennent les bradyzoïtes, généralement 75 jours après infection (il existe cependant des variations considérables entre les différentes espèces de *Sarcocystis*) (Fayer *et al.*, 2015).

En fin de maturation, les sarcocystes contiennent alors quelques centaines à quelques milliers de bradyzoïtes qui ne se divisent plus et correspondent au stade terminal de la reproduction asexuée chez l'hôte intermédiaire. Ces sarcocystes peuvent rester infectieux pendant des mois ou des années et sont retrouvés dans tous les muscles striés du corps y compris le cœur, la langue et le diaphragme mais aussi dans une moindre mesure dans les muscles lisses et le système nerveux (Desportes-Livage et Datry, 2005).

1.3.2. Chez l'hôte définitif

L'hôte définitif s'infecte en ingérant de la viande ou du tissu nerveux cru ou insuffisamment cuit contenant des sarcocystes mûres. La paroi du kyste est ensuite mécaniquement rompue ou digérée dans l'estomac et l'intestin (en particulier par la trypsine et par la bile) libérant ainsi les bradyzoïtes qu'il contenait. Ces bradyzoïtes devenus mobiles pénètrent dans les cellules à mucus de l'intestin grêle et se transforment en microgamontes (gamontes mâles) ou en macrogamontes (gamontes femelles). Les microgamontes sont le siège d'une division nucléaire aboutissant à la formation de microgamètes qui migrent à la périphérie du macrogamonte. Après fécondation du microgamète et du macrogamonte, une paroi se développe autour du zygote. Il se forme alors un ookyste. Le processus complet de gamétogonie et de fécondation prend environ 24 heures (Dubey *et al.*, 1989).

Le développement séquentiel à l'intérieur de l'ookyste au sein de la *lamina propria* permet la formation de deux sporocystes. Les ookystes contenant les deux sporocystes passent alors la barrière intestinale et se retrouvent dans les fèces.

La paroi des ookystes étant mince, les formes intactes sont habituellement observées seulement dans les premiers jours de l'excrétion (10 à 15 jours après infection) puis on retrouve fréquemment des sporocystes seuls. Les sporocystes de nombreuses espèces mesurent 10 à 15 µm et contiennent 4 sporozoïtes et un petit corps résiduel granuleux (Fayer, 2004). Ces ookystes sont infectieux pour l'hôte intermédiaire.

1.4. Différentes modalités de transmission du parasite

La sarcosporidiose se transmet à l'hôte intermédiaire par ingestion d'aliments ou d'eau souillés par des matières fécales de l'hôte définitif contenant des sporocystes de *Sarcocystis*. La transmission de *Sarcocystis* à l'hôte définitif se fait par ingestion de viande contaminée, consommée crue ou insuffisamment cuite. Ces modes de contamination correspondent à une transmission horizontale du parasite.

Peu d'études ont été menées sur une possible transmission verticale de *Sarcocystis*. En 1976, Munday et Black découvrent par microscopie des protozoaires ressemblant à des schizontes de *Sarcocystis* dans le cerveau de deux fœtus de bovins (protozoaires mesurant 15 µm sur 26 µm) et sur quatre placentas (protozoaires mesurant 17 µm sur 28 µm). Des doutes persistent sur l'identification exacte du parasite mais la localisation du protozoaire dans les cellules endothéliales vasculaires, la présence d'un zoïte en forme de rosette à l'intérieur du schizonte associés à une recherche infructueuse de *Toxoplasma gondii* indiquent fortement qu'il s'agit de *Sarcocystis*. Cependant, au vu de la forte prévalence de *Sarcocystis*, les auteurs s'étonnent qu'il n'y ait pas plus de cas de transmission verticale.

Un cas similaire a été mis en évidence par microscopie avec une autre espèce de *Sarcocystis* dont le bovin n'est pas hôte intermédiaire : un agneau mort-né présentant des schizontes mûres et immatures ressemblant à ceux de *Sarcocystis tenella* dans l'endothélium vasculaire de plusieurs organes dont le cervelet (Agerholm et Dubey, 2014).

En 1996, Savini *et al.* ont mis en évidence par microscopie une structure ressemblant à un méronite de *Sarcocystis cruzi* dans un macrophage présent dans le liquide cébrospinal d'un veau prématuré après avoir infecté expérimentalement la mère gestante en inoculant par

voie intra-veineuse 4×10^6 mérozoïtes obtenus *in vitro*. Cependant, l'autre veau issu d'une autre mère ayant subi le même protocole n'a pas présenté de parasite, ni lors d'administration de 10^6 parasites pas voie intra-ruminale chez des mères gestantes de 270 jours.

En 2009, Moré *et al.* ont cherché à mettre en évidence la transmission verticale du parasite en mesurant la concentration en anticorps chez des veaux nouveau-nés avant la prise colostrale, nés de mères séropositives. Cette étude fut menée à Buenos Aires sur un troupeau de vaches laitières toutes séropositives pour *S. cruzi* et 173 veaux issus de ces mères. La recherche par immunofluorescence d'anticorps dirigés contre *S. cruzi*, sur les veaux avant la première prise colostrale, a permis de mettre en évidence une faible transmission verticale de *Sarcocystis* (3 veaux sur 173 soit 1,7% présentaient des titres en anticorps compris entre 25 et 50). La fréquence de transmission verticale de *S. cruzi* semble donc extrêmement faible si l'on compare à la séroprévalence des mères qui était de 100 %. De plus, sur 25 veaux séronégatifs à la naissance une recherche d'anticorps a été réalisée à 7 mois d'âge. Tous les veaux testés étaient alors séropositifs. La demi-vie des anticorps colostraux n'étant que de 20 jours, cette séropositivité résultait d'une infection précoce des veaux (avant 7 mois) par le parasite. Les auteurs rapportent de plus que les titres en anticorps des mères n'ont pas augmenté entre la période de gestation et le moment du vêlage. Or, ils comparent ces valeurs avec celles de *Neospora caninum* qui présente une fréquence de transmission verticale de 37,1 % et dont les mères présentent, pour la plupart, une augmentation de leurs titres en anticorps au moment du vêlage. Cette faible réactivation de l'infection lors du parasitisme par *S. cruzi* pourrait expliquer le faible taux de transmission verticale.

Une étude similaire à celle de Moré *et al.*, utilisant la sérologie avant la première prise colostrale, a été menée sur 8 poulains et a montré qu'un seul poulain présentait des anticorps anti-*Sarcocystis neurona* à la naissance (Pusterla *et al.*, 2014). Cette étude suppose donc également l'existence d'une faible transmission transplacentaire chez la jument vis-à-vis d'une autre espèce de *Sarcocystis* ne parasitant pas les bovins.

Selon Euzéby (Euzéby, 1998), au cours de la phase d'acuité, les tachyzoïtes peuvent passer le placenta des vaches gestantes et ainsi infecter les fœtus. Cette possibilité n'apparaît cependant que lors de la gestation suivant l'infection car cette infection sera à l'origine d'un état d'immunité provoquant la mort des tachyzoïtes circulant par la suite. D'autres hypothèses seraient une infestation massive ou une réactivation de l'infection comme évoqué dans l'étude de Moré *et al* en 2009.

Ainsi, selon les travaux publiés la transmission verticale de *Sarcocystis* semble être un événement rare. Cependant les études n'ont été menées que sur une faible quantité d'animaux, par des méthodes microscopiques ou par recherche d'anticorps.

1.5. Morphologie

1.5.1. Chez l'hôte intermédiaire

Les kystes musculaires sarcosporidiens sont de taille variable, souvent sub-microscopiques (de 0,5-3 mm sur 0,3 mm suivant les espèces de *Sarcocystis*). Ils apparaissent sous forme allongée dans le sens des fibres musculaires. Ils ne peuvent être visibles à l'œil nu que lorsqu'ils sont nombreux et coalescents : ils apparaissent alors comme de petites tâches

ovoïdes, grisâtres à blanchâtres qui, lors de calcification prennent une couleur jaunâtre. Parfois, ils prennent une couleur verdâtre lors d'infiltrat éosinophilique (Euzéby, 1998).

Au microscope optique, les kystes sont de taille variable selon l'espèce : les sarcocystes de *S. cruzi* et de *S. hominis* sont de petite taille, inférieures à 0,5 mm et à 0,95 mm respectivement. En revanche, les sarcocystes de *S. hirsuta* sont particulièrement gros et peuvent mesurer jusqu'à 8 mm (Tenter, 1995). *S. heydorni* quant à lui mesure 1,06 mm sur 0,08 mm (Dubey *et al.*, 2015).

En coupe histologique, les sarcocystes sont cloisonnés et divisés en alvéoles renfermant les bradyzoïtes mesurant quelques micromètres de long. L'examen histologique et l'examen au microscope optique permettent la différenciation entre sarcocystes à paroi épaisse (supérieure à 3 µm) et sarcocystes à paroi fine (inférieure à 1 µm) mais pas la détermination exacte des espèces (Moré *et al.*, 2011).

En microscopie électronique, les sarcocystes apparaissent enveloppés d'une double paroi. La paroi primaire porte à sa surface des éléments piliformes, les cytophanères ou villosités, plus ou moins développés, dont la forme et la taille varient selon les espèces. La morphologie des cytophanères et l'épaisseur de la paroi sont des critères de diagnose des différentes espèces. *S. hominis*, *S. rommeli* et *S. hirsuta* présentent des parois épaisses, de 5 µm, 6 µm et 7 µm d'épaisseur respectivement alors que *S. cruzi* et *S. heydorni* présentent une paroi mince (inférieure à 1 µm).

Les caractéristiques des différents kystes sont présentées dans les tableaux I et II.

Tableau I : Caractéristiques des espèces possédant des kystes à paroi fine (inférieure à 1 µm) (Dubey *et al.*, 1989b)

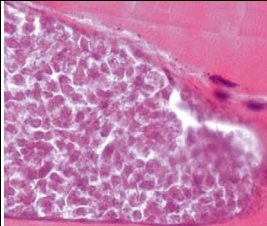
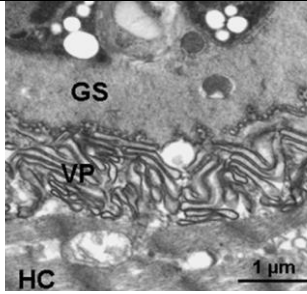
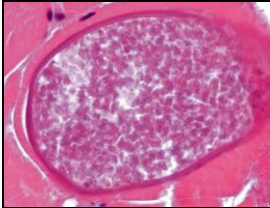
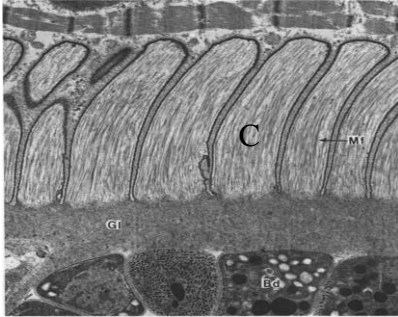
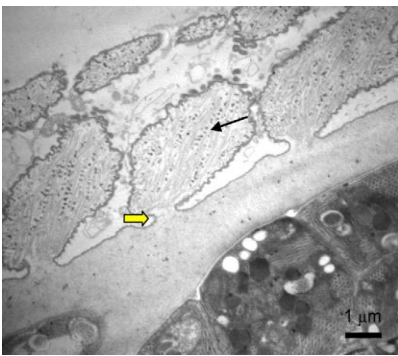
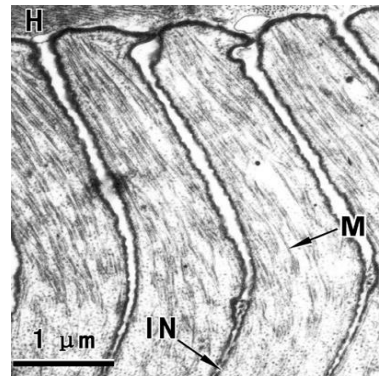
	<p>Tissu musculaire de bovin contenant un kyste de <i>S. cruzi</i> à paroi fine. Observation au microscope optique, coloration hémalaun-éosine. X 600 (Ghisleni <i>et al.</i>, 2006)</p>
Espèce	Aspect des kystes en microscopie électronique à transmission
<p><i>S. cruzi</i></p>	 <p>Paroi d'un kyste de <i>S. cruzi</i> au microscope électronique à transmission (Jehle <i>et al.</i>, 2009) : présence de longues et nombreuses invaginations sur la paroi avec des cytophanères longues et étroites (en forme de ruban ou de cheveux) de 3,5 µm de long sur 0,3 µm de large, sans microtubules. (VP : cytophanère, GS : zone dense aux électrons, HC : cellule hôte)</p>
<p><i>S. heydorni</i></p>	<p>Présence de courtes cytophanères coniques de 0,5 µm de long sur 0,5 µm de large.</p>

Tableau II : Caractéristiques des espèces possédant des kystes à paroi épaisse (Dubey *et al.*, 2015b)

Espèce	Épaisseur de la paroi	Aspect des kystes en microscopie électronique à transmission
	<p>Tissu musculaire de bovin contenant un kyste à paroi épaisse. Observation au microscope optique, coloration hémalun-éosine. X 600 (Ghisleni <i>et al.</i>, 2006)</p>	
<i>S. hominis</i>	5 µm	 <p>Paroi d'un kyste de <i>S. hominis</i> au microscope électronique à transmission (Dubey <i>et al.</i>, 1989a) : paroi radiée par de nombreux cytophanères (C) minces et arqués de 5-7 µm de long sur 1,8 µm de large, composés de microfilaments (Mt) en palissade.</p>
<i>S. hirsuta</i>	7 µm	 <p>Paroi d'un kyste de <i>S. hirsuta</i> au microscope électronique à transmission (Moré <i>et al.</i>, 2011) : paroi striée, radiée ou hirsute avec des cytophanères de 7 µm de long sur 1,5 µm de large contenant de nombreux microtubules (flèche noire). Les cytophanères possèdent une base étroite (flèche jaune) et sont en forme de langue.</p>
<i>S. rommeli</i>	6 µm	 <p>Paroi d'un kyste de <i>S. rommeli</i> au microscope électronique à transmission (Chen <i>et al.</i>, 2011) : paroi avec cytophanères ondulés, de 4 à 5 µm de long. (M : microtubules (au sein des cytophanères), IN : invagination, H : cytoplasme de la cellule hôte).</p>

Les bradyzoïtes sont les formes de contamination. Ils sont en forme de banane et mesurent de 7 à 15 µm sur 2,5 à 3,5 µm (Fayer, 2004) (figure 2).



Figure 2 :
Bradyzoïtes de *S. cruzi* au microscope à contraste interférentiel, x 1000 (Fayer, 2004)

1.5.2. Chez l'hôte définitif

Les ookystes, résultats de la reproduction sexuée chez l'hôte définitif, sont des œufs encapsulés contenant chacun deux sporocystes de 8 à 10 μm sur 4 à 5 μm . En microscopie électronique, la paroi des ookystes apparaît dense et est très fine (inférieure à 1 μm) (figure 3). La couche extérieure est granuleuse et la couche intérieure contient une à quatre membranes (Desportes-Livage et Datry, 2005 ; Fayer, 2004).

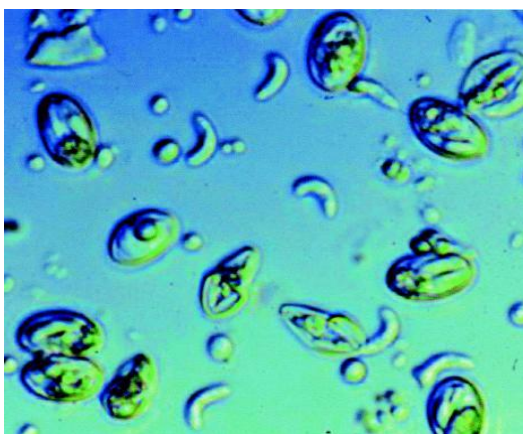


Figure 3 :
Ookystes contenant deux sporocystes adjacents au microscope à contraste interférentiel, x 1000 (Fayer, 2004)

Les sporocystes contenus dans les ookystes sont des structures allongées mesurant 10 à 15 μm selon les espèces et contenant quatre sporozoïtes ainsi qu'un petit corps résiduel granuleux (Fayer, 2004). Ils possèdent une paroi résistante et ont ainsi une grande longévité dans le milieu extérieur : de l'ordre d'un an en milieu humide, réduite à 2 ou 3 mois en milieu sec. Ils résistent à des températures pouvant aller jusqu'à -20 °C pendant 48 heures. Ils possèdent également une forte résistance aux antiseptiques : seul l'ammoniaque à 10 % a un effet létal sur eux (Euzéby, 1997). Chaque sporocyste contient une paroi composée d'une fine couche externe et d'une épaisse couche interne constituée de quatre plaques jointes, similaire à ce que l'on retrouve chez les Coccidies (Dubey *et al.*, 1989).

2. Pathogénie

La pathogénie de *Sarcocystis* se manifeste chez l'hôte définitif sous la forme de *coccidiose sarcocystique* alors que chez l'hôte intermédiaire il s'agit de la forme *Sarcosporidiose*. Le pouvoir pathogène de *Sarcocystis* est principalement dû aux tachyzoïtes de deuxième génération qui exercent une action phlogogène et nécrosante ainsi qu'une action toxinique et antigénique (Euzéby, 1998).

L'action phlogogène est la conséquence de la fabrication de facteurs chimiotactiques qui ont un effet attractif sur les leucocytes.

La nécrose est la conséquence de la destruction des cellules endothéliales par les pseudokystes et les tachyzoïtes. Ce phénomène explique les lésions hémorragiques observées sur les malades.

L'action toxique est notamment due à une protéine thermolabile, la sarcocystine. La synthèse de cette toxine débute dans les pseudokystes puis elle s'accumule dans les kystes. Cette phase toxinique apparaît dans les heures qui suivent l'ingestion de la viande contaminée (de l'ordre de 3 à 4 heures post-ingestion dans le cas de *S. cruzi*) (Euzéby, 1997).

L'action antigénique peut être due :

- à des antigènes de surfaces communs aux tachyzoïtes, sporozoïtes et bradyzoïtes (de poids moléculaire 20-74 kDa),
- à des antigènes cytoplasmiques isolés des tachyzoïtes (de poids moléculaire 50-70 kDa),
- à des antigènes des micromères (de poids moléculaire 16-17 kDa).

Ces antigènes provoquent la sécrétion de cytokines telles que les facteurs nécrosants des tumeurs α (TNF α) ou des interleukines 1 (IL 1), peptides phlogogènes, par les macrophages activés (Euzéby, 1998).

3. Signes cliniques

3.1. Chez l'hôte intermédiaire : le bovin

Les hôtes intermédiaires se contaminent en ingérant de l'eau ou des aliments contaminés par les matières fécales des hôtes définitifs contenant des ookystes ou des sporocystes de *Sarcocystis*. La sarcosporidiose peut évoluer sous deux formes : la forme aiguë ou la forme chronique.

3.1.1. Sarcosporidiose aiguë

L'infection est généralement inapparente et toutes les espèces de *Sarcocystis* ne sont pas pathogènes pour l'hôte intermédiaire. Se sont généralement les espèces transmises par les canidés qui sont les plus pathogènes. La sévérité des signes cliniques va donc dépendre de l'espèce infectant l'hôte mais également de la dose de parasites ingérée, du statut immunitaire

de l'hôte et de son stade physiologique (gestant ou non). Le stress peut également jouer un rôle important sur la sévérité de la maladie et sur la probabilité d'infection (Dubey et Lindsay, 2006).

La forme aiguë se manifeste 20 à 50 jours après l'infection, ce qui correspond à la présence des mérozoïtes de deuxième génération (ou deuxième génération de schizontes suite à la seconde schizogonie). Expérimentalement, la forme aiguë n'apparaît que pour une contamination par *S. cruzi* de l'ordre de 2×10^5 sporocystes ou plus. Les animaux présentent alors une hyperthermie pouvant aller jusqu'à 41 °C. Cet état fébrile pourrait être la conséquence de l'action de l'IL-1 sur les centres régulateurs. Deux phases d'hyperthermie sont observées : la première entre 7 et 15 jours après infection et la seconde autour du 30^{ème} jour (lors de la rupture des pseudokystes) (Euzéby, 1998). Les autres signes, observés à partir du 24^{ème} jour post-ingestion, sont une anorexie, de la diarrhée, des tremblements, une faiblesse et une prostration auxquels peuvent s'ajouter une glossite ou une rhinite (Dubey *et al.* 1989). La fièvre associée à l'anorexie entraîne un amaigrissement de l'animal. Cette dénutrition provoque une chute de poils surtout visible à l'extrémité de la queue. Dans des cas grave, l'animal meurt. Expérimentalement, la mort survient lors d'administration de 2×10^6 sporocystes, trente jours après administration des parasites, confirmant la pathogénicité des tachyzoïtes (Euzéby, 1998).

Chez les vaches gestantes, une mise-bas prématurée, un avortement ou la naissance d'un veau mort-né est possible. Les mécanismes en cause restent à l'heure actuelle inconnus, les infections expérimentales ne permettant pas de reproduire ces phénomènes (Euzéby, 1998).

Lors d'avortement, de multiples foyers de nécrose sont observés sur le placenta, principalement au niveau de la *lamina propria*. Le protozoaire y est parfois retrouvé par observation microscopique au niveau des petites artères (Dubey et Bergeron, 1982).

La forme aiguë est principalement caractérisée par une anémie normochrome et normocytaire sans réticulocytes, s'accompagnant parfois d'une bilirubinémie et d'une hémoglobinurie (Euzéby, 1998). Des anomalies du système de coagulation peuvent également être observées.

Outre la dénutrition pouvant aller jusqu'à la cachexie et l'anémie, la sarcosporidiose aiguë présente des lésions hémorragiques se caractérisant par des pétéchies voire des suffusions ainsi que des lésions de nécrose à la surface de nombreux organes (viscères, cœur, muscles squelettiques). La graisse corporelle devient peu abondante et gélatineuse.

Tous ces signes cliniques sont non spécifiques, c'est pourquoi la sarcosporidiose n'est que rarement suspectée.

3.1.2. Sarcosporidiose chronique

La forme chronique est la forme la plus fréquemment rencontrée (Dubey *et al.*, 1989). Elle apparaît environ quatre mois après ingestion des parasites, coïncidant avec le moment où les parasites colonisent les muscles striés et forment des kystes. Toutes les masses musculaires peuvent être touchées mais il existe des sites de prédilection tels que le myocarde, l'œsophage, la langue et le diaphragme. Les symptômes sont alors moins marqués que lors de

sarcosporidiose aiguë et s'apparentent à un syndrome rhumatoïde caractérisé par des douleurs musculaires (en lien avec les muscles colonisés). La croissance des animaux ainsi que les performances zoonotiques sont affectées, se caractérisant par un faible GMQ, un faible poids à l'abattage et une diminution de la production laitière. Des signes nerveux peuvent également être observés, se traduisant par un décubitus prolongé, de l'opisthotonos, un nystagmus et une marche en cercle pouvant aller jusqu'à la mort (Euzéby, 1997).

Lors de sarcosporidiose chronique, la lésion la plus notable est une atrophie séreuse des tissus adipeux, principalement dans le cœur et dans la graisse péri-rénale, associée à des tâches blanchâtres liées à la minéralisation (Dubey *et al.*, 1989).

3.1.3. Myosite éosinophilique

La myosite éosinophilique, fréquemment confondue avec la sarcosporidiose, correspond à une inflammation spécifique du muscle strié, principalement due à l'accumulation d'éosinophiles. Cette myopathie sub-clinique se caractérise macroscopiquement par de nombreuses petites décolorations multifocales, blanches-verdâtres, fusiformes à rondes, mesurant 0,5-5 mm x 0,5-2 mm (figure 4).



Figure 4 :
Aspect macroscopique de myosite éosinophilique multifocale
(Photographie de Cappelier, 2011)

Il existe également des formes diffuses se matérialisant par de grandes plages verdâtres, indurées, pouvant mesurer jusqu'à 15 cm de longueur (Vangeel *et al.*, 2012 ; Cappelier *et al.*, 2015) comme l'illustre la figure 5.



Figure 5 :
Aspect macroscopique de myosite éosinophilique diffuse
(Photographie de Cappelier, 2011)

Les animaux atteints ne présentent cependant aucun signe clinique et la découverte se fait de façon fortuite lors de l'inspection des carcasses à l'abattoir. Cette découverte est, dans la plupart des cas, suivie d'une saisie totale de la carcasse, engendrant ainsi de grosses pertes économiques.

Histologiquement, la lésion est composée en son centre de granulocytes éosinophiliques dégénérés associés à des fibres musculaires nécrosées, des cellules géantes phagocytaires ainsi que des cellules plasmiques et des érythrocytes (Alvin *et al.*, 1992).

De nombreuses études incriminent *Sarcocystis* dans la formation des myosites éosinophiliques car des sarcocystes ou des fragments de sarcocystes étaient présents dans les lésions. Une étude menée sur deux veaux ayant reçu des injections répétées dans le muscle d'antigènes de *Sarcocystis* adjuvés a montré que les lésions formées étaient morphologiquement similaires (histologie et immunohistochimie) à celles d'une myosite éosinophilique. Cette étude a conforté les auteurs dans l'idée que *Sarcocystis* était impliqué dans ces lésions (Vangeel *et al.*, 2012). Cependant, l'implication de *Sarcocystis* dans les lésions de myosite éosinophilique paraît étonnante compte tenu de la faible prévalence de la myosite éosinophilique (prévalence allant de 0,013 % à 0,002 % suivant les pays) comparée à la prévalence élevée (proche de 100 %) de la sarcosporidiose chez les bovins. De plus, de nombreuses études sur des infections expérimentales par *Sarcocystis* n'ont pas permis de recréer des lésions de myosite éosinophilique. Des recherches ont alors été menées pour savoir si une des espèces de *Sarcocystis* était plus fréquemment rencontrée dans les lésions de myosite éosinophilique, expliquant ainsi la différence entre le nombre de cas observés et la prévalence de la sarcosporidiose. Ainsi, deux études menées à Oniris en 2013 et 2014 (Bertin,

2013 et Lemieux, 2014) ont permis de mettre en évidence que *S. hominis* était plus présent dans les carcasses de bovins saisies pour myosite éosinophilique (prévalence de 86,4 % contre 55,6 % pour *S. cruzi* et 0 % pour *S. hirsuta*). Ce constat a été confirmé par une étude menée par Chiesa en 2014 sur les carcasses de bovins de race Piémontaise saisies pour myosite éosinophilique (Chiesa *et al.*, 2014). Cependant, ces prévalences ne permettaient pas statistiquement de mettre en évidence une différence avec les prévalences observées chez les bovins témoins (non saisis pour myosite éosinophilique). Il ne semble pas y avoir d'associations privilégiées de *S. hominis* ou *S. cruzi* avec le déclenchement de myosites éosinophiliques. De plus, l'étude des infections mixtes par *S. cruzi* et *S. hirsuta* ne semblait pas avoir d'influence sur l'apparition des myosites éosinophiliques (Lemieux, 2014).

Les mécanismes en cause dans le déclenchement des lésions de myosite éosinophilique restent à l'heure actuelle inconnus. Gajadhar en 1987, a mis en évidence une espèce de *Sarcocystis* au sein des lésions de myosite éosinophilique non décrite auparavant (ne correspondant pas à *S. cruzi*, *S. hominis* ou *S. hirsuta*). Il émet l'hypothèse que la réaction inflammatoire observée lors des myosites pourrait être due à une réaction de l'hôte suite au relargage de substances par le sarcocyste au cours de son fonctionnement métabolique. Le fait que cette espèce de *Sarcocystis* soit non habituelle pour les bovins engendrerait une rupture de l'équilibre hôte-parasite entraînant une sévère réponse de l'hôte face à l'infection. Certains auteurs avancent que les bovins présentant des lésions de myosite éosinophilique seraient génétiquement prédisposés à produire des IgE dirigées contre les bradyzoïtes et ces lésions résulteraient alors d'une réponse anormale provoquant la dégénérescence des sarcocystes (en lien avec des réactions d'hypersensibilité de type I) (Wouda *et al.*, 2006). Bertin a d'ailleurs montré que les races Blonde d'Aquitaine et Parthenaise présentaient un risque de saisis pour myosite éosinophilique respectivement 12 fois et 6 fois plus important, comparé aux autres races (Bertin *et al.*, 2013), ce qui semble confirmer l'hypothèse d'une prédisposition génétique.

Bien que les mécanismes d'apparition des myosites éosinophiliques restent encore inconnus, *Sarcocystis* semble être impliqué dans les mécanismes réactionnels.

3.2. Chez les hôtes définitifs

Les hôtes définitifs se contaminent en ingérant des kystes développés chez les hôtes intermédiaires par carnivorerisme ou prédation. *Sarcocystis* ne provoque généralement pas de symptômes chez les hôtes définitifs.

3.2.1. Chez les carnivores

Chez les carnivores, une infection par un grand nombre de parasites entraîne une forte excrétion dans les matières fécales mais les animaux ne présentent pas de signe de maladie. (Euzéby, 1998). Lors d'études expérimentales, les chiens infectés présentaient des épisodes de vomissement et d'anorexie un à deux jours après ingestion de la viande parasitée mais les auteurs ont attribué ces symptômes au changement d'alimentation (Dubey *et al.*, 1989).

3.2.2. Chez l'homme

La *coccidiose sarcocystique* chez l'homme est relativement fréquente à travers le monde. L'infestation touche aussi bien les enfants âgés de quelques mois que les personnes âgées de 80 ans et reste le plus souvent bénigne. L'homme est sensible à trois espèces de *Sarcocystis* : *S. hominis* et *S. heydorni* dont les hôtes intermédiaires sont les bovins et *S. suis hominis*, ayant pour hôtes intermédiaires sont les porcs.

En tant qu'hôte définitif, l'homme peut présenter des nausées, des vomissements, des entérites sévères, aiguës ou chroniques, mais la plupart des infections apparaissent peu sévères voire asymptomatiques. La durée de l'infection est difficile à connaître car dans la plupart des cas le moment de l'infection, le type de viande responsable ainsi que la quantité de parasites ingérée est inconnue. Des études menées en Allemagne sur des volontaires ingérant des viandes de bovins naturellement ou expérimentalement infectées par *Sarcocystis hominis* ont présenté deux syndromes :

- Un *syndrome d'allure toxinique* : signes cliniques de faible intensité 3 à 6 heures après ingestion caractérisés par des douleurs abdominales, des nausées et de la diarrhée pendant 24 à 36 heures. Ce syndrome est apyrétique et est dû à la sarcocystine.
- Un *syndrome coccidiose* : les volontaires ont à nouveau présenté une diarrhée 14 à 18 jours après ingestion de la viande contaminée, diarrhée se prolongeant pendant 10 jours, coïncidant avec l'excrétion de la plupart des sporocystes (Fayer *et al.*, 2015 ; Euzéby, 1997).

Peu d'études ont été menées sur les lésions présentées par les hôtes définitifs car le diagnostic n'est que rarement établi. Des lésions de nécrose focale associées à des œdèmes sur la paroi de l'intestin grêle et les nœuds lymphatiques sont observées 15 jours post-infection.

4. Immunité

4.1. Chez l'hôte intermédiaire

Le développement de *Sarcocystis* chez l'hôte intermédiaire peut être divisé en trois phases :

- Suite à l'exkystement, les sporozoïtes envahissent les tissus de l'hôte. Une relativement faible quantité d'antigènes parasitaires entre en contact brièvement avec le système immunitaire.
- Puis les phases de mérogonies libèrent une quantité croissante de parasites dans la circulation sanguine terminée par une décharge de mérozoïtes à la fin de la dernière mérogonie.
- Enfin, l'invasion des fibres musculaires et le développement du sarcocyste à l'intérieur de celles-ci. Lors de cette ultime phase, le parasite est protégé car séquestré loin du système immunitaire (Savini *et al.*, 1997a).

La principale production d'anticorps se fait ainsi lors de la dernière mérogonie même si des anticorps sont également produits lors des autres phases, mais en moins grande quantité (Savini *et al.*, 1997a).

Des antigènes de surface, de poids moléculaire allant de 20 à 74 kDa, communs aux sporozoïtes, tachyzoïtes, et bradyzoïtes, ainsi que des antigènes cytoplasmiques de tachyzoïtes allant de 50 à 70 kDa, ont été mis en évidence (Euzéby, 1998).

Les bovins inoculés expérimentalement avec des bradyzoïtes de *Sarcocystis* développent une réponse en IgM anti-*Sarcocystis* trois à quatre semaines post-inoculation. Cette augmentation des IgM est relativement brève et revient à son niveau de départ deux à trois mois après. Une réponse en IgG1 est observée cinq à six semaines post-inoculation. La réponse en IgG1 apparaît donc plus tardive que celle en IgM mais à une durée de vie plus longue (le niveau en anticorps reste élevé pendant cinq à six mois). De plus, les IgG1 atteignent leur niveau maximal environ un mois post-inoculation. Ces anticorps peuvent être détectés par hémagglutination indirecte (IHA), par ELISA, par dot-ELISA, par fluorescence indirecte des anticorps (IFAT) ou par fixation du complément (Dubey *et al.*, 1989). L'apparition et la persistance des anticorps varient en fonction de l'espèce infectée et de l'espèce de parasites responsable de l'infection. Un antigène de bradyzoïte de 61 kDa capable de provoquer la formation d'IgE a également pu être mis en évidence mais la cinétique exacte reste floue (Euzéby, 1998). En revanche, aucune réponse en IgG2 ou en IgA n'a pu être observée après inoculation. Une réponse cellulaire apparaît également quinze jours post-inoculation avec la présence de lymphocytes spécifiques mais leur activité décroît rapidement (Gasbarre *et al.*, 1994).

Ainsi, la présence d'IgM spécifiques coïncide avec la sarcosporidiose clinique et peut être utilisée pour le diagnostic des sarcosporidioses aiguës. De plus, ces anticorps apparaissant rapidement après inoculation, leur détection permet un diagnostic précoce de la maladie. En revanche, la détection des IgG spécifiques peut être utile lors d'infections latentes ou chroniques (Savini *et al.*, 1994), ces immunoglobulines ayant de plus tendance à persister à une relativement haute concentration dans le sérum lors d'infections chroniques (Dubey *et al.*, 1989).

L'administration de colostrum ne procure pas de protection contre l'infection par *Sarcocystis* (Dubey *et al.*, 1989).

L'immunité est spécifique de chaque espèce de coccidies et l'immunité pour une espèce de *Sarcocystis* ne confère pas d'immunité pour les autres espèces (Fayer, 1980). Cette immunité ne permet pas de protéger les animaux contre la maladie (Savini *et al.*, 1987).

4.2. Chez l'hôte définitif

Contrairement à l'infection chez l'hôte intermédiaire, les coccidioses sarcocystiques dues à la présence des gamétocytes ne génèrent pas d'immunité. En effet, les formes sexuées de *Sarcocystis* ne sont que peu immunogènes contrairement aux schizontes que l'on retrouve chez l'hôte intermédiaire au cours des schizogonies (non présents chez l'hôte définitif) (Euzéby, 1998). Les réinfections des hôtes définitifs sont alors possibles.

5. Diagnostic

5.1. Chez l'hôte intermédiaire

5.1.1. Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique de la sarcosporidiose est très difficile car l'infection par ce parasite est souvent asymptomatique ou, lorsqu'ils sont présents, les signes cliniques ne sont pas spécifiques. En effet, il ne peut y avoir que des suspicions et le diagnostic est consécutif à l'élimination de toutes les autres causes possibles, à la mise en évidence d'une relation avec les autres espèces (carnivores ou hommes étant les hôtes définitifs des espèces parasitant les bovins) et à la présence des signes cliniques non spécifiques (Dubey *et al.*, 1989).

Une suspicion de sarcosporidiose aiguë peut donc être établie lors d'anémie, d'anorexie, de fièvre, d'hypersalivation, d'avortement, de perte de poils, d'augmentation des paramètres sanguins LDH, SBDH, CKP, urée et bilirubine (Dubey *et al.*, 1989).

Lors de sarcosporidiose chronique, les signes cliniques sont encore plus difficiles à mettre en évidence car cette forme se traduit par une baisse d'appétit et une perte de poids.

5.1.2. Diagnostic *post-mortem*

L'examen des carcasses à l'œil nu a une sensibilité quasi nulle lorsque les kystes sont microscopiques mais cette sensibilité est fortement augmentée lors de présence de lésions de myosite éosinophilique. Le diagnostic à l'œil nu est donc, dans la plupart des cas, inutile puisque les lésions sont le plus souvent sub-microscopiques ou non spécifiques. Cette méthode est cependant non couteuse et rapide.

Le signe *post-mortem* le plus important est la présence d'hémorragies capillaires au sein de nombreux organes, en particulier la langue, le cœur et les muscles squelettiques (Tenter, 1995).

5.1.3. Diagnostic de laboratoire

- Diagnostic morphologique

Le diagnostic peut se réaliser par une reconnaissance morphologique du parasite par étude microscopique des sarcocystes ou des bradyzoïtes.

- Examen à la loupe binoculaire

Cet examen s'effectue sur des échantillons de viande fraîche pressés entre des plaques trichinoscopiques. Cette observation permettant de déterminer la morphométrie des kystes, est rapide et peu couteux mais présente une faible spécificité dépendant de la taille de l'échantillon et ne permettant pas la distinction entre les différentes espèces de *Sarcocystis* (Perez-Creo *et al.*, 2013).

- Examen en microscopie optique

Différentes techniques sont envisageables pour le traitement des viandes avant observation au microscope et sont regroupées dans le tableau III.

Tableau III : Différentes techniques de traitement des viandes avant observation au microscope optique

Méthode utilisée	Principe	Avantages	Inconvénients	Ref
Digestion peptidique	20 g de viande hachée digérée pendant 30 min à 40 °C dans une solution contenant pepsine, HCl et eau distillée. Filtration puis examen microscopique au X400	Technique la plus sensible pour détecter par diagnostic morphologique une infection par <i>Sarcocystis</i>	- Pas de reconnaissance des kystes possible car la paroi est digérée - Les sarcocystes immatures ne sont pas détectés	(1)
		Plus efficace que l'inspection des viandes à l'œil nu, la trichinoscopie ou l'histologie mais la procédure ne détecte pas toutes les infections (si le tissu n'est pas digéré jusqu'à la fin, le parasite reste bloqué dans le filtre)		(2)
Squash muscle	1 g de viande coupée en petits morceaux (3-5 mm), écrasée entre lame et lamelle puis observation au microscope X 40	Simple et rapide	Résultats dépendent de la taille des échantillons	(1)
Squeezing	20 g de viande hachée, récupération du broyat qui est pressé. Récupération d'une goutte de liquide qui est placée entre lame et lamelle			(1)
Coupes histologiques	Sur viande fraîche. Fixation au formol 10 % pendant 24h, déshydratation à l'alcool et fixation dans la paraffine. Coloration à l'hématoxyline et l'éosine.	Utile pour déterminer la morphologie du sarcocyste	Peu sensible	(1) (3)

(1) Latif *et al.*, 1999 ; (2) Alvin *et al.*, 1992 ; (3) Tenter, 1995

L'examen par microscopie optique est facile et peu coûteux. Il permet la mise en évidence d'une infection par *Sarcocystis* et la distinction entre les kystes à paroi fine (*S. cruzi* et *S. heydorni*) et les kystes à paroi épaisse (*S. hirsuta*, *S. hominis* et *S. rommeli*). Cependant, il ne permet pas l'identification exacte de chaque espèce contrairement à la microscopie électronique à transmission. De plus, la sensibilité est fortement dépendante de la taille de l'échantillon observé (Tenter, 1995).

- Examen en microscopie électronique à transmission

L'examen par microscopie électronique à transmission nécessite la fixation au préalable de l'échantillon avec du glutaraldéhyde à 2 % puis une déshydratation. Cet examen permet la détermination de l'ultra-structure de la paroi du kyste (notamment l'épaisseur de la paroi et la morphologie des cytophanères, voir partie 1.5.1., tableaux I et II) aboutissant à la différenciation des espèces de *Sarcocystis*.

Cette technique permet donc l'identification des espèces et ce, même après une congélation des échantillons. En effet, une étude menée par Chen *et al.* sur des viandes congelées a permis de montrer qu'il n'y avait pas de changement sur la paroi ni sur la morphologie des cytophanères lorsque des viandes parasitées par *S. miescheriana* et *S. hominis* étaient congelées à -20 °C pendant 30 jours. Cette température n'avait une influence négative que sur les bradyzoïtes et le pouvoir infectieux du parasite (Chen *et al.*, 2007).

Cependant, les examens microscopiques nécessitent un personnel formé, sont coûteux et chronophages. De plus, cette identification par diagnostic morphologique peut entraîner des confusions (Xiang *et al.*, 2009).

- Diagnostic sérologique

L'IFAT et l'ELISA sont les deux techniques les plus couramment utilisées mais l'utilisation de l'IHAT, de la CFT et du dot-ELISA est également possible. Ces tests sérologiques sont réalisables du vivant de l'animal et se basent sur l'utilisation de sérum individuel ou de mélange. Ces tests permettent la détection des anticorps circulants mais pas des kystes sarcosporidiens responsables des lésions.

- IFAT

La méthode d'immunofluorescence indirecte utilise des antigènes provenant de bradyzoïtes de cœur de bovins infectés par *Sarcocystis*, traités avec une solution de digestion contenant de la pepsine, de l'acide chlorhydrique et du chlorure de sodium. Cette méthode permet la détection spécifique des IgG et a l'avantage de ne pas présenter de réactions croisées avec *T. gondii* ou *N. caninum* (Moré *et al.*, 2008).

- ELISA

Une méthode ELISA utilisant des IgG anti-bovins peut être utilisée pour le diagnostic de sarcosporidiose du vivant de l'animal. Une étude de prévalence de *Sarcocystis* chez les bovins, menée en Egypte, a montré que la sensibilité de la méthode ELISA était beaucoup plus élevée que la recherche microscopique ou macroscopique de *Sarcocystis*. En effet, une prévalence de 25,5% et de 27,7 % était rapportée avec l'utilisation des méthodes macroscopiques et microscopiques alors qu'une prévalence de 94 % a été obtenue par ELISA en utilisant le sérum de ces mêmes animaux (Metwally *et al.*, 2014). Savini a également montré une forte sensibilité ainsi qu'une forte spécificité de cette méthode, les valeurs de sensibilité et de spécificité pouvant être améliorées en abaissant ou en augmentant la valeur seuil de détection. De plus, la méthode utilisant des antigènes de mérozoïtes est plus sensible et plus spécifique (sensibilité de 98 % et spécificité de 97 %) que la méthode utilisant des antigènes de bradyzoïtes (sensibilité de 95 % et spécificité de 84 %). A l'échelle du troupeau, une sensibilité et une spécificité de 100 % ont été démontrées en utilisant les antigènes de mérozoïtes (Savini *et al.*, 1997b).

La méthode ELISA semble donc être une méthode spécifique, sensible, peu chère et facile d'utilisation applicable aussi bien à l'échelle de l'individu qu'à l'échelle du troupeau.

Cependant, il existe des réactions croisées entre les antigènes de cystozoïtes et de mérozoïtes de *Sarcocystis* hétérologues. Ces fortes réactions croisées gênent le diagnostic spécifique d'espèce et il est actuellement impossible de détecter les espèces pathogènes des non-pathogènes (Tenter, 1995). Il existe également des réactions croisées avec *Toxoplasma gondii* (Euzéby, 1998).

Enfin, il est souvent impossible de détecter les anticorps pendant la maladie clinique car lors des premières phases de l'infection en cas de sarcosporidiose aiguë ou d'avortement consécutif à une infection par *Sarcocystis*, les niveaux d'anticorps sont souvent trop faibles pour être détectés (Tenter, 1995).

- Diagnostic génomique

Les techniques sérologiques ne permettent pas de distinguer les espèces de *Sarcocystis* en cause ni de mettre en évidence les formes aiguës de la maladie. C'est pourquoi les méthodes moléculaires ont été développées. Ces méthodes sont plus spécifiques et plus sensibles. Elles permettent un diagnostic de précision, c'est-à-dire le diagnostic de l'espèce en cause (Nourollahi Fard *et al.*, 2009). Elles se font le plus souvent *post-mortem* mais peuvent également se dérouler du vivant de l'animal sur des biopsies musculaires (Glüçü *et al.*, 2004).

- Méthode d'hybridation

L'utilisation de sonde à ADN s'hybridant avec l'ADN des mérozoïtes présents dans le sang des bovins permet de réaliser le diagnostic de l'infection par *Sarcocystis*. En 1996, Ndiruti *et al.* évaluent la sensibilité de la méthode d'hybridation sur des veaux présentant une maladie aiguë suite à une infection expérimentale, en comparant aux méthodes microscopiques et IFAT. Cette méthode d'hybridation permet une détection plus précoce et sur un plus long terme lors de maladies aiguës comparativement aux deux autres méthodes. Il s'agit donc d'un outil diagnostique efficace pour la détection des mérozoïtes de *Sarcocystis* en phase aiguë mais cette méthode ne permet cependant pas de différencier les espèces de *Sarcocystis* en cause (Ndiruti *et al.*, 1996).

En 1992, Gajadhar *et al.* utilisent une sonde à ARN pour la détection des *Sarcocystis*. Pour cela, ils utilisent la petite sous-unité de l'ARNr 18S. Cet ARNr présente des régions hypervariables mais également des régions fortement ou partiellement conservées au sein des Apicomplexa et se révèle donc utile pour la comparaison phylogénétique et le diagnostic. Cette méthode est plus sensible (détection de 1 ng d'ARN) que celle utilisant l'ADN car l'ARNr représente environ 90 % de l'ARN total avec environ 30 % correspondant à la petite sous-unité de l'ARNr SSU alors que les séquences hautement répétées d'ADN représentent moins de 1 % de l'ADN total. De plus, cette technique permet la différenciation des espèces de *Sarcocystis* (Gajadhar *et al.*, 1992).

L'ARN n'est cependant pas une molécule très stable et peut facilement être digéré lors des digestions enzymatiques. Il est de plus difficile d'effectuer une standardisation de cette méthode. Enfin, la nécessité de l'utilisation de marqueurs radioactifs pour obtenir une spécificité correcte restreint l'utilisation des tests à un nombre limité de laboratoires spécialisés et pose des problèmes environnementaux (Tenter, 1995). L'utilisation comme test de routine est donc restreinte, c'est pourquoi le développement de méthodes PCR semble indispensable.

- Technique PCR

La Polymerase Chain Reaction ou PCR, technique d'amplification *in vitro* de l'ADN, permet la détection du genre *Sarcocystis* voire la détermination de l'espèce de *Sarcocystis* en cause. Cette technique utilise l'ARNr 18S dont la séquence présente très peu de modifications au cours de l'évolution (Tenter, 1995).

La PCR se base sur l'utilisation d'un kit d'extraction d'ADN contenant un Master Mix composé de Taq polymérase, d'amorces (des amorces sens correspondant à presque toutes les séquences de *Sarcocystis* et des amorces anti-sens), de dNTP et d'une solution tampon.

L'amplification de l'ADN se fait par une succession de cycles à différentes températures permettant de dénaturer l'ADN puis d'avoir une phase d'hybridation des amorces et de polymérisation (Moré *et al.*, 2008). La dernière étape consiste en la migration par électrophorèse de l'ADN sur un gel d'agarose coloré à l'aide de bromure d'éthidium.

La PCR-RFLP (ou Restriction Fragment Length Polymorphism PCR) se base sur le polymorphisme des longueurs des fragments de restriction. Cette méthode utilise différentes endonucléases (ou enzymes de restriction). Après la digestion, les fragments d'ADN de l'ARNr 18S sont récupérés et la détermination de l'espèce se fait en fonction de la taille des séquences obtenues après migration par électrophorèse. Cette technique est simple, permet la détermination des espèces en cause à moindre coût et présente une forte spécificité (Stojecki *et al.*, 2012).

Cependant, ces méthodes de PCR et PCR-RFLP présentent un inconvénient car elles nécessitent une information sur les séquences d'acides nucléiques pour l'utilisation des amorces ce qui prend du temps et est coûteux (MacPherson et Gajadhar, 1994). La PCR-RAPD (ou Random Amplified Polymorphic DNA PCR) utilise des amorces aléatoires contrairement aux techniques de PCR classiques. On s'affranchit alors de la connaissance préalable de l'ADN cible, les amorces s'hybrident de façon aléatoire (Stojecki *et al.*, 2012 ; Güclü *et al.* 2004). MacPherson et Gajadhar ont cependant montré qu'une des limites de cette technique est qu'elle peut également amplifier de l'ADN de bovins.

En 2013, Moré *et al.* développent une méthode de PCR Multiplex en temps réelle afin d'affiner le diagnostic et d'estimer la prévalence en fonction des différentes espèces de *Sarcocystis* présentes chez les bovins en Argentine. Cette méthode se base sur l'utilisation de plusieurs amorces anti-sens caractéristiques de chaque espèce de *Sarcocystis*. Cette PCR a de plus l'avantage d'être quantitative ce qui assure un gain de temps car la révélation sur les gels par électrophorèse n'est pas nécessaire. Moré *et al.* ont également montré qu'il n'existait pas de réactions croisées avec les autres Apicomplexa ou entre les différentes espèces de *Sarcocystis* (Moré *et al.*, 2013).

Cependant, l'utilisation de l'ARNr 18S ne permet parfois pas de distinguer les espèces phylogénétiquement proches telles que *S. hominis* et *S. heydorni*. L'utilisation du gène de la sous-unité 1 du cytochrome C oxydase également appelé Cox 1 est adaptée dans ces cas-là (Gjerde, 2013).

La PCR est une méthode simple et peu coûteuse ne nécessitant pas de personnel hautement qualifié pour son utilisation. De plus cette technique est très sensible comparativement aux autres méthodes diagnostiques. Il s'agit donc d'un excellent outil pour le diagnostic et pour l'étude de la prévalence dans différentes régions (Tenter, 1995).

5.2. Chez l'hôte définitif

5.2.1. Diagnostic clinique

Chez l'hôte définitif, une suspicion de coccidiose sarcocystique se base sur la symptomatologie (faiblesse, douleurs abdominales, nausées, diarrhées) associée à une récente ingestion de viande crue ou insuffisamment cuite. Cependant les signes cliniques étant non spécifiques, le diagnostic définitif requiert une identification des sporocystes dans les fèces (Desportes-Livage et Datry, 2005).

5.2.2. Diagnostic de laboratoire

Les sporocystes de *S. hominis* sont excrétés 14 à 18 jours après l'ingestion de viande contaminée. Des techniques d'enrichissement peuvent être utilisées pour les coproscopies (flottation, formol-éther) (Desportes-Livage et Datry, 2005). Cependant, cette méthode présente une faible spécificité et n'est pas espèce-spécifique car la taille et la forme des sporocystes des différentes espèces sont similaires (Tenter, 1995). L'observation des sporocystes se fait au microscope optique après flottation à l'aide de liquides à forte densité tels que le chlorure de sodium, le chlorure de césium, le sulfate de zinc, le saccharose, le Percoll et le Ficoll-hypaque (Fayer, 2004).

Il est également possible d'utiliser des méthodes PCR pour le diagnostic à partir de fèces d'hôtes définitifs (Xiang *et al.*, 2009).

6. Traitement

6.1. Chez l'hôte intermédiaire

Il n'existe pas de traitement spécifique de la sarcosporidiose. En effet, l'infection est souvent asymptomatique et dure peu longtemps, une guérison spontanée est fréquemment observée (Fayer, 2004).

En 1986, Foreyt étudie l'efficacité des traitements à base de décoquinate, de lasalocide et de monensin sur des veaux infectés expérimentalement par *Sarcocystis* (Foreyt, 1986). Les différents traitements sont administrés à une posologie de 33 mg/kg/j pendant 87 jours. A l'issue de cette étude, les veaux traités au décoquinate et au lasalocide sont morts d'une sarcosporidiose aiguë alors que ceux traités au monensin présentent une diminution des symptômes. Cependant, le monensin ne permet pas d'éviter la formation des kystes.

Les traitements utilisant des anti-coccidiens classiques (amprolium, salinomycine, oxytétracycline, toltrazuril, hydroxynaphtoquinone) peuvent être utilisés et doivent être renouvelés toutes les semaines pendant 3 mois. Cependant, le diagnostic n'étant que très rarement posé, le traitement n'est généralement qu'un traitement symptomatique (Euzéby, 1998).

L'efficacité d'une thérapie immunosuppressive afin de lutter contre la vascularite ou la myosite en réduisant la réaction inflammatoire ou en facilitant la dispersion du parasite reste inconnue (Fayer, 2004).

6.2. Chez l'hôte définitif

L'affection étant le plus souvent asymptomatique et ne durant que peu de temps, il n'existe pas de traitement spécifique pour les carnivores domestiques ni pour l'homme.

En 2014, Nimri rapporte un cas de sarcosporidiose chez un homme de 19 ans. L'analyse microscopique a permis d'établir que la maladie était due à *Sarcocystis hominis*. Un traitement à base de sulfaméthoxazole-triméthoprime a permis de stopper les symptômes ainsi que l'excrétion de sporocystes (Nimri, 2014).

7. Importance de la sarcosporidiose

7.1. Epidémiologie

De nombreux facteurs peuvent en partie expliquer la forte prévalence de l'infection par *Sarcocystis* (Dubey *et al.*, 1989 ; Euzéby, 1998) :

- Un hôte peut présenter différentes espèces de *Sarcocystis*.
- De nombreux hôtes définitifs sont impliqués dans la transmission.
- Les sporocystes et les ookystes restent viables dans le milieu extérieur pendant de nombreux mois. Ils peuvent être propagés ou protégés par des invertébrés. Ils résistent au froid et peuvent ainsi persister dans les pâtures durant l'hiver. Ils sont également résistants aux désinfectants.
- Un large nombre d'ookystes peut être excrété dans les matières fécales. Par exemple, un chien ingérant une relativement petite quantité de viande (250g) excrète entre 100 et 6000 sporocystes par gramme de matière fécale. Sachant qu'un chien fait en moyenne 250g à 350g de fèces par jour, il peut excréter entre 25 000 et plus de 2 millions de sporocystes par jour.
- Il n'existe qu'une faible voire aucune immunité permettant de détruire les sporocystes.
- Contrairement aux autres coccidies, *Sarcocystis* est excrété directement sous forme infectieuse et ne dépend pas des conditions du milieu pour la maturation ou l'acquisition de son caractère infectieux.
- L'émission de sporocystes est plus longue que dans le cas des autres coccidioses. En effet, l'excrétion commence sept jours après ingestion de la viande contaminée et se prolonge durant 3 à 5 mois. De plus, les réactions immunitaires de l'hôte ne se développent principalement que contre les formes schizogoniques du parasite, formes absentes chez les hôtes définitifs. Selon Euzéby, les animaux se contamineraient principalement à l'étable car il y aurait une concentration suffisante de sporocystes

alors qu'ils seraient dilués au pâturage, bien que des insectes coprophages, l'eau ou le vent pourraient les disséminer. Cependant, aucune mesure de la quantité de sporocystes dans l'environnement n'a été effectuée afin de vérifier cette hypothèse.

- La destruction des kystes sarcosporidiens nécessite une cuisson à cœur de la viande (30 minutes à 70 °C) ou une congélation (-5 °C pendant 24 heures ou à -20 °C pendant 10 heures). Ceci signifie qu'en pratique les congélateurs domestiques peuvent assurer la stérilisation des viandes parasitées par *Sarcocystis*. En revanche, les fours à micro-ondes ne détruisent pas les sporocystes.

7.1.1. Facteurs de risque de l'infection des bovins par *Sarcocystis*

Il semblerait que certains bovins soient plus à risque que d'autres vis à-vis de l'infection :

- La prévalence augmente avec l'âge de l'animal (Savini *et al.*, 1992). Une explication pourrait être que les animaux âgés ont plus de possibilités de se retrouver en contact avec le parasite.
- Les mâles castrés sont plus à risque (Savini *et al.*, 1992). Cependant une seconde étude de Savini *et al.* en 1994 contredit cette observation.
- Il ne semble pas y avoir d'influence de la race des bovins sur le risque d'infection par *Sarcocystis* (Léonard, 2014).

Certains facteurs environnementaux ou facteurs liés au mode d'élevage sont également à risque pour l'infection des bovins par *Sarcocystis*, toutes espèces confondues :

- Une étude menée en Australie a montré que la prévalence était plus importante dans les régions tropicales (87 %) et tempérées (60 %) que dans les régions arides et semi-arides (9 % et 31 % respectivement) (Savini *et al.*, 1992). En effet, dans les milieux présentant une forte température ainsi qu'une humidité relative importante, les sporocystes pourraient être détruits par manque d'oxygène (Savini *et al.*, 1996).
- Plus la densité d'animaux (hôtes intermédiaires et hôtes définitifs) augmente, plus le risque d'infection par *Sarcocystis* est élevé (Savini *et al.*, 1994).
- Le risque d'infection augmente lorsque les pâtures sont à proximité des habitations (jusqu'à 1 km) (Savini *et al.*, 1994).
- Le pâturage avec des moutons et des bovins permet de diminuer la prévalence par assainissement des parcelles (Savini *et al.*, 1994).
- La présence de la faune sauvage à proximité des lieux de pâturage augmente le risque d'infection (Savini *et al.*, 1994). De plus, cette faune sauvage pourrait jouer un rôle de vecteur.

7.1.2. Facteurs de risque du développement de lésions de myosite éosinophilique

Les races Blonde d'Aquitaine, Parthenaise et Limousine dans une moindre mesure semblent être plus touchées par la myosite éosinophilique (Lemieux, 2014 ; Bertin, 2013 ; Léonard, 2014). De plus, les génisses et les vaches semblent présenter plus fréquemment ces lésions que les mâles (Lemieux, 2014).

Aucune influence de l'âge sur le développement de lésions de myosite éosinophilique n'a pu être clairement mise en évidence (Lemieux, 2014 ; Léonard, 2014).

7.2. Prévalence

7.2.1. Prévalence chez les bovins

7.2.1.1. Prévalence toutes espèces confondues

La prévalence de la sarcosporidiose est variable à travers le monde, pouvant parfois atteindre 100 % dans certains pays. Le tableau IV présente les prévalences dans diverses régions du monde de l'infection par *Sarcocystis* spp., chez les animaux de rente.

Tableau IV : 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	Echantillonnage	Méthode employée		Dates de l'étude	Ref
				Microscopie	Bio. Mol.		
Europe	Belgique	94 %	67 échantillons de viande bovine hachée	TEM*	PCR (ARNr 18S)	2006	(1)
		97 %	100 bovins – 300 prélèvements (cœur, diaphragme, œsophage)	Digestion + MP*		1987	(1)
	Italie (Sicile)	96 %	50 vaches - 1100 prélèvements (22 muscles)	Histologie		2008-2009	(1)
	France (Pays de la Loire)	97,6 %	123 Blondes d'Aquitaine		PCR Multiplex	2013	(2)
	Allemagne	40 %	130 échantillons de viandes hachées	Histologie		-	(3)
Asie	Iran	84 %	250 chameaux			2002-2005	(1)
	Vietnam	79 %	502 buffles asiatiques – 2500 prélèvements (5 muscles)	Histologie		1996-1997	(1)
		90 %	30 buffles asiatiques – 208 prélèvements		PCR-RFLP (ADNr 18S)	2003	(1)
		63 %	101 vaches – 541 échantillons	TEM*			(1)
	Mongolie	90 %	30 vaches	Ecrasement entre lames		1998-1999	(1)
		93 %	30 yacks				(1)
		100 %	30 hainag*				(1)
		97 %	777 moutons				(1)
	Japon	6 %	317 bovins			1996-1999	(1)
	Malaisie	36 %	102 bovins	Histologie	PCR (ARNr 18S)	2011-2012	(4)
67 %		18 buffles	(4)				
Océanie et continent américain	USA (import)	37 %	87 bovins	Histologie		1996-1998	(1)
	Australie (import)	29 %	78 bovins (œsophage)				(1)
	Australie (ouest)	52 %	714 bovins (œsophage)	Digestion + MP*		1989-1990	(1)
	Brésil	6 %	64 boîtes de conserve (beg)*	Histologie		2003-2004	(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) Lemieux, 2014 ; Moré *et al.*, 2014 ; (4) Latif, 2013

*Bio. Mol. : Biologie Moléculaire ; Hainag : croisement vache x yack ; MP : Microscopie photonique ; TEM : Microscopie Electronique à Transmission ; beg : bœuf en gelée.

Ces fortes prévalences sont à comparer avec la faible prévalence des myosites éosinophiliques qui serait de 0,002 % à 0,013 % en fonction des pays (Vangeel *et al.*, 2012).

Tous les muscles peuvent être atteints par le parasite mais il existe cependant des sites électifs au niveau desquels les parasites vont se loger préférentiellement. Chez les bovins, le cœur et le diaphragme semblent être des sites d'élection privilégiés (tableau V).

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

Etude		Bucca <i>et al.</i> , 2011	Vercruyssen <i>et al.</i> , 1989		Fukuyo <i>et al.</i> , 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 % (581/100)	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)	76,6 % (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 costale

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

Il semble également que les espèces de *Sarcocystis* aient des sites d'élection privilégiés (tableau VI). *S. cruzi* semble se localiser préférentiellement dans le myocarde et *S. hominis* dans le diaphragme et les muscles squelettiques.

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

Espèce de <i>Sarcocystis</i>	Muscle étudié		
	Diaphragme	Autre muscles squelettiques	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)

7.2.1.2. Prévalence en fonction des espèces

Concernant la sarcosporidiose, les études menées à Oniris montrent que *S. hominis* est l'espèce la plus prévalente chez les bovins (Bertin, 2013 ; Lemieux, 2014). De plus, l'étude de Lemieux montre que *S. hominis* est également l'espèce la plus prévalente lors de myosite éosinophilique, suivie de *S. cruzi* (tableau VII) (Lemieux, 2014).

Tableau VII : Prévalence par espèce de *Sarcocystis* sur des carcasses de bovins saisies pour myosite éosinophilique, détermination par PCR Multiplex (d'après Lemieux, 2014) (étude réalisée sur 123 Blondes d'Aquitaine en Pays de la Loire)

Espèce de <i>Sarcocystis</i>	Prévalence par espèce
<i>S. cruzi</i>	61 % (75/123)
<i>S. hominis</i>	88,6 % (109/123)
<i>S. hirsuta</i>	1,6 % (2/123)

7.2.2. Prévalence chez l'homme

La coccidiose sarcocystique chez l'homme est relativement fréquente à travers le monde mais la prévalence reste faible comparée à la prévalence de la sarcosporidiose chez les bovins (tableau VIII). Cependant, cette prévalence peut être sous-estimée car la maladie n'est que très rarement diagnostiquée chez l'homme

Tableau VIII : Prévalence dans différentes régions du monde de l'infection intestinale par *Sarcocystis* spp. chez l'homme

Pays ou zone géographique		Prévalence	Echantillon	Technique utilisée	Ref	
Europe	Allemagne		2 %	Selles	Microscopie	(1)
	France	France	De 4 à 32 %	Selles		
		France	2 %	3500 échantillons de selles	(2)	
		Ouest de la France	3 %	163 échantillons de selles	PCR*	(3)
	Pays Bas		De 10 à 12 %	Selles	Microscopie	(1)
	Pologne		10,4 %	125 échantillons de selles, enfants âgés de 7 à 18 ans		(4)
Asie et Océanie	Thaïlande	Kaen	0,4 %	253 échantillons de selles (140 femmes et 102 hommes) de 2 à 80 ans	Microscopie	(5)
		Ubon Ratchathani	46 %	479 échantillons de selles		
		Khon Kean	8 %	1124 échantillons de selles		
	Laos		>10 %	1008 échantillons de selles	Microscopie	(2)
	Tibet	Duilongdeqing	20,5 %	926 échantillons de selles en tout		
		Miline	22,5 %			
		Linzhi	22,9 %			
	Vietnam		1,1 %	1128 échantillons de selles	IFAT*	(6)
	Malaisie	4 groupes ethniques différents	20 %	Sérum de 243 donneurs		
Australie		0,5 %	385 échantillons de selles	Microscopie	(2)	

(1) Euzéby, 1997 ; (2) Poulsen et Stensvold, 2014 ; (3) Ballas, 2015 ; (4) Dubay *et al.*, 1989 ; (5) Fayer *et al.*, 2015 ; (6) Vijayammat et Dissanaïke, 1978

7.3. Importance économique

Il a été estimé que l'infection des bovins par *Sarcocystis* entraînait des pertes économiques annuelles de l'ordre de 95 millions de dollars aux Etats-Unis (Daugschies *et al.*, 2000). Les pertes économiques dues à l'infection par ce parasite sont de deux ordres : d'une part des pertes liées aux formes cliniques et sub-cliniques de la maladie ayant des conséquences sur les aptitudes zootechniques des animaux, d'autre part des pertes liées aux saisiés réalisées à l'abattoir.

7.3.1. Pertes dues à l'infection par *Sarcocystis*

Il est très difficile de chiffrer les pertes dues à l'infection par *Sarcocystis*. Moré *et al.* ont montré que des veaux possédant de faibles titres en anticorps anti-*Sarcocystis* présentaient un GMQ significativement plus important que ceux possédant un fort taux en anticorps (Moré *et al.*, 2010). Cependant, bien qu'altérant les performances de croissance des animaux, l'infection par *Sarcocystis* ne semble pas altérer la qualité de la viande (Dauguschies *et al.*, 2004).

L'infection a cependant un impact sur la quantité de lait produite par les vaches et sur le nombre d'avortement ou de veaux morts-nés mais là encore une estimation du coût de l'infection est impossible (Euzéby, 1997).

7.3.2. Pertes dues aux saisies à l'abattoir

Les kystes sont rarement visibles à l'œil nu. Ils ne sont visibles que lorsqu'ils sont de grande taille ou coalescents. Les saisies à l'abattoir ont lieu lorsque les vétérinaires inspecteurs observent des lésions de myosite éosinophilique.

Les saisies pour myosite éosinophilique sont principalement des saisies totales, comme l'indique l'étude de Bertin en 2013 pour laquelle 88 % des saisies étaient totales. La décision de saisir les carcasses en saisie totale ou en saisie partielle reste le plus souvent dépendante de l'abattoir. Ainsi, les coûts liés à la perte de la carcasse sont importants pour les éleveurs bien que les organismes tels qu'Interbev Pays de la Loire les indemnisent à 80 % du prix de la carcasse saisie. Selon les données d'Interbev Pays de la Loire concernant le Fond de d'Assainissement Régional (F.A.R), en 2015, en Pays de la Loire, la moitié des dossiers soumis concernait les cas de myosite éosinophilique. Le poids de carcasses saisies en 2015 s'élevait à 181,41 tonnes et correspondait à un remboursement des éleveurs à hauteur de 654 203 €, soit 80 % du prix des carcasses saisies. Si le F.A.R. n'existait pas, les saisies pour myosite éosinophilique représenteraient un coût pour les éleveurs de 817 753 €.

Cependant en 2015, on constate une très légère diminution du nombre de cas de saisie pour myosite éosinophilique avec une prévalence de 0,076 % contre 0,079 % les années précédentes.

7.4. Importance médicale

La sarcosporidiose n'étant que très rarement diagnostiquée, il n'est pas possible d'estimer l'importance médicale de la maladie chez les bovins. Il en est de même pour la coccidiose humaine à *Sarcocystis* dont l'importance médicale est non explorée.

8. Méthodes de lutte

8.1. Prophylaxie médicale

8.1.1. Chez l'hôte intermédiaire

Peu d'études ont été menées pour l'établissement de vaccins car il n'existe pas pour le moment de demande sur le marché (Uggla et Buxton, 1990). L'utilisation de préparations antigéniques dérivant de bradyzoïtes de *Sarcocystis* sur des porcs n'a pas permis d'induire une immunité protectrice. Cependant, les effets d'une immunisation par une faible dose de sporozoïtes vivants semblent adéquats pour engendrer une protection contre la phase clinique de la maladie.

8.1.2. Chez l'hôte définitif

Il n'existe pas de mesure de prophylaxie médicale chez l'hôte définitif à l'heure actuelle. En effet, la maladie n'étant que très peu diagnostiquée et le plus souvent asymptomatique, il n'y a pas de nécessité de développer des mesures de prophylaxie médicale.

8.2. Prophylaxie sanitaire

8.2.1. Chez l'hôte intermédiaire

Afin de prévenir la contamination des bovins, il faut éviter l'ingestion de sporocystes contenus dans les fèces d'hommes, de chats ou de chiens pouvant contaminer l'eau, la nourriture ou le lieu de vie. Lors de suspicion de contamination de l'eau, il est recommandé de la faire bouillir afin d'en assurer une désinfection (Fayer, 2004).

Il serait théoriquement possible de réaliser des tests sérologiques sur les bovins au moment de la saignée à l'abattoir par immuno-enzymologie avec détection par un marqueur au luminol, afin d'écartier les viandes contaminées par *Sarcocystis* de la consommation humaine. En effet, les IgG et les IgM apparaissent à la 3^{ème} et à la 5^{ème} semaine post-ingestion respectivement et persistent 4 mois et plus de deux ans. Cependant ce genre de recherche est très coûteux et ne présente pas d'intérêt majeur, la coccidiose sarcocystique étant dans la majorité des cas, asymptomatique (Euzéby, 1998). De plus, au vue de la très forte prévalence de la sarcosporidiose chez les bovins, cela entraînerait l'exclusion de la quasi-totalité des carcasses de bovins car la méthode par immuno-enzymologie ne permet pas la distinction entre *S. hominis* et les autres espèces de *Sarcocystis*.

8.2.2. Chez l'hôte définitif

Les mesures de prévention de la contamination de l'hôte définitif passent par une cuisson suffisante des viandes ou une congélation de celles-ci afin de tuer les bradyzoïtes contenus dans les sarcocystes (Fayer, 2004). En effet, la température permettant la destruction du parasite est de 65 à 70 °C pendant 20 minutes. De plus, la congélation à – 5 °C pendant 48 heures permet une destruction efficace du parasite. En revanche, les fours à micro-ondes, utilisé lors de la décongélation des viandes par exemple, ne dégagent pas une chaleur assez pénétrante pour permettre de stériliser la viande (Euzéby, 1997).

L'utilisation d'anti-coccidiens classiques en prévention tels que l'amprolium ou la salinomycine peut être efficace dans la prévention de la maladie sévère et de la mort chez des veaux et des agneaux infectés expérimentalement (Fayer, 2004). Il n'existe pas de données concernant la prophylaxie médicale chez l'homme.

Bilan

La sarcosporidiose bovine est :

- ✓ Une maladie parasitaire due à des coccidies kystogènes du genre *Sarcocystis* présentant un cycle de développement à deux hôtes.
- ✓ Une infection présentant une prévalence très élevée dans le monde entier.
- ✓ Le plus souvent asymptomatique.
- ✓ Responsable de lésions de myosite éosinophilique, chez certains bovins. Découvertes de façon fortuite à l'abattoir, ces lésions entraînent de fortes pertes économiques pour la filière bovin viande dues aux saisies, le plus souvent totales, qu'elles génèrent.
- ✓ Une infection qui se transmettrait par voie horizontale selon la bibliographie. Cela impliquerait donc que les hôtes intermédiaires et les hôtes définitifs soient dans des lieux géographiquement proches. Cependant la prévalence obtenue paraît très élevée, n'existe-t-il pas un autre mode de transmission pouvant expliquer cette forte prévalence observée chez les bovins adultes ?

DEUXIEME PARTIE :
ETUDE
EXPERIMENTALE

1. Cadre et objectifs de l'étude

La prévalence de la sarcosporidiose chez les bovins est proche de 100 % dans différents pays du monde. Cette affection, bien qu'étant asymptomatique dans la plupart des cas, engendre de fortes pertes économiques lors de saisies à l'abattoir suite au développement de lésions de myosite éosinophilique chez certains bovins. Il semble de plus que l'infection par *Sarcocystis* soit présente dès le plus jeune âge chez les veaux (Moré *et al.*, 2009). A l'exception de quelques études sur la recherche du parasite chez des veaux nouveau-nés ou des avortons par microscopie, peu de travaux ont été menés sur une possible transmission verticale de la sarcosporidiose chez les bovins, pouvant expliquer cette forte prévalence.

Le but de notre étude est donc de :

- rechercher s'il existe une transmission verticale des différentes espèces de *Sarcocystis* présentes chez les bovins, pouvant expliquer cette forte prévalence et l'infection précoce des animaux,
- rechercher la présence de parasites au niveau du placenta afin d'améliorer les mesures de prophylaxie sanitaire s'il s'avérait qu'il soit présent.

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité de recherche Secalim à ONIRIS, en partenariat avec Interbev Pays de la Loire.

2. Matériels et méthodes

2.1. Echantillonnage

2.1.1. Prélèvements

L'étude a été menée sur des fœtus (n=150, dont 6 paires de jumeaux) et sur leurs mères (n=140, avec 6 mères de jumeaux, 4 mères n'ont pas pu être prélevées), prélevés dans des abattoirs du Grand Ouest. Nous avons également prélevé le placenta de ces fœtus (n=142, avec 6 placentas de jumeaux, 2 placentas n'ont pas pu être prélevés).

Pour chaque fœtus, une estimation de l'âge était effectuée à l'aide de la grille de détermination de l'âge des fœtus en figure 6, ce qui a permis de les classer en trois tranches d'âge :

- fœtus de 2 à 3 mois (aucun fœtus de moins de 2 mois n'a pu être prélevé)
- fœtus de 3,5 mois à 6 mois
- fœtus 6,5 mois et plus

La fiche de détermination de l'âge des fœtus (figure 6) a été élaborée en utilisant les données de la bibliographie. La classification des fœtus se fait en fonction de leur poids et de leur taille. Ces deux critères étant également liés à la race de l'animal, des erreurs de datation sont possibles. Afin d'être plus précis et de limiter ces erreurs, il nous a paru intéressant d'ajouter d'autres éléments tels que la présence de mamelles ou d'organes génitaux, la présence de poils autour du mufle, de cils ou de poils sur le corps, l'éruption des dents ainsi que l'ouverture des paupières.

AGES	TAILLE	POIDS	DIAMETRE DE L'OEIL	YEUX	MEMBRES	APPAREILS GENITAUX / MAMELLES	OREILLES	PELAGE/ POILS AUTOUR DU MUFFLE	DENTS
1 mois	10 mm	<2,75 g		Yeux différenciés Absence de paupières	Corps incurvé Membres et onglons différenciés				
2 mois	6-7 cm	20 g	4 mm	Paupières closes	Onglons coniques et translucides	Organes génitaux reconnaissables mais testicules non descendus			
3 mois	12-15 cm	170 g	10 mm	100 j : Ebauche de cornée			Oreilles nettement détachées, plissées et rabattues	1 ^{er} poils Pigmentation à l'emplacement des cornes	
4 mois	25 cm	800 g	16 mm		Onglons plus fermes, jaunes et opaques	Mamelles visibles		Pigmentation sur la tête	110 j : éruption des dents
5 mois	40 cm	3,5 kg	20 mm			Descente des testicules achevée		Longs poils autour des yeux et du mufle Pigmentation sur le corps	
6 mois	40-60 cm	5-10 kg	24 mm	6 mois ½ : ouverture des paupières				Poils très fins sur les oreilles et le bout de la queue, cils	
7 mois	55-75 cm	8-18 kg	26 mm			Largeur du scrotum : 33 mm		Corps entier couvert de poils Pigmentation complète	
8 mois	60-85 cm	12-25 kg	27 mm					Fourrure rase, fin duvet sur la face médiale des membres et le l'abdomen	
9 mois	100 cm	40-50 kg	27 mm					Touppillon à l'extrémité de la queue	

Figure 6 :

Fiche de détermination de l'âge des fœtus (Barone, 2001 ; Bonnes, 2005 ; Roberts, 1986 ; Descoteaux, 2009)

L'ensemble des critères est répertorié sur la première ligne du tableau à double entrée de la figure 6. Chaque colonne du tableau est associée à un critère utile pour la détermination de l'âge des fœtus. La première colonne du tableau correspond à l'âge d'apparition des différents critères.

A partir de cette fiche, pour une utilisation plus aisée et pour une meilleure interprétation, nous avons également réalisé un tableau comportant des photos de fœtus à différents âges (figure 7). Ce tableau met en évidence les différents critères à prendre en compte ainsi que la morphologie. Cependant, nous n'avons pas eu la confirmation de l'âge des fœtus présentés sur cette fiche. Il s'agit donc d'une estimation des âges permise par la fiche de détermination de l'âge des fœtus.









FŒTUS DE 2 MOIS 1/2	FŒTUS DE 3 MOIS	FŒTUS DE 4 MOIS	FŒTUS DE 6 MOIS	FŒTUS DE 8 MOIS
 <p>10 cm</p> <p>Paupières closes</p>	 <p>15 cm</p> <p>Paupières closes Oreilles détachées vers l'arrière, plissées et rabattues</p>	 <p>27 cm</p> <p>Paupières closes Onglons plus fermes</p>	 <p>55 cm</p> <p>Ouverture des paupières à 6 mois 1/2</p>	 <p>70 cm</p> <p>Corps entièrement couvert de poils ras, fin duvet sur abdomen et face médiale des membres</p>
 <p>Organes génitaux reconnaissables</p>		 <p>Mamelles visibles</p>	 <p>Longs poils autour des yeux et du mufler</p>	

Figure 7 :
Estimation de l'âge des fœtus (réalisée à partir de la figure 6)

Sur chaque fœtus, environ 200 g de muscles ont été prélevés. Pour des raisons pratiques, les prélèvements ont été réalisés en priorité au niveau des muscles semi-tendineux, semi-membraneux, biceps fémoral, fessier superficiel, fessier moyen, fessier accessoire, fessier profond, tenseur du *fascia lata*, quadriceps, carré fémoral, grand adducteur de la cuisse et gastrocnémien situés au niveau des membres postérieurs. Pour les fœtus ayant moins de 5 mois, la quantité de muscles au niveau des membres postérieurs étant insuffisante pour réaliser les analyses, les muscles grand dorsal, supra et infra-épineux, deltoïde, biceps brachial, petit rond et grand rond, triceps brachial, brachial et tenseur du *fascia antebrachial* situés au niveau des membres antérieurs ont été prélevés afin de s'approcher au plus près des 200 g requis pour les analyses. Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'un couteau nettoyé au jet mais non aseptisé entre chaque utilisation.

Environ 200 g de placenta de chaque fœtus ont été récoltés en prenant soin de prélever pour chaque échantillon quelques cotylédons fœtaux mais pas les caroncules maternelles.

Grâce au système de traçabilité des abattoirs, les mères des fœtus ont pu être retrouvées et 200 g de muscles ont été prélevés au niveau du caparaçon afin de ne pas déprécier les carcasses. Les prélèvements ont été réalisés à l'aide de scalpels à usage unique.

A chaque prélèvement de fœtus était donc associé le placenta et le prélèvement de la mère. L'identification a été réalisée comme suit : un numéro a été attribué à chaque fœtus devant lequel la lettre « F » a été rajoutée, le même numéro était attribué au prélèvement de placenta et de mère devant lesquels ont été rajoutées les lettres P et M respectivement. Les échantillons ont été placés dans des sacs individuels afin d'éviter toute contamination et conservés au congélateur à -20 °C en attente des analyses.

Au cours de la campagne de prélèvements, des jumeaux ont été inclus dans les échantillons à six reprises. Dans ces cas de figure, chaque fœtus était alors prélevé individuellement mais un seul prélèvement de placenta et de mère était effectué pour chaque paire de jumeaux.

Dans un premier temps, les analyses moléculaires ont été menées sur les mères et sur leurs fœtus afin de connaître la prévalence dans ces deux populations mais surtout plus précisément quelles mères et quels fœtus étaient positifs pour *Sarcocystis*. De plus, les analyses sur les fœtus permettaient une comparaison avec le statut des mères vis-à-vis du parasite. Dans un deuxième temps, les analyses moléculaires ont été effectuées sur l'ensemble des placentas afin de voir s'ils présentaient des parasites, s'ils pouvaient avoir un rôle de barrière face au parasite et s'ils pouvaient être une source de contamination éventuelle des hôtes définitifs lors de la délivrance après la mise-bas.

Pour chaque mère, différentes données ont pu être étudiées grâce aux relevés des numéros de tuerie permettant d'avoir accès aux numéros IPG des bovins. Ainsi, pour chaque mère nous avons eu accès aux données suivantes :

- ✓ Numéro d'identification
- ✓ Race
- ✓ Age
- ✓ Lieu d'élevage

Aucune information n'a cependant pu être récoltée concernant la race des pères et la parité des mères.

2.2. Analyses

Les analyses réalisées se basaient sur l'utilisation de la méthode PCR afin de rechercher et d'identifier le parasite à l'échelle spécifique (PCR Multiplex) dans la viande et le placenta suivant le protocole établi par Honoré (Honoré, 2011) suite à des essais menés dans l'UMR INRA Secalim à ONIRIS (annexes 1 à 3). Nous avons également utilisé le protocole mis en place par Vangel *et al.* en 2007 et situé en annexe 4 pour la réalisation des PCR recherchant le genre *Sarcocystis* sans identification spécifique.

2.2.1. Digestion enzymatique

La première étape du protocole, en annexe 1, correspond à la phase de digestion enzymatique.

Les prélèvements sont préalablement mis à décongeler à 4 °C au réfrigérateur la veille de la digestion. Les échantillons sont pesés et 200 g sont alors découpés puis broyés à l'aide d'un mixeur (Moulinex®1000W). Vingt grammes du broyat sont ensuite placés dans 100 mL d'une solution de digestion contenant de la pepsine, du NaCl, du HCl et de l'eau distillée et incubent au bain marie 30 minutes à 37 °C. Cette étape permet ainsi la lyse des tissus. A l'issue de l'incubation, le mélange est passé dans un tamis de 400 µm permettant d'éliminer les débris de grande taille et de laisser passer les kystes de *Sarcocystis*. Après filtration, le liquide est placé dans une ampoule à décanter pendant 30 minutes, laissant ainsi le temps aux parasites, s'ils sont présents, de tomber au fond de l'ampoule par gravité. Le culot est alors prélevé et placé dans des cryotubes eux-mêmes mis au congélateur à -20 °C en attente de l'étape suivante.

2.2.2. Extraction de l'ADN

Cette seconde étape du protocole est détaillée dans l'annexe 2. L'extraction a été réalisée en utilisant les kits NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel®). Les échantillons sont mis à décongeler au réfrigérateur environ 30 minutes avant le début de l'extraction. Au cours de cette étape, on cherche à entraîner la lyse des kystes sarcosporidiens afin de récupérer l'ADN du parasite.

La lyse des parois cellulaires est possible grâce à une incubation d'au moins une heure de l'échantillon à 56 °C avec une protéinase K. A l'issue de l'incubation, l'ajout d'éthanol permet la précipitation de l'ADN. Le mélange est ensuite placé dans des tubes collecteurs contenant des colonnes à silice. Après centrifugation, l'ADN est alors piégé par formation de liaisons faibles au sein de ces colonnes. Différents tampons permettent d'éliminer les éléments autres que l'ADN (débris cellulaires, impuretés...). A l'issue de cette étape, la mise en contact d'un tampon d'éluion à 70 °C avec les membranes de silice permet la libération de l'ADN qui était piégé à l'intérieur des colonnes de silice, par rupture des liaisons faibles.

Les échantillons ainsi extraits sont ensuite placés au congélateur à -20 °C en attente de l'étape suivante.

2.2.3. PCR genre et PCR Multiplex Touch down

La PCR (ou Polymerase Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire qui permet d'amplifier des fragments d'ADN par une succession de cycles thermiques. L'utilisation des deux types d'analyse PCR, Genre et Multiplex, a été nécessaire. En effet, deux espèces de *Sarcocystis* n'étaient pas recherchées par la PCR Multiplex. L'utilisation de la PCR Genre permettait donc d'effectuer une recherche plus large. La PCR Multiplex quant à elle nous permettait d'avoir un renseignement supplémentaire sur l'espèce impliquée.

Les protocoles des PCR Genre et Multiplex sont présentés en annexes 3 et 4.

➤ PCR Genre (annexe 4)

Cette étape débute par l'élaboration du Master Mix qui contient tous les réactifs nécessaires à la polymérisation à l'exception des échantillons d'extrait d'ADN. Ce mélange contient donc un tampon à base de chlorure de magnésium, environnement chimique optimal pour le fonctionnement de la polymérase, des amorces SARF (pour SAR Forward) et SARR (pour SAR Reverse) permettant l'hybridation, des acides désoxyribonucléiques (dNTP) nécessaires pour la polymérisation et une enzyme permettant d'assurer la polymérisation, la Taq polymerase, dont l'optimum de température est de 70 °C.

Les amorces SARF et SARR sont complémentaires des extrémités sens et anti-sens des brins d'ADN du parasite.

La préparation des échantillons se fait de la façon suivante : dans un tube à PCR, 20 µL de Master Mix sont mélangés à 5 µL d'échantillon à analyser, issu de l'étape d'extraction d'ADN. Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur (nous avons utilisé le iCycler de BIORAD®). Ce thermocycleur utilise l'effet Peltier pour permettre de placer les échantillons dans des conditions de températures différentes de façon successive. Le programme utilisé était le suivant :

- 4 minutes à 94 °C correspondant à l'étape d'initialisation de la PCR.
- Puis l'étape de dénaturation qui consiste en la succession de 40 fois le cycle d'amplification suivant
 - 1 minute à 94 °C : la dénaturation. Cette température permet la rupture des liaisons hydrogènes de la double hélice d'ADN. A l'issue de cette étape, on obtient de l'ADN simple brin.
 - 1 minute à 63 °C : l'hybridation des amorces par complémentarité avec l'ADN simple brin contenu dans les échantillons. La spécificité de la PCR est fortement dépendante de cette température. En effet, si la température est trop élevée, l'hybridation ne pourra pas se produire car il y aura destruction des liaisons hydrogène. En revanche, si la température est trop basse, la liaison pourrait être imparfaite.
 - 1 minute à 72 °C : l'élongation. Lors de cette étape, on se situe dans l'optimum de température de la Taq polymérase qui ajoute les nucléotides à partir de l'extrémité 3' des amorces.

A l'issue de ces 40 cycles, on obtient une amplification théoriquement exponentielle de la séquence que l'on souhaite amplifier.

- 10 minutes à 72 °C permettant l'élongation finale de l'ADN.
- Refroidissement et maintien à 14 °C en attendant la lecture des résultats.

L'étape suivante est la migration de l'ADN sur gel par électrophorèse.

➤ PCR Multiplex Touch down (annexe 3)

La PCR Multiplex permet la détermination des espèces de *Sarcocystis* présentes dans les échantillons. Nous avons réalisé une PCR Multiplex sur tous les échantillons afin de déterminer les espèces de *Sarcocystis* présentes.

La PCR Multiplex nécessite également la réalisation d'un Master Mix contenant les mêmes réactifs que dans la PCR Genre à l'exception des amorces qui sont différentes et spécifiques d'espèce. Nous avons donc utilisé une amorce reverse de *Sarcocystis spp.* (commune aux trois espèces de *Sarcocystis* étudiées) et trois amorces sens spécifiques de *S. cruzi*, *S. hominis* et *S. hirsuta*.

Les caractéristiques des amorces utilisées sont présentées dans le tableau IX.

Tableau IX : position des amorces et taille des amplicons obtenus par la PCR Multiplex Touch down

Amorces	Position des amorces	Taille des amorces
Amorces anti-sens	342-380	18 pb
Amorces de <i>S. hirsuta</i>	250-268	18 pb
Amorces de <i>S. hominis</i>	165-182	17 pb
Amorces de <i>S. cruzi</i>	50-74	24 pb

Dans le cas de notre étude, nous avons réalisé une PCR Touch down afin d'augmenter la spécificité de fixation des amorces. En effet, contrairement à une PCR classique pour laquelle la température d'hybridation est constante aux cours des cycles, la PCR Touch down débute avec des températures d'hybridation élevées permettant une fixation plus spécifique des amorces. Puis, au cours des cycles successifs, cette température d'hybridation diminue progressivement. Ainsi, on augmente la spécificité de fixation des amorces sur leur site de fixation sur l'ADN cible.

Les températures, les temps d'incubation ainsi que le nombre de cycles effectués dans le thermocycleur sont présentés en annexe 3.

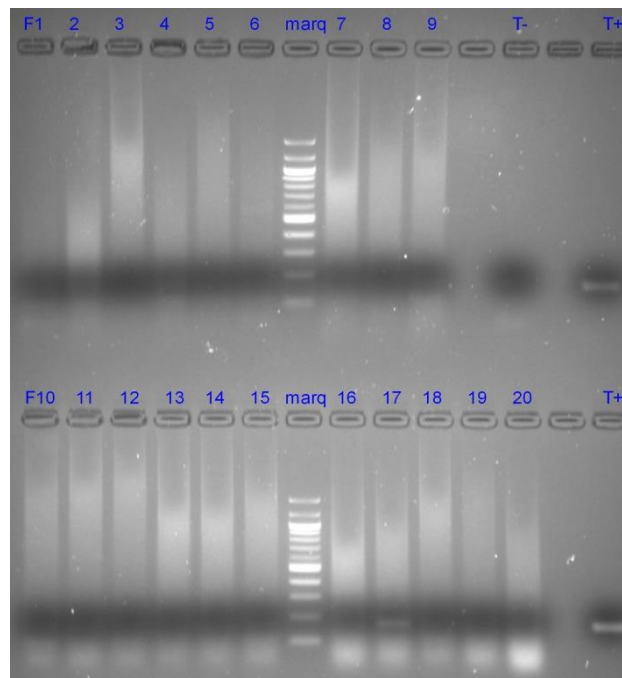
➤ Electrophorèse

La lecture des résultats, suite aux PCR, se faisait par migration des échantillons sur un gel d'agarose à 2,2 %. 20 µL de produit de PCR associés à 5 µL de solution de dépôt sont déposés dans chaque puits. Les gels sont ensuite placés dans les cuves d'électrophorèse contenant un tampon TBE (Tris Borate EDTA) 0,5 X. L'ADN étant chargé négativement, il migre sur le gel d'agarose grâce au courant électrique établi entre les deux électrodes de la cuve. Les résultats sont visualisés en lumière UV et transmis à l'ordinateur grâce à une caméra reliée à celui-ci. L'exploitation des gels se fait grâce au logiciel Quantity One®. Un résultat est positif si la bande migre entre 100 et 300 paires de base (tableau X).

Tableau X : Taille des amplicons obtenus par les PCR Genre et les PCR Multiplex Touch down

PCR Genre	<i>Sarcocystis spp</i>	164 pb
PCR Multiplex	<i>Sarcocystis hirsuta</i>	108 pb
	<i>Sarcocystis hominis</i>	182 pb
	<i>Sarcocystis cruzi</i>	284 pb

Un marqueur de poids moléculaire espacé toutes les 100 paires de base placé sur chaque ligne de chaque gel fournit une échelle pour la lecture des bandes. Un exemple de gel de PCR Genre est placé en figure 8.



Gel du 30/05/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
F1	Négatif	F12	Négatif
F2	Négatif	F13	Négatif
F3	Négatif	F14	Négatif
F4	Négatif	F15	Négatif
F5	Négatif	F16	Négatif
F6	Négatif	F17	Positif <i>Sarcocystis</i>
F7	Négatif	F18	Négatif
F8	Négatif	F19	Négatif
F9	Négatif	F20	Négatif
F10	Négatif	T+	Positif
F11	Négatif	T-	Négatif

Figure 8 :
Exemple de gel de PCR Genre réalisé sur les échantillons de fœtus et de son tableau d'interprétation

Pour chaque PCR Genre, un témoin positif de *Sarcocystis* provenant de clones issus de plasmides intégrés à des *E. coli* permet de vérifier le bon fonctionnement de cette étape du protocole. Un témoin négatif constitué d'eau déminéralisée autoclavée permettait de vérifier l'absence de contamination au cours de cette étape.

Un exemple de gel de PCR Multiplex est présenté en figure 9.

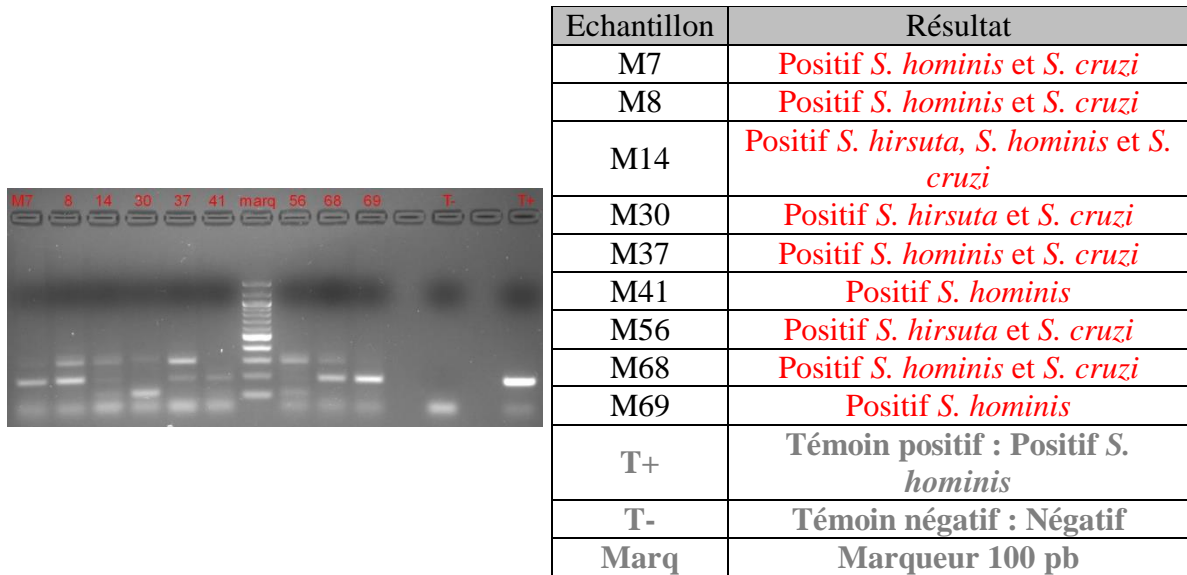


Figure 9 :
Exemple de gel de PCR Multiplex Touch down réalisé sur les échantillons de mères et de son tableau d'interprétation

Pour les PCR Multiplex, les témoins positifs étaient des extraits de *Sarcocystis hominis* provenant également de clones réalisés à partir de plasmide et à l'aide d'*E. coli*.

L'ensemble des résultats des PCR Multiplex des mères, des fœtus et des placentas est présenté en annexe 5.

2.3. Etude statistique

Pour chaque paramètre à notre disposition et pouvant avoir un effet sur la transmission transplacentaire (âges et races des mères, stades de gestation, espèces de *Sarcocystis*) nous avons réalisé des tests statistiques à l'aide du logiciel R[®].

Ainsi, pour étudier l'effet potentiel des races des mères, du stade de gestation et de l'espèce de *Sarcocystis* sur la transmission transplacentaire, nous avons effectué des tests exacts de Fisher. Ce test nous permet de comparer les données lors d'analyses croisant deux variables explicatives qualitatives à deux modalités. Si la p-value obtenue à ce test est inférieure à 0,05, il existe une relation significative.

Pour les variables explicatives quantitatives telles que l'âge des mères, nous avons tout d'abord réalisé des tests de comparaison de variance. Si la p-value obtenue à l'issue de ce test est supérieure à 0,05, les variances sont considérées comme égales. Nous avons ensuite effectué un test de Shapiro-Wilk permettant de vérifier que les distributions suivent une loi normale, condition également indispensable à l'utilisation d'un test de Student. Si la p-value obtenue à ce test est supérieure à 0,05, les distributions suivent une loi normale. Dans le cas où l'égalité des variances ou la normalité des distributions ne sont pas vérifiées, un test de Mann-Whitney-Wilcoxon est réalisé à la place du test de Student. Dans les deux cas, si la p-value obtenue est supérieure à 0,05, les deux lots comparés sont considérés comme équivalents.

Enfin, pour étudier s'il existe des associations d'espèces de *Sarcocystis* privilégiées chez les mères, nous avons effectué un test de proportion (ou prop.test dans R[®]). En effet, ce test permet de comparer une proportion théorique (prévalence théorique calculée à partir des prévalences de chaque espèce de parasites) et une proportion observée (prévalence d'association d'espèces observée lors de nos analyses). Si la p-value obtenue à ce test est supérieure à 0,05, les deux prévalences étudiées (prévalence théorique et prévalence réelle) sont considérées comme équivalentes.

3. Résultats

L'annexe 5 présente les résultats des électrophorèses après analyses par PCR Multiplex et un tableau récapitulatif regroupant l'ensemble des résultats obtenus en PCR Genre et Multiplex est situé en annexe 6.

3.1. Caractéristiques des animaux prélevés

La répartition de l'âge des fœtus est présentée dans la figure 10.

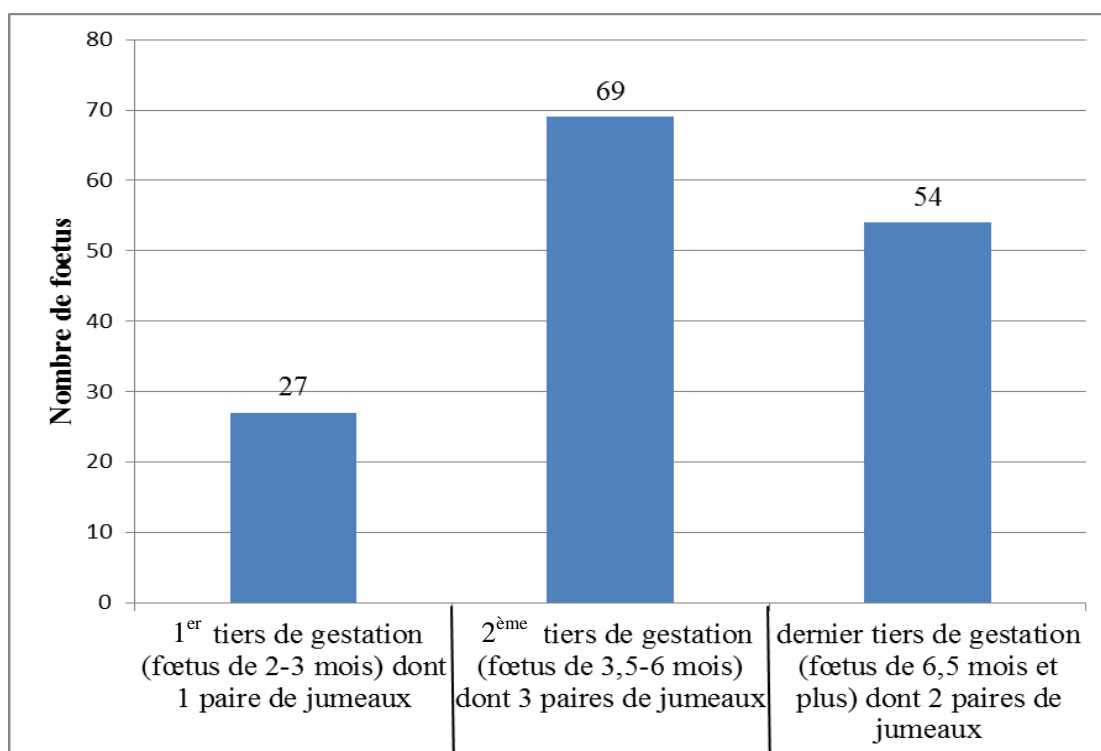


Figure 10 :
Répartition des âges des fœtus prélevés

La répartition des races et des âges des mères prélevées est présentée en figures 11 et 12. Nous avons eu accès aux informations concernant 140 des 144 mères faisant parties de l'étude.

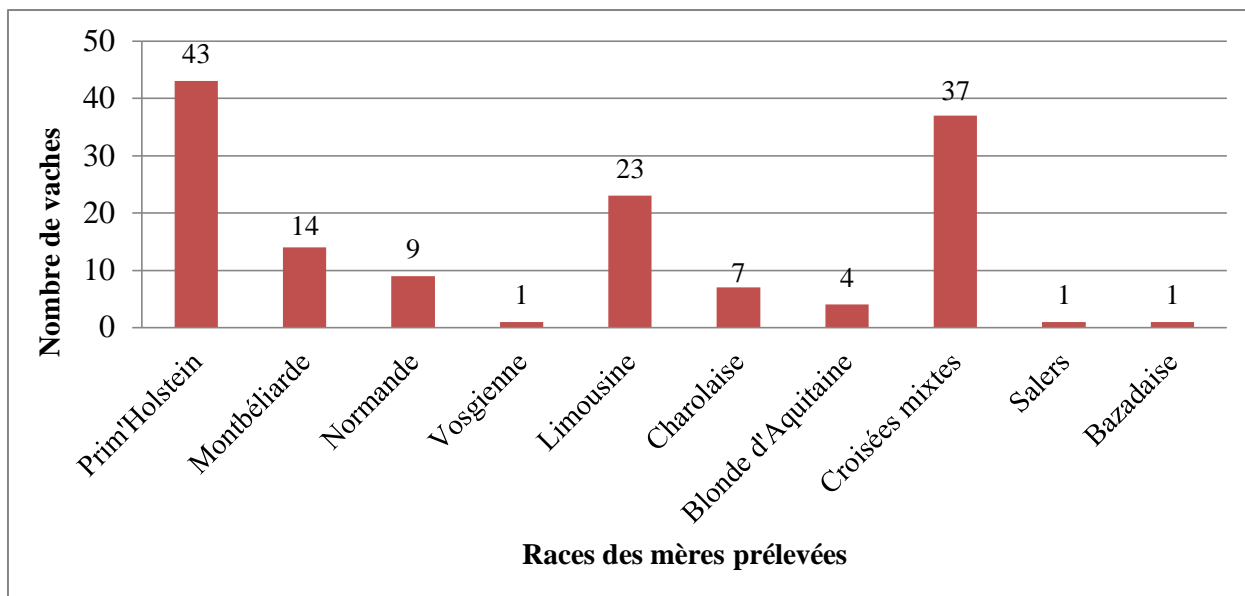


Figure 11 :
Répartition des races des mères prélevées

Les races Prim'holstein, Limousine, Montbéliarde ainsi que les Croisées mixtes sont majoritaires.

Les mères prélevées ont des âges très différents allant de 23 mois à 206 mois (figure 12).

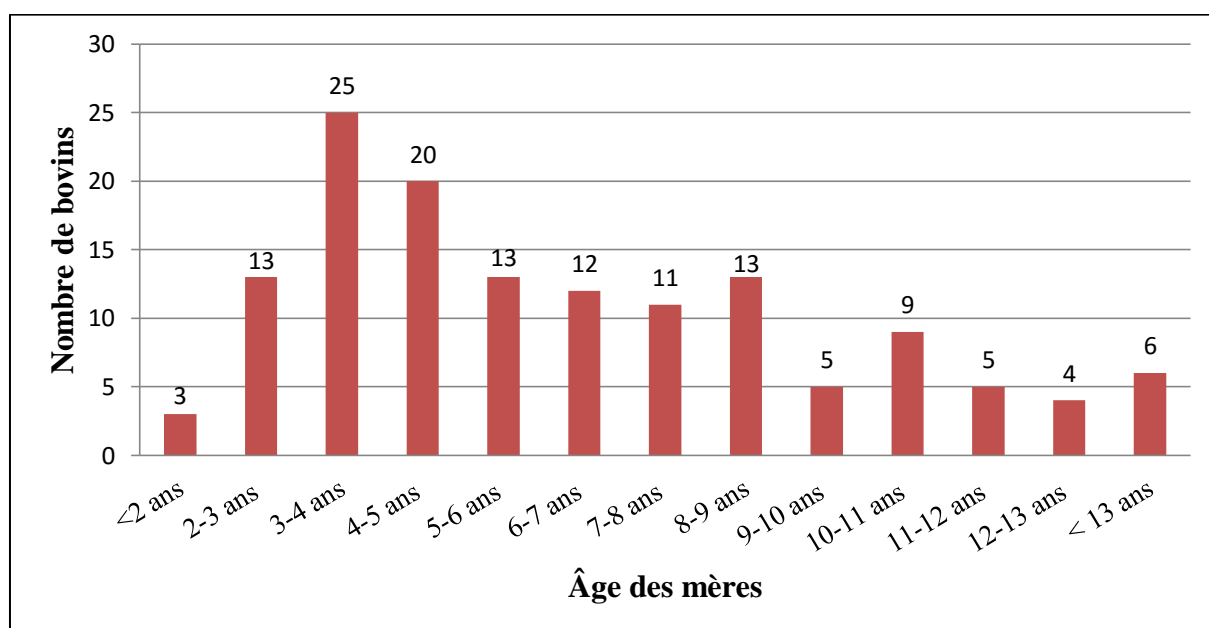


Figure 12 :
Répartition des âges des mères prélevées

3.2. Etude des résultats des analyses moléculaires

3.2.1. Prévalence de la sarcosporidiose chez les mères

3.2.1.1. Prévalence de la sarcosporidiose toutes espèces confondues chez les mères

Au cours de notre étude, 140 mères ont fait l'objet d'analyses moléculaires.

Nous avons obtenu une **prévalence** de la sarcosporidiose chez les mères de **93,6 %** (soit 131 mères positives pour *Sarcocystis* sur les 140 analysées). De plus, les résultats obtenus entre PCR Genre et PCR Multiplex ont été concordants.

La prévalence obtenue est très élevée, proche de 100 %. Les parasites semblent donc très présents dans le Grand Ouest. Il semble également que la localisation du prélèvement chez les mères, au niveau du caparaçon, assure une bonne mise en évidence des parasites.

L'utilisation de PCR Multiplex nous a permis d'avoir des informations supplémentaires concernant les espèces de *Sarcocystis* impliquées dans les infections (partie 3.2.1.2.).

3.2.1.2. Prévalence de la sarcosporidiose par espèce chez les mères

Le tableau XI regroupe l'ensemble des résultats obtenus par PCR Multiplex Touch down sur les échantillons de mères.

Tableau XI : Prévalence de la sarcosporidiose en fonction des espèces chez les mères (n=140)

Espèce de <i>Sarcocystis</i>	Positifs	Prévalence
<i>S. cruzi</i> seul	15	10,7 %
<i>S. hominis</i> seul	36	25,7 %
<i>S. hirsuta</i> seul	1	0,7 %
<i>S. cruzi</i> + <i>S. hominis</i>	67	47,9 %
<i>S. cruzi</i> + <i>S. hirsuta</i>	5	3,6 %
<i>S. hominis</i> + <i>S. hirsuta</i>	0	0 %
<i>S. cruzi</i> + <i>S. hominis</i> + <i>S. hirsuta</i>	5	3,6 %
Total <i>S. cruzi</i>	92	65,7 %
Total <i>S. hominis</i>	108	77,1 %
Total <i>S. hirsuta</i>	11	7,9 %

L'ensemble des trois espèces de *Sarcocystis* recherchées par la PCR Multiplex est présent au sein de nos échantillons de mères. Cependant il apparaît que *S. hominis* et *S. cruzi* sont les espèces les plus représentées, alors que *S. hirsuta* n'est présent que dans 11 échantillons sur les 140 analysés.

Les infections mixtes à *S. cruzi* et *S. hominis* sont les plus fréquentes (47,9 % des cas).

3.2.1.3. Existence d'associations privilégiées d'espèces de *Sarcocystis* chez les mères

L'étude des prévalences (tableau XI) nous a permis de constater que les mères prélevées présentaient souvent des infections mixtes, à deux voire à trois parasites. Nous avons donc cherché à estimer s'il existait des associations d'espèces privilégiées parasitant les bovins. Pour cela, nous avons comparé les prévalences théoriques (calculées à partir des prévalences totales de chaque espèce), aux prévalences réelles (déterminées par les résultats des analyses moléculaires suite au dénombrement des infections mixtes). Les résultats sont présentés dans le tableau XII.

Tableau XII : Comparaison des prévalences théoriques et des prévalences réelles concernant les différentes combinaisons possibles d'espèces de *Sarcocystis*

Combinaisons d'espèce de <i>Sarcocystis</i>	Prévalence théorique	Prévalence réelle	p-values (prop.test sur R [®])
<i>S. cruzi</i> + <i>S. hominis</i>	0,47	0,48	0,981
<i>S. cruzi</i> + <i>S. hirsuta</i>	0,008	0,036	0,239
<i>S. hominis</i> + <i>S. hirsuta</i>	0,02	0	0,279
<i>S. cruzi</i> + <i>S. hominis</i> + <i>S. hirsuta</i>	0,04	0,036	1

Les p-values étant toutes supérieures à 0,05 (tableau XII), il n'existe pas d'association privilégiée de parasite chez les bovins adultes.

3.2.1.4. Prévalence de la sarcosporidiose chez les mères en fonction des types raciaux

Afin d'étudier la prévalence de la sarcosporidiose chez les mères en fonction des races, nous avons regroupé les différentes races en trois groupes représentant les trois types raciaux retrouvés dans les élevages bovins : allaitant, mixte, laitier. Ce regroupement nous a permis d'avoir des échantillons de taille plus importante et d'obtenir ainsi des prévalences plus comparables.

Ainsi, dans notre étude le type racial :

- « allaitant » regroupe les races Salers, Bazadaise, Limousine, Charolaise et Blonde d'Aquitaine
- « mixte » regroupe les races Montbéliarde, Normande et Croisées mixtes
- « laitier » est représenté par la race Prim'holstein

Les résultats de ces regroupements sont représentés en figure 13.

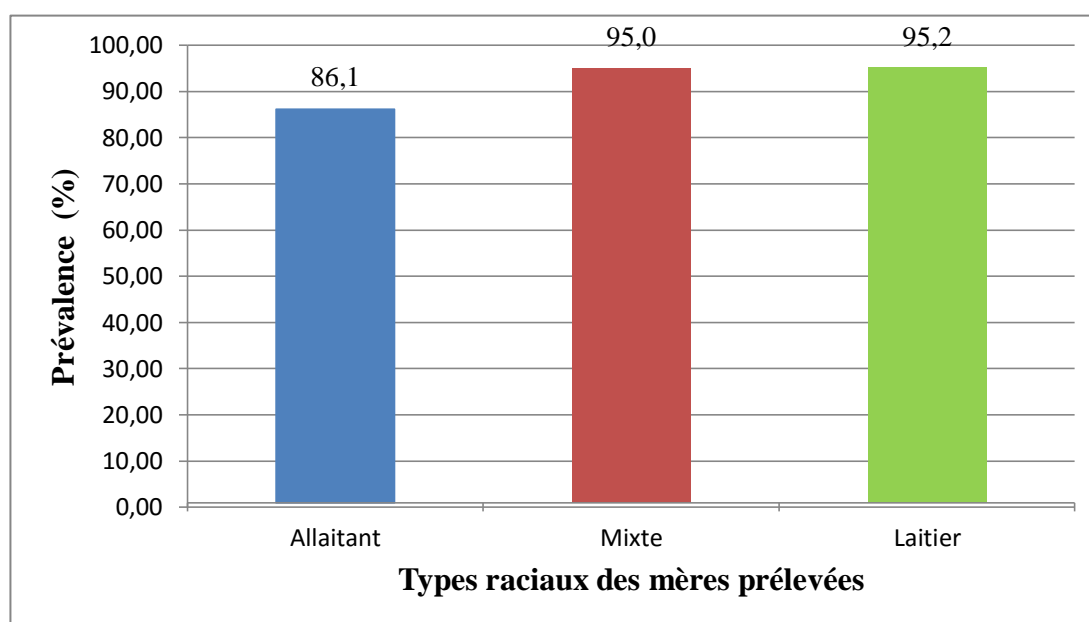


Figure 13 :
Prévalence de la sarcosporidiose en fonction des types raciaux des mères prélevées

Les différences de prévalence de la sarcosporidiose observées entre les types raciaux laitier et mixte ne sont pas significatives (p-value=1).

En revanche, les vaches allaitantes présentent une prévalence plus faible. En comparant les deux types raciaux allaitant et laitier à l'aide d'un test de Fisher, nous obtenons une p-value de 0,147 : il n'existe donc pas de différence significative de prévalence entre les types raciaux. Nous obtenons les mêmes conclusions en associant les types raciaux laitier et mixte (afin d'avoir des effectifs plus conséquents) et en les comparant au type allaitant (p-value = 0,78).

Les valeurs de prévalence entre les différents types raciaux concernant chaque espèce de *Sarcocystis* testée avec la PCR Multiplex sont présentées en figure 14.

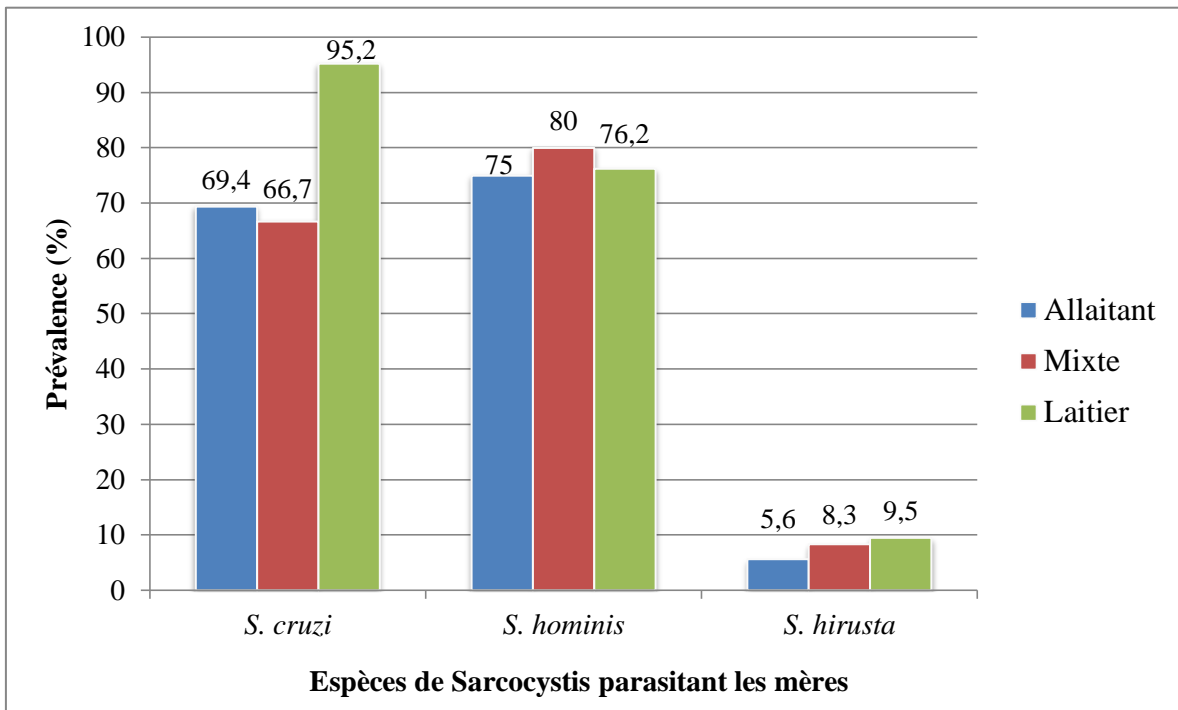


Figure 14 :

Prévalence des différentes espèces de *Sarcocystis* en fonction des types raciaux des mères

Il n'y a pas de différence significative entre les différents types raciaux et l'infection par les espèces *Sarcocystis hominis* et *Sarcocystis hirsuta* (p-values > 0,06).

En revanche, il semble que les races laitières présentent un portage plus important de *S. cruzi* que les races mixtes et allaitantes. Les types raciaux ont été comparés deux à deux grâce à un test exact de Fisher (tableau XIII).

Tableau XIII : p-values obtenues par comparaison des types raciaux quant à la prévalence pour *S. cruzi* (test exact de Fisher)

TYPES RACIAUX	Mixte (prévalence de 66,7 %)	Laitier (prévalence de 94,2 %)
Allaitant (prévalence de 69,4 %)	0,83	0,0045
Mixte		0,0004

Les races laitières (la race Prim'Holstein dans notre étude) ont donc un portage de *S. cruzi* significativement plus important que les races mixtes et allaitantes.

3.2.2. Prévalence de la sarcosporidiose chez les fœtus

3.2.2.1. Prévalence de la sarcosporidiose toutes espèces confondues chez les fœtus

Cent cinquante fœtus ont fait l'objet d'analyses moléculaires. Les résultats obtenus entre PCR Genre et PCR Multiplex étaient légèrement différents mais dans le même ordre de grandeur et non discordants (tableau XIV).

Tableau XIV : Prévalence de l'infection par *Sarcocystis* toutes espèces confondues chez les fœtus

Analyses moléculaires		Nombre de fœtus	Prévalence
Total		150	-
PCR Genre	Positifs	12	8%
	Négatifs	138	
PCR Multiplex	Positifs	10 (faisant partie des 12 fœtus positifs en PCR Genre)	6,7 %
	Négatifs	140	

Ainsi, les analyses effectuées permettent d'affirmer qu'il existe bien une transmission transplacentaire de la sarcosporidiose chez les bovins car 12 fœtus sont positifs par analyses PCR.

La prévalence obtenue pour les fœtus (8 %) est nettement inférieure à celle obtenue pour les mères (93,6 %). Cette faible prévalence chez les fœtus ne peut donc pas expliquer à elle seule la forte prévalence observée chez les mères, même si la transmission verticale participe au maintien de l'infection au sein de la population bovine.

3.2.2.2. Prévalence de la sarcosporidiose par espèce chez les fœtus

Douze fœtus se sont révélés positifs pour *Sarcocystis* suite aux analyses par PCR Genre mais seulement dix de ces douze fœtus sont apparus positifs en PCR Multiplex. Pour ces dix fœtus positifs, la PCR Multiplex nous a permis d'avoir une information supplémentaire concernant l'espèce de *Sarcocystis* infectant les fœtus. Les résultats des PCR Multiplex sont reportés dans le tableau XV.

Tableau XV : Prévalence de la sarcosporidiose en fonction des espèces chez les fœtus

Espèce de <i>Sarcocystis</i>	Positifs	Négatifs	Prévalence
<i>S. cruzi</i> seul	2	148	1,33 %
<i>S. hominis</i> seul	8	142	5,3 %
<i>S. hirsuta</i> seul	0	150	0 %

Les fœtus positifs sont parasités par *S. hominis* et *S. cruzi* uniquement. *S. hominis* est l'espèce la plus fréquemment retrouvée chez les fœtus, ce qui a également été le cas lors de l'analyse des échantillons de muscles de mères. Aucune infection multiple ni aucune infection par *S. hirsuta* n'a été observée chez les fœtus.

3.2.2.3. Transmission de *Sarcocystis* aux fœtus lors de jumeauté

Au cours de notre étude, nous avons prélevé six paires de jumeaux. Nous avons donc cherché à voir si des jumeaux possédaient le même statut vis-à-vis de l'infection par le parasite. Les résultats des analyses PCR réalisées sur les jumeaux sont présentés dans le tableau XVI.

Tableau XVI : Résultats des PCR Multiplex concernant les jumeaux

Jumeaux	Numéros des fœtus	Résultats PCR
Jumeaux 1	F15 F15'	Négatif Négatif
Jumeaux 2	F54 F55	Positif <i>S. cruzi</i> Négatif
Jumeaux 3	F75 F76	Négatif Négatif
Jumeaux 4	F96 F97	Positif <i>Sarcocystis</i> Négatif
Jumeaux 5	F100 F101	Négatif Négatif
Jumeaux 6	F134 F135	Négatif Négatif

Deux fœtus appartenant à deux paires de jumeaux différents sont positifs l'un pour *Sarcocystis cruzi* et l'autre pour le genre *Sarcocystis*. Cependant, leurs jumeaux respectifs ne sont pas positifs en PCR Genre ni en PCR Multiplex.

Ainsi, il semble que le parasite ne se répartisse pas de façon uniforme chez les jumeaux. Cependant, ce constat est à nuancer car l'effectif étudié reste faible. De plus, nous n'avons prélevé que 200 g de muscles sur chaque fœtus, il se peut que, bien que le parasite ne soit pas présent dans ces 200 g, il le soit dans d'autres muscles non prélevés et donc non analysés.

3.2.2.4. Concordance entre l'espèce de *Sarcocystis* présente chez les mères et l'espèce retrouvée chez les fœtus positifs

La comparaison de la concordance entre les espèces présentes chez les mères avec les espèces retrouvées chez les fœtus est présentée dans le tableau XVII.

Tableau XVII : Comparaison des espèces de *Sarcocystis* retrouvées chez les fœtus et chez leurs mères respectives

Numéro de la mère	Résultats PCR mères	Numéro du fœtus	Résultats PCR fœtus	Concordance
M5	<i>S. cruzi</i> <i>S. hominis</i>	F5	<i>S. hominis</i>	Oui
M17	<i>S. cruzi</i> <i>S. hominis</i>	F17	<i>Sarcocystis</i>	-
M18	<i>S. cruzi</i> <i>S. hominis</i>	F18	<i>S. hominis</i>	Oui
M27	Négatif	F27	<i>S. cruzi</i>	Non
M35	<i>S. hominis</i>	F35	<i>S. hominis</i>	Oui
M38	<i>S. hominis</i>	F38	<i>S. hominis</i>	Oui
M54	<i>S. cruzi</i> <i>S. hominis</i>	F54	<i>S. cruzi</i>	Oui
M75	<i>S. cruzi</i>	F76	<i>Sarcocystis</i>	-
M90	<i>S. cruzi</i> <i>S. hominis</i>	F90	<i>S. hominis</i>	Oui
M106	<i>S. cruzi</i>	F106	<i>S. hominis</i>	Non
M108	<i>S. cruzi</i> <i>S. hirsuta</i>	F108	<i>S. hominis</i>	Non
M120	<i>S. cruzi</i> <i>S. hominis</i>	F120	<i>S. hominis</i>	Oui

Sur les dix fœtus pour lesquels la comparaison a été possible, sept possèdent des espèces qui étaient également présentes chez leurs mères. Or, il ne semble pas possible qu'un fœtus se parasite avec une espèce différente de celle de sa mère puisqu'il s'agit de la seule source possible de contamination.

Ainsi, ce manque de concordance chez 30 % des fœtus positifs nous amène à nous interroger sur la fiabilité des résultats de la PCR (il existe peut-être des faux négatifs, les faux positifs semblent moins probables vu la spécificité de la méthode PCR) ou sur la pertinence des échantillons prélevés (lieu de prélèvement des échantillons de mères et des fœtus ayant servi aux analyses). Nous pouvons également envisager que suite à son transit par voie sanguine, le parasite se fixe uniquement dans les muscles du fœtus et non dans ceux de la mère, mais cette hypothèse nous semble peu probable.

3.2.3. Prévalence de la sarcosporidiose dans le placenta

Sur les 142 placentas analysés en PCR Genre et en PCR Multiplex, seulement deux sont apparus positifs en PCR Genre. Nous avons donc obtenu une prévalence de 1,4 %. Cette prévalence est très faible mais indique toutefois que *Sarcocystis* peut être retrouvé occasionnellement dans le placenta et donc dans la délivrance au moment de la mise bas.

Bilan

Pour les échantillons de muscles de **mères** :

- ✓ La sarcosporidiose bovine touche **93,6 %** des mères prélevées, dont aucune n'a été saisie pour myosite éosinophilique.
- ✓ *S. hominis* est l'espèce la plus présente, suivi de *S. cruzi* avec des prévalences de 77,1 % et 65,7 % respectivement. L'infection par *S. hirsuta* est rare (7,9 %).
- ✓ Les infections mixtes à *S. cruzi* et *S. hominis* sont logiquement fréquentes sans qu'aucune association privilégiée n'ait été mise en évidence.
- ✓ Les races laitières ont un portage significativement plus fréquent pour *S. cruzi* que les autres races.

Pour les échantillons de muscles de **fœtus** :

- ✓ Il existe **une transmission transplacentaire** de la sarcosporidiose chez les bovins.
- ✓ La prévalence est très faible comparée à celle des mères : **8% contre 93,6 %**.
- ✓ *S. hominis* est le plus fréquemment retrouvé, dans 5,3 % des cas contre 1,3 % pour *S. cruzi*. *S. hirsuta* n'a pas été mise en évidence chez les fœtus.
- ✓ Il ne semble pas y avoir de répartition homogène du parasite chez les jumeaux.

Pour les échantillons de **placentas** :

- ✓ **1,4 %** des placentas présentent un portage de *Sarcocystis*.
- ✓ Aucune espèce précise n'a pu être identifiée.

3.3. Relation entre transmission transplacentaire et âge des mères

La traçabilité mise en place dans les abattoirs nous a permis de connaître l'âge des mères prélevées. Le but de cette partie est d'établir s'il existe un lien entre la transmission transplacentaire de la sarcosporidiose chez les bovins et l'âge des mères. En effet, nous pouvons supposer que le risque de transmission transplacentaire pourrait être plus important chez des mères jeunes pour lesquelles l'immunité contre *Sarcocystis* ne serait pas encore en place et permettrait au parasite de se transmettre au fœtus après dissémination par voie sanguine.

La figure 15 représente la relation entre l'âge des mères et la transmission du parasite à leur fœtus. Pour réaliser ce graphique nous n'avons conservé dans nos données que les mères positives pour *Sarcocystis* et nous avons exclu les mères négatives.

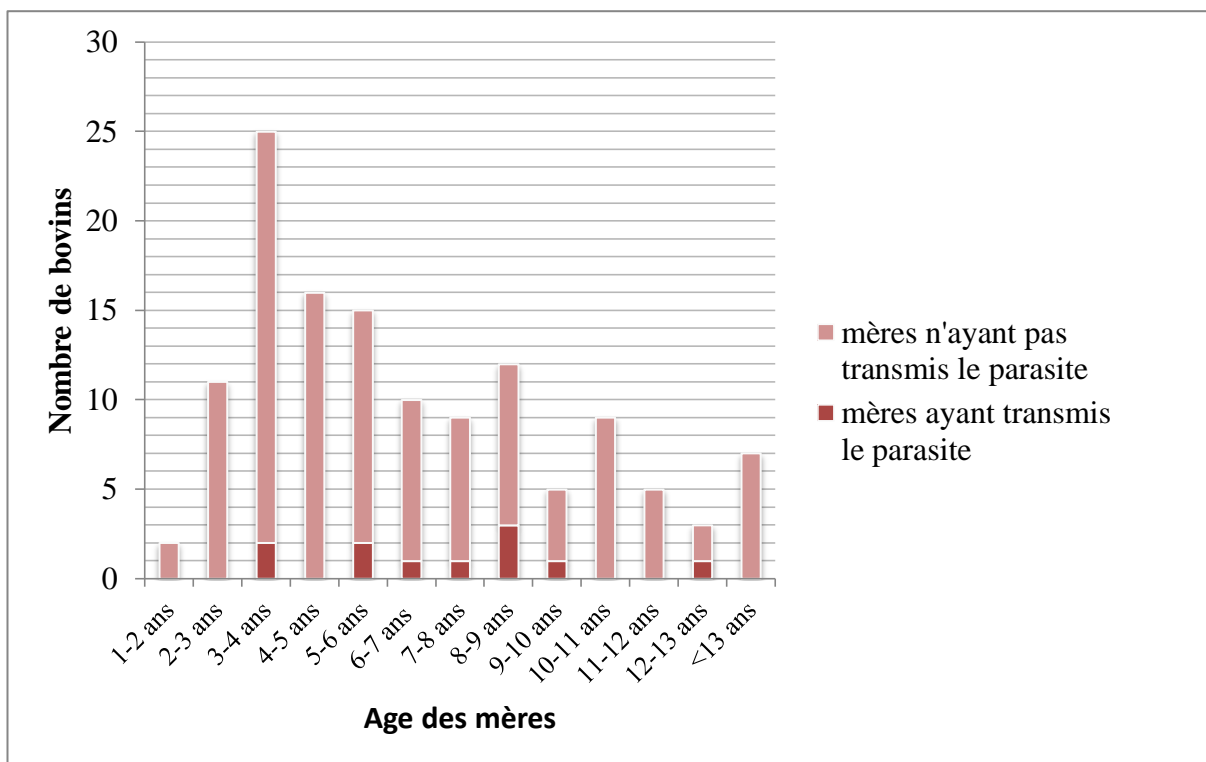


Figure 15 :
Relation entre l'âge des mères et la transmission du parasite à leurs fœtus

Il ne semble pas qu'il y ait une relation entre l'âge des mères et la transmission du parasite aux fœtus.

Afin de comparer l'âge des mères positives pour *Sarcocystis* ayant transmis le parasite à leurs fœtus à l'âge des mères positives pour *Sarcocystis* n'ayant pas transmis le parasite à leurs fœtus, nous avons réalisé un test F de comparaison des variances pour lequel nous avons trouvé une p-value de 0,51. Les variances sont donc considérées comme égales. La p-value obtenue avec le test de Shapiro-Wilk est de $8,05 \times 10^{-7}$ pour les mères n'ayant pas transmis le parasite à leurs fœtus, nous rejetons donc l'hypothèse que l'âge des mères suit une loi normale. En effectuant alors un test de Wilcoxon, nous obtenons une p-value de 0,58.

Les âges des mères positives pour *Sarcocystis* ayant transmis le parasite à leurs fœtus et ceux des mères positives pour *Sarcocystis* n'ayant pas transmis le parasite à leurs fœtus sont donc similaires. Nous avons obtenu une moyenne de 81 mois pour les mères positives pour *Sarcocystis* ayant pas transmis le parasite à leurs fœtus et de 78 mois pour les mères positives n'ayant transmis le parasite à leur fœtus (figure 16).

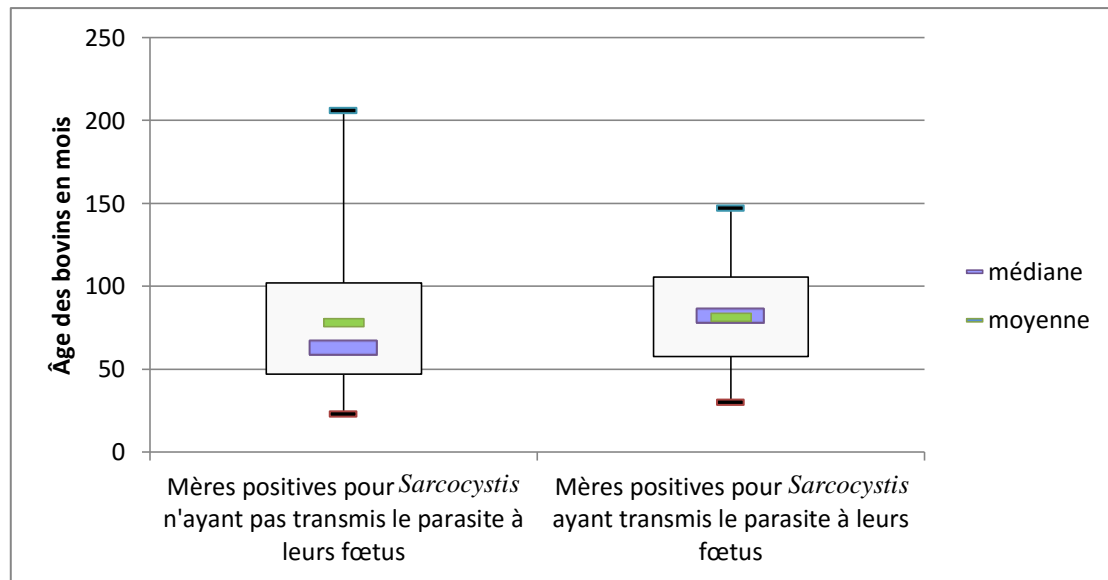


Figure 16 :
Boîte de dispersion de l'âge des mères positives pour *Sarcocystis* ayant transmis le parasite à leurs fœtus et celles positives pour *Sarcocystis* mais n'ayant pas transmis le parasite à leurs fœtus

L'âge des mères positives pour *Sarcocystis* ayant transmis le parasite aux fœtus n'est donc pas significativement différent de celui des mères n'ayant pas transmis le parasite.

3.4. Relation entre transmission transplacentaire et stade de gestation

Les fœtus dans le dernier tiers de gestation sont plus longtemps en contact avec leur mère notamment vis-à-vis des échanges sanguins, que les fœtus dans le premier et le deuxième tiers de gestation. Ainsi, nous pouvons supposer que ces fœtus plus âgés seraient plus à risque de contracter une sarcosporidiose.

La répartition des fœtus positifs en fonction du stade de gestation est représentée sur la figure 17.

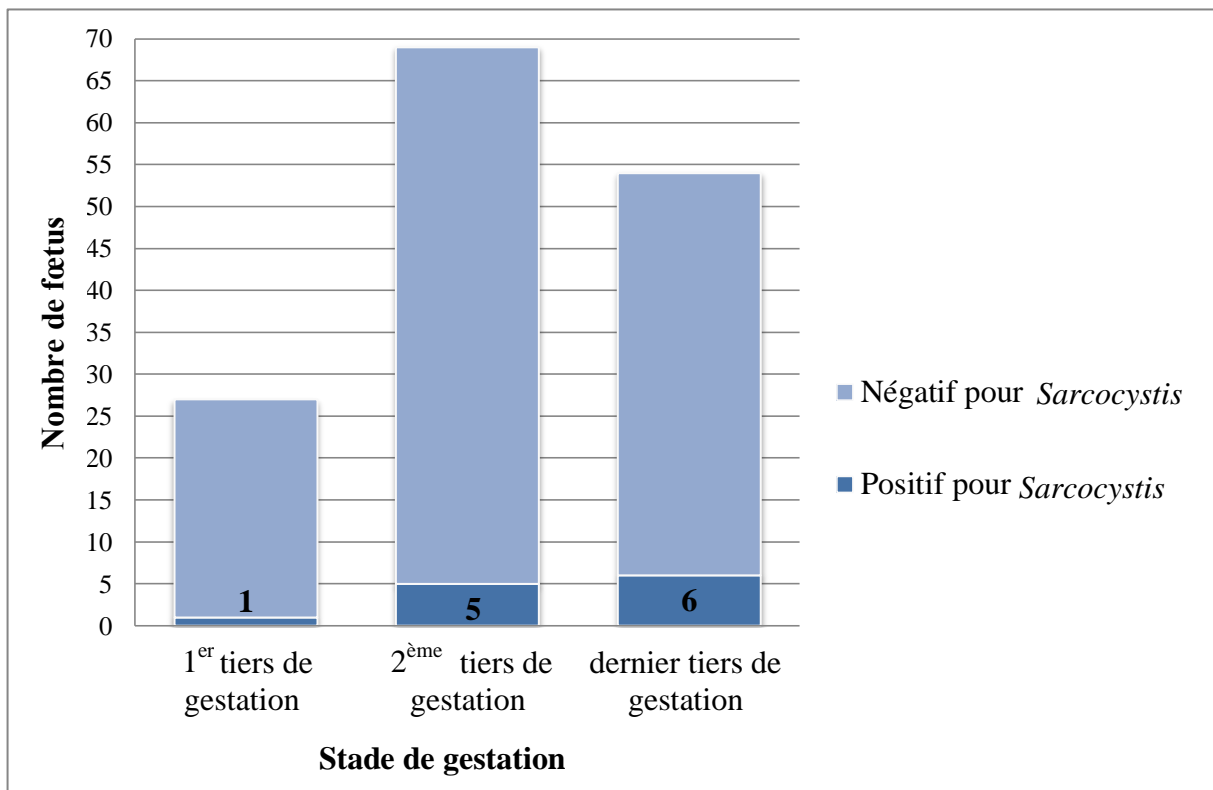


Figure 17 :
Relation entre le stade de gestation et la transmission de *Sarcocystis* aux fœtus

Nous avons obtenu plus de fœtus positifs pour *Sarcocystis* dans le deuxième et le dernier tiers de gestation que dans le premier tiers de gestation.

Afin d'étudier la relation entre le stade de gestation et la transmission de *Sarcocystis* aux fœtus, nous avons réalisé un test exact de Fisher en comparant les stades de gestation deux à deux. Les p-values obtenues à l'issue de ce test sont présentées dans le tableau XIII.

Tableau XVIII : p-values obtenues par comparaison des stades de gestation deux à deux quant aux cas de transmission transplacentaire (test exact de Fisher)

Stades de gestation	2 ^{ème} tiers de gestation Prévalence = 7,2 %	Dernier tiers de gestation Prévalence = 11,1 %
1 ^{er} tiers de gestation Prévalence = 3,7 %	1	0,41
2 ^{ème} tiers de gestation		0,53

Les p-values sont toutes supérieures à 0,05, le stade de gestation n'a donc pas d'influence significative sur la transmission du parasite.

3.5. Relation entre transmission transplacentaire et race de la mère

Nous cherchons ici à étudier si une race de vache pourrait être prédisposée pour la transmission transplacentaire de *Sarcocystis*.

La figure 18 présente la répartition des fœtus positifs en fonction de la race de leurs mères.

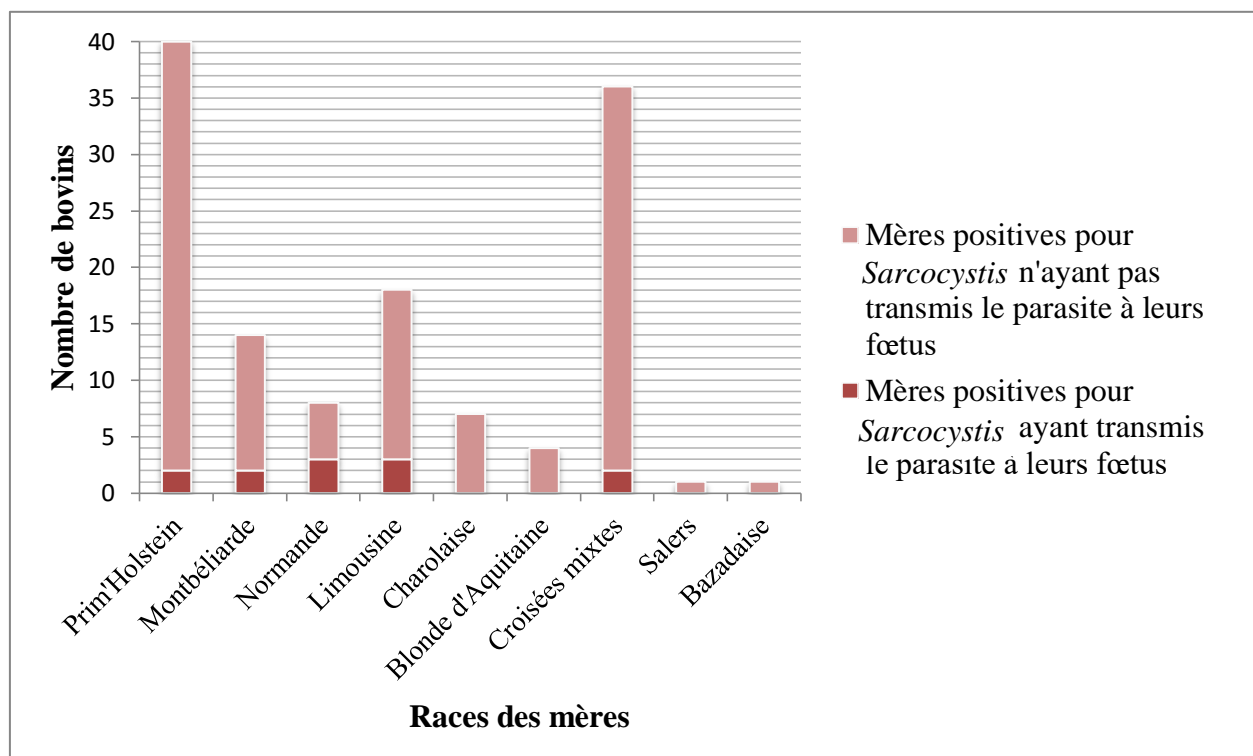


Figure 18 :
Relation entre la transmission transplacentaire de *Sarcocystis* et la race des mères

Des tests exacts de Fisher ont été réalisés à l'aide du logiciel R[®] afin de rechercher s'il existait une race présentant significativement plus de transmissions transplacentaires que les autres. Les résultats des p-values obtenues sont présentés dans le tableau XIX. Les races

Bazadaise et Salers n'ayant pas présenté de fœtus positifs pour *Sarcocystis*, elles n'ont pas été intégrées dans le tableau XIX.

Tableau XIX : p-values obtenues par comparaison des races de vaches entre elles avec les cas de transmissions transplacentaires (Test exact de Fisher)

RACES	Montbéliarde Prévalence = 14,3 %	Normande Prévalence = 37,5 %	Limousine Prévalence = 16,6 %	Croisées mixtes Prévalence = 5,5 %
Prim'Holstein Prévalence = 5 %	0,274	0,027	0,167	1
Montbéliarde		0,309	1	0,31
Normande			0,33	0,035
Limousine				0,319

La race Normande semble transmettre de façon plus fréquente le parasite que les races Prim'Holstein et Croisées mixtes (qui sont les deux races les plus représentées dans notre étude par ailleurs). Cependant, les effectifs étudiés restent faibles puisque nous n'avons dans notre étude que 8 vaches normandes, ce qui ne permet pas de conclure de façon certaine. Il serait intéressant à l'avenir d'étudier la transmission transplacentaire de la sarcosporidiose dans la race Normande en utilisant des effectifs plus importants mais également dans la race Blonde d'Aquitaine car seulement 4 vaches sont intégrées à cette étude. Or nous savons que cette race est prédisposée pour l'apparition des lésions de myosite éosinophilique, nous pouvons supposer que c'est également le cas pour la transmission verticale.

En regroupant les races en trois types raciaux comme nous l'avons fait dans la partie 3.2.1.4., nous obtenons la figure 19.

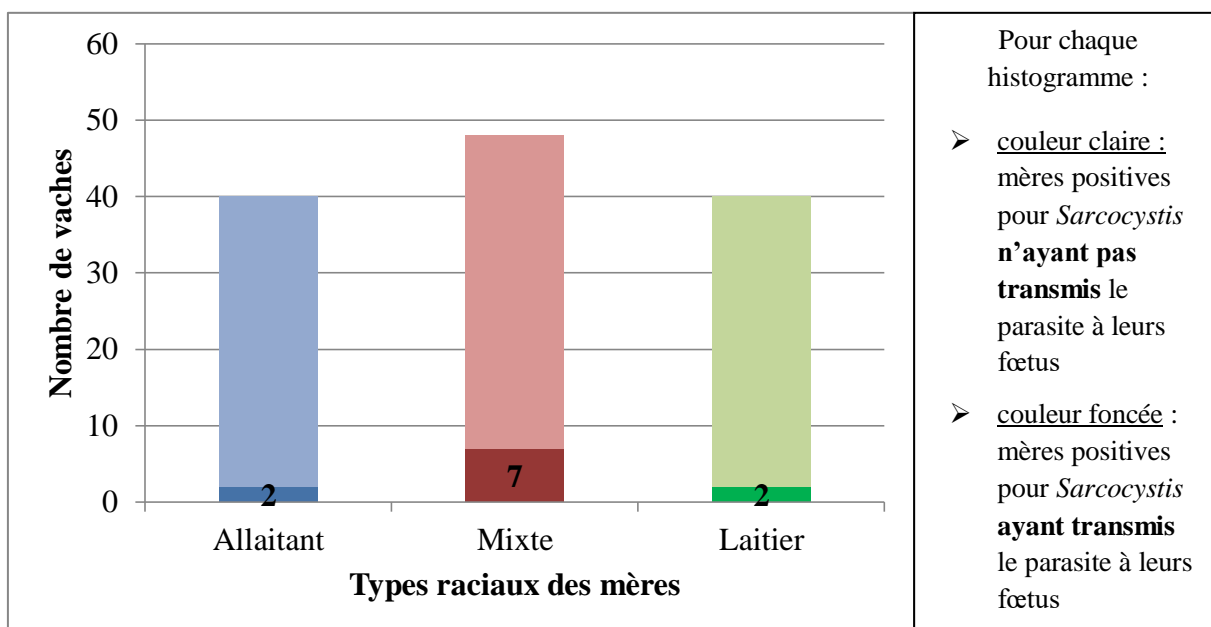


Figure 19 : Relation entre la transmission transplacentaire de *Sarcocystis* et type racial des mères

Les races mixtes ont présenté une fréquence de transmission transplacentaire de *Sarcocystis* plus importante que les races allaitantes et laitières. Les résultats des exacts tests de Fisher sont présentés dans le tableau XXI.

Tableau XXI : p-values obtenues par comparaison des types raciaux des mères avec les cas de transmissions transplacentaires

TYPE DE VACHES	Laitières Prévalence = 5 %	Mixtes Prévalence = 17,1 %
Allaitantes Prévalence = 5 %	0,692	0,167
Laitières		0,302

Il n'existe pas de différence significative entre les trois types raciaux. En effectuant un regroupement entre les types raciaux lait et mixte afin d'avoir des effectifs plus importants et en comparant avec le type racial allaitant, nous obtenons une p-value de 1. Même en effectuant un regroupement, il n'existe pas de différence significative.

Il n'existe donc pas de différence significative à l'échelle des types raciaux.

3.6. Relation entre transmission transplacentaire et espèce de *Sarcocystis* parasitant les mères

Nous cherchons ici à établir si l'une des trois espèces de *Sarcocystis* étudiées serait plus impliquée dans la transmission transplacentaire que les autres. Le tableau XXII présente une comparaison de la transmission transplacentaire de *Sarcocystis* en fonction des espèces.

Tableau XXII : Tableau comparatif de la transmission transplacentaire de *Sarcocystis* en fonction des espèces présentes chez les mères

	Mères positives pour <i>S. cruzi</i> (n=90)	Mères positives pour <i>S. hominis</i> (n=109)
Nombre de mères n'ayant pas transmis le parasite à leurs fœtus	88	101
Nombre de mères ayant transmis le parasite à leurs fœtus	2	8

Aucun fœtus positif n'a présenté de *S. hirsuta*.

La transmission de *S. hominis* s'est produit dans 7,9 % des cas lorsque les mères présentaient elles-mêmes *S. hominis* contre 2,3 % pour *S. cruzi*.

Cependant la p-value obtenue par le test exact de Fisher est de 0,12, l'espèce de *Sarcocystis* n'a donc pas d'influence significative sur la transmission transplacentaire de *Sarcocystis*.

3.7. Relation entre la présence de *Sarcocystis* dans le placenta et les caractéristiques des mères et des fœtus

Lors de nos analyses, deux placentas sur 142 se sont révélés positifs pour *Sarcocystis* en PCR Genre. Ces placentas provenaient de vaches Croisées mixtes et Charolaise ayant 28 mois et 127 mois et étant dans le premier et le deuxième tiers de gestation respectivement. Les vaches présentant ces placentas positifs étaient parasitées par *S. cruzi* et *S. hominis* pour l'une et *S. cruzi* seulement pour la seconde. Les fœtus issus de ces mères étaient quant à eux négatifs pour *Sarcocystis*.

Bilan

La **transmission transplacentaire** de la sarcosporidiose chez les bovins **ne dépend pas** :

- ✓ De l'âge des mères.
- ✓ Du stade de gestation.
- ✓ De l'espèce de *Sarcocystis*

La race Normande semble transmettre de façon plus fréquente le parasite que les races Croisées mixtes et Prim'Holstein, mais les effectifs étudiés restent trop faibles pour pouvoir conclure de façon certaine.

4. Discussion

4.1. Collecte des échantillons

L'objectif principal de notre étude était de rechercher la présence de *Sarcocystis* dans les muscles de fœtus et dans les muscles de leurs mères afin d'établir s'il existe une transmission verticale pouvant expliquer la forte prévalence de l'infection chez les bovins adultes. Ainsi, seul du tissu musculaire a été prélevé chez les mères et leurs fœtus.

4.1.1. Prélèvements de mères

Les vaches n'ont pas été prélevées en fonction de leur race ou de leur âge mais en fonction des fœtus prélevés en amont. Ainsi, les effectifs pour certaines races sont réduits et il est donc difficile de conclure sur l'importance de ces races (telles que la race Normande ou la race Blonde d'Aquitaine) sur la transmission transplacentaire de *Sarcocystis*.

Dans de rares cas (pour quatre mères), il n'a pas été possible de retrouver la carcasse dans les chambres froides car celles-ci présentaient des saisies partielles (pour des motifs autres que la myosite éosinophile). Il était alors plus compliqué de les retrouver sur la chaîne d'abattage. Nous avons néanmoins pu prélever 140 mères pour notre étude.

Les prélèvements ont été effectués à l'aide de scalpels à usage unique et les échantillons ont été placés dans des sachets individuels afin d'éviter toute contamination.

4.1.2. Prélèvements de fœtus

Les prélèvements de fœtus ont été effectués en « tout venant » car, dans un souci de temps, nous ne pouvions pas sélectionner les fœtus en fonction de leur âge ce qui aurait permis d'avoir des lots équilibrés. Cependant, nous avons eu une répartition plutôt équilibrée des trois classes d'âge puisque nous avons 18 %, 46 % et 36 % de fœtus dans le premier tiers, deuxième tiers et dernier tiers de gestation respectivement.

Il ne nous a pas été possible de prélever des fœtus ayant moins de 2 mois. Cependant, sur ces fœtus, la quantité de muscle aurait été très faible voire insuffisante pour pouvoir réaliser les analyses par la suite.

Les fœtus ont été prélevés majoritairement au niveau des muscles situés sur les membres postérieurs et sur les membres antérieurs pour les fœtus âgés de moins de cinq mois.

Plusieurs muscles ont donc été prélevés pour chaque fœtus afin d'obtenir la quantité nécessaire pour la réalisation de nos analyses (environ 200 g). Cependant, le nombre de muscles prélevés étaient plus important chez les fœtus jeunes (ayant des muscles plus petits) que chez les plus âgés. Nous avons donc une différence de prélèvements sur les fœtus en fonction de leur âge. Ceci peut avoir une influence sur les résultats obtenus. En effet, le parasite se répartit de façon plus ou moins aléatoire dans les muscles. Ainsi, plus le nombre de muscles prélevés est important, plus la probabilité de mettre en évidence le parasite augmente.

Enfin, pour réaliser nos prélèvements, nous avons utilisé un couteau qui a été nettoyé entre chaque fœtus prélevé, le risque de contamination entre prélèvements était ainsi réduit.

4.1.3. Détermination de l'âge des fœtus

Au cours des prélèvements, l'âge des fœtus a été systématiquement estimé en utilisant la grille située en figure 6. En effet, nous n'avons pas accès aux dates d'insémination ou de saillie. Cette grille a été conçue en utilisant les données issues de la bibliographie. Cependant, peu d'études ont été réalisées sur ce sujet et très peu de photographies représentant des fœtus à différents âges sont disponibles. La figure 7 permet d'illustrer les critères permettant la détermination de l'âge des fœtus. Cependant, nous n'avons pas eu accès à l'âge réel des fœtus que nous avons utilisés pour illustrer ce tableau. Il se peut donc qu'il y ait quelques erreurs sur la détermination de l'âge, les critères étant variables en fonction de la race des animaux.

Les critères utilisés pour estimer l'âge étaient principalement des critères liés au poids et à la taille. D'autres éléments apparaissant à des dates précises ont également été utilisés : l'apparition des poils sur la tête et l'ensemble du corps, l'éruption des dents, la consistance des onglons, l'ouverture des yeux... La prise en compte de ces éléments nous permettait d'être plus précis sur l'estimation de l'âge. En effet, il existe des variations de taille et de poids entre les différentes races, ce qui peut entraîner des biais.

Cependant, en découpant la gestation en trois grandes périodes et en nous limitant ainsi dans notre exigence de précision, nous avons diminué le risque d'erreur lié à l'utilisation de la grille.

4.1.4. Prélèvements de placenta

Les prélèvements de placenta ont pu être réalisés en même temps que ceux des fœtus, ce qui nous a permis de conserver la traçabilité.

Pour chaque prélèvement, nous avons essayé de ne prendre que les cotylédons fœtaux et non les caroncules maternelles. En effet, un des objectifs de notre étude était de rechercher si le parasite pouvait être présent dans le placenta des bovins après la mise bas. Or, seule la partie fœtale se retrouve dans l'environnement suite au vêlage. La recherche du parasite dans les caroncules maternelles aurait ainsi pu fausser nos résultats. Cependant, la délivrance étant parfois compliquée à réaliser, il se peut que certaines caroncules aient pu être associées à nos prélèvements. La présence de ces caroncules dans nos prélèvements semble toutefois minime, cela n'a donc pas dû influencer de façon majeure sur la prévalence obtenue.

4.2. Techniques d'analyse

4.2.1. Digestion enzymatique

L'étape de digestion enzymatique est une étape longue mais qui ne présente pas de difficultés particulières. Il faut cependant être vigilant sur le nettoyage du matériel afin d'éviter de contaminer les échantillons en particulier au niveau du nettoyage des ampoules à décanter et du tamis qui s'avère plus compliqué. Nous avons donc décidé de réserver une série d'ampoules à décanter à l'analyse des fœtus afin de limiter au maximum les risques de contamination.

Pour être efficace lors de cette étape, il est par ailleurs intéressant de disposer de plusieurs ampoules à décanter, ce qui demande beaucoup de place.

Au cours de cette étape nous avons pu observer une différence de produit final entre les échantillons de mères, de fœtus et de placentas. Les échantillons finaux de placentas mais surtout ceux de fœtus issus de cette première étape du protocole présentaient beaucoup plus d'éléments en suspension que les échantillons de mères. En effet, la majeure partie des débris cellulaires étaient retenus dans le tamis lors de la filtration des échantillons de mères car il s'agissait de débris grossiers contrairement à ceux des fœtus ou des placentas qui passaient à travers les pores du tamis. Cette différence de produits finaux s'explique probablement par une différence de composition entre les muscles de bovins adulte et ceux des fœtus, notamment au niveau de la proportion des différents constituants du tissu musculaire. Ceci a entraîné des problèmes lors de l'étape d'extraction d'ADN.

4.2.2. Extraction d'ADN

Cette étape d'extraction est également simple à réaliser grâce à l'utilisation des kits. Elle est rapide puisque plusieurs échantillons peuvent être traités en même temps. De plus, l'incubation à 56 °C peut se faire durant la nuit ce qui assure également un gain de temps.

Ce protocole d'extraction avait déjà pu être testé sur du muscle de bovin adulte lors de travaux antérieurs et s'avérait très efficace (Honoré, 2011 ; Bertin, 2013 ; Lemieux, 2014). Cependant, nous avons pu constater des anomalies lors de l'utilisation des kits pour l'extraction de l'ADN dans les échantillons de fœtus. Le digestat obtenu à l'issue de la première étape (étape de digestion enzymatique) contenait ainsi beaucoup de débris. Ces débris ont entraîné, au cours de cette seconde étape du protocole, le colmatage des membranes de silice dont le rôle est de piéger l'ADN. Ainsi, lors des différents lavages à l'aide des tampons B5 et BW, les liquides ne traversaient pas la membrane de silice après centrifugation du fait du colmatage. Nous avons donc testé deux méthodes de filtration différentes, que nous avons réalisées, dans les deux cas, juste avant l'étape d'utilisation des colonnes de silice.

Ainsi, pour les deux protocoles d'essai de filtrations supplémentaires nous avons utilisé les filtres suivants :

- des filtres issus des kits d'extraction « Nucleospin Plant II midi » pour six échantillons de muscles de fœtus,
- des filtres ayant des pores de 8 µm associés à des seringues pour six autres échantillons de muscles de fœtus.

Après filtration, les échantillons ont été placés dans des colonnes de silice et nous avons poursuivi le protocole normal d'extraction. Dans les deux cas, nous n'avons pas eu de problème de colmatage de la membrane que nous avons eu en absence de filtration. Nous avons ensuite réalisé des PCR sur ces échantillons que nous avons fait migrer sur des gels d'agarose. Les résultats des électrophorèses ont ensuite été comparés aux électrophorèses effectuées sur les mêmes échantillons mais pour lesquels le protocole normal a été utilisé. Nous avons constaté qu'avec les deux protocoles de filtration nous obtenions des électrophorèses « plus propres ». En effet, avec le protocole normal d'extraction, nous obtenions des smears (trainées blanches) sur les gels d'électrophorèse, marqueurs de la présence de nombreux débris. Ces smears étaient quasiment inexistantes après filtration. Cependant, lorsque nous avons dosé l'ADN des échantillons filtrés et non filtrés à l'aide du Nanodrop[®], les échantillons filtrés présentaient une quantité d'ADN nettement inférieure aux échantillons non filtrés. Nous avons donc décidé d'abandonner ces étapes de filtration.

Afin de palier le colmatage des membranes de silice pour les échantillons de muscles de fœtus, nous avons donc décidé d'augmenter la centrifugation à 15 000 G pendant 5 minutes au lieu de 11 000 G pendant 1 minute.

Ces problèmes rencontrés lors de l'extraction d'ADN des échantillons de muscles de fœtus ont pu entraîner des pertes d'ADN et diminuer la prévalence obtenue à l'issue des analyses PCR en augmentant la part de faux négatifs. Cependant, ce constat ne semble pas suffir à expliquer la faible prévalence observée chez les fœtus.

4.2.3. PCR Genre et Multiplex

La PCR est un outil très sensible permettant la détection et l'amplification de faibles quantités d'ADN cible. La PCR Multiplex a de plus l'avantage de donner un renseignement plus précis car elle permet de déterminer les espèces présentes. Cependant, la sensibilité et la spécificité des méthodes d'analyse PCR restent encore à définir, ce qui permettrait de connaître le nombre de faux négatifs dans les lots d'échantillons étudiés. Les prévalences que nous avons obtenues chez les mères sont néanmoins similaires à celles obtenues dans d'autres études utilisant d'autres méthodes d'analyse (tableau IV), ce qui laisse supposer que la méthode que nous avons utilisée est fiable chez les mères.

Les résultats obtenus en PCR Genre et en PCR Multiplex au cours de notre étude sont quasiment équivalents. Nous avons cependant trouvé quelques rares différences concernant les résultats sur les fœtus et sur les placentas : deux fœtus positifs en PCR Genre ne sont pas apparus positifs en PCR Multiplex, ce qui a également été le cas pour deux placentas. Ces différences pourraient être dues à une meilleure sensibilité de la PCR Genre. Cependant nous avons eu des résultats similaires après utilisation des deux types d'analyses PCR concernant les mères. Ces différences pourraient également provenir des aléas du pipetage puisque sur nos échantillons d'extrait d'ADN de 100 µL nous n'utilisons que 5 µL pour effectuer les analyses PCR. Une autre hypothèse pourrait être que l'ADN de parasite amplifié par la PCR Genre pourrait provenir de *Sarcocystis rommeli* ou *Sarcocystis heydorni*, espèces non recherchées lors de l'analyse par PCR Multiplex. Nous ne disposons pas encore de données concernant la prévalence de ces deux espèces chez les bovins. Dans une étude précédente, une comparaison des deux types de PCR par un test de kappa avait permis de montrer que la concordance entre les deux méthodes était forte (kappa = 0,738) (Moré *et al.*, 2014).

4.3. Mise en évidence d'une transmission transplacentaire de la sarcosporidiose bovine

Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence l'existence d'une transmission transplacentaire de la sarcosporidiose bovine.

Différentes études précédemment menées avaient également mis en évidence le parasite, mais l'identification de celui-ci n'a jamais été faite par méthode PCR. De plus, le parasite n'a jamais été observé dans le tissu musculaire de fœtus.

En effet, la première mis en évidence de *Sarcocystis* chez des fœtus a été faite lors d'une étude menée en 1976 où le parasite avait été observé par microscopie dans les cellules endothéliales vasculaires du cerveau de deux fœtus (Munday et Black, 1976). Une seconde étude menée par Hong *et al.* en 1982 aux Etats-Unis, suite à un cas d'avortement isolé sur une vache Angus dans le dernier tiers de gestation, avait également mis en évidence par histologie la présence de schizontes au sein des cellules endothéliales de plusieurs capillaires de l'avorton. La localisation exacte de ces schizontes dans l'organisme n'est pas mentionnée dans l'étude, mais les auteurs rapportent qu'ils sont principalement retrouvés dans le cerveau. Puis en 1984, des analyses histologiques menées sur seize avortons provenant de quatre élevages différents avaient révélé la présence de protozoaires au sein des cellules endothéliales du cerveau de deux avortons. Les lésions fœtales et les protozoaires étaient similaires à ceux décrits par Munday et Black et par Hong *et al.*, l'identité exacte des protozoaires restait indéfinie mais de fortes suspicions se sont portées sur *Sarcocystis*. Enfin, des structures ressemblant à des mérontes ont été identifiées dans des macrophages présents dans le liquide cébrospinal d'un veau prématuré dont la mère avait été infectée expérimentalement par 4.10^6 mérozoïtes en intra-veineux à 270 jours de gestation. Cependant, la transmission n'a pas été observée chez l'autre veau pour lequel la même infection avait été réalisée sur la mère (Savini *et al.*, 1996).

Ainsi, très peu d'études ont recherché la présence de *Sarcocystis* chez les fœtus. Ces études ont toutes utilisé l'histologie pour le diagnostic et des incertitudes persistent toujours quant à l'identité exacte des parasites observés. Enfin, les parasites ont toujours été mis en évidence dans les cellules endothéliales vasculaires du cerveau ou dans des macrophages mais jamais dans les tissus muscles. Cette étude constitue donc la première description de la présence de *Sarcocystis* dans des tissus musculaires de fœtus de bovins.

Selon Euzéby (Euzéby, 1998), en phase d'acuité, les tachyzoïtes pourraient passer la barrière placentaire au cours de la gestation et ainsi infecter les fœtus. Ce phénomène n'apparaîtrait que si la première infection de la vache a lieu durant la gestation, l'immunité n'étant pas encore en place. D'autres hypothèses pouvant expliquer la transmission transplacentaire seraient une infection massive ou une réactivation de l'infection entraînant une recirculation du parasite dans le sang (Agerholm et Dubey, 2014). Toutes ces hypothèses restent encore à explorer.

4.4. Prévalence de la sarcosporidiose

4.4.1. Prévalence obtenue chez les mères

Toutes les carcasses de bovins adultes prélevées ont été par la suite commercialisées et aucune n'a fait l'objet de saisie pour myosite éosinophilique. La prévalence obtenue sur les échantillons de mères au cours de notre étude est de 93,6 %. Cette prévalence est très élevée et est en accord avec les prévalences obtenues dans les études précédentes (Tableau IV). *S. hominis* est l'espèce la plus présente dans notre étude avec une prévalence de 77,1 % suivi de *S. cruzi* présentant une prévalence de 65,7 %. *S. hirsuta* n'a été que rarement présent dans nos échantillons avec une prévalence de 7,9 %. Ces prévalences sont en accord avec les travaux réalisés par Bertin et Lemieux sur les bovins en Pays de la Loire (Bertin, 2013 ; Lemieux, 2014).

Les mères ont été prélevées au niveau du caparaçon afin de ne pas léser les autres parties de la carcasse qui allaient être commercialisées. En effet, tous les muscles striés de bovins peuvent présenter des kystes de *Sarcocystis*. Cependant des sites de localisation préférentielle du parasite ont été mis en évidence (Vercruysse *et al.*, 1989 ; Bucca *et al.*, 2011). Ainsi, les localisations préférentielles de *Sarcocystis* semblent être le cœur, le diaphragme, l'œsophage et les muscles masséters. De plus, les résultats de Lemieux sont en accord avec ce constat et montrent également qu'il est préférable d'effectuer plusieurs prélèvements afin d'avoir une plus forte probabilité de mettre en évidence le parasite (Lemieux, 2014).

Nous pouvons donc supposer que les prévalences que nous avons trouvées pourraient être sous-estimées, bien que les résultats que nous obtenons soient similaires aux études précédentes.

4.4.2. Prévalence obtenue chez les fœtus

La prévalence de la sarcosporidiose que nous avons obtenu pour les fœtus au cours de notre étude est de 8 %. Cette prévalence est faible comparée à la prévalence de la sarcosporidiose chez leurs mères (93,6 %). Une étude menée sur 173 veaux nouveau-nés issus de mères toutes séropositives pour *Sarcocystis* a montré qu'il existait 1,7 % de transmission verticale du parasite. L'établissement de cette prévalence s'est faite par recherche d'anticorps par IFAT avant la prise colostrale (Moré *et al.*, 2009). Cette fréquence de transmission verticale obtenue par Moré *et al.* est donc plus faible que celle que nous avons trouvé dans notre étude.

Pour des raisons pratiques, les prélèvements n'ont pas été réalisés sur les muscles à localisation préférentielle (partie 7.2.1.1.). En 2011, Bucca *et al.* étudient l'infection par *Sarcocystis* dans vingt-deux muscles de bovins afin de comparer la sensibilité des résultats obtenus en fonction du lieu de prélèvement. L'étude a été menée sur cinquante bovins ce qui représentait 1100 échantillons analysés par histologie. Les résultats des analyses ont montré que le cœur était l'organe présentant la meilleure sensibilité pour la recherche du parasite. Cependant, la sensibilité lors de l'utilisation du muscle gastrocnémien dans les analyses comparée à la sensibilité des analyses sur le cœur était de 64,9 %. Ce constat indique que le niveau de sensibilité lors des analyses sur le muscle gastrocnémien est bon (les résultats de cette étude ont cependant été menés sur des muscles de bovins adultes uniquement). De plus,

les muscles supra-épineux, semi-tendineux, tenseur du fascia lata et biceps brachial présentaient également une sensibilité correcte (supérieures à 43 %). Ainsi, bien que nous n'ayons pas prélevé les muscles présentant la plus forte probabilité de contenir *Sarcocystis*, les muscles ayant été utilisé pour nos analyses présentaient également une bonne sensibilité.

Lors de la dernière étape des analyses, les fœtus positifs présentaient des bandes peu intenses sur les gels d'électrophorèse, révélateur d'une quantité faible d'ADN. Cette faible quantité pourrait s'expliquer par les difficultés que nous avons rencontrées lors de l'extraction d'ADN ou simplement par le fait que la quantité de parasites présente dans les muscles de fœtus prélevés est faible. Or, lors de l'étape de PCR, nous ne prélevons que 5 µL sur les 100 µL d'extraits d'ADN. Il est donc envisageable que lors du prélèvement des 5 µL, l'ADN du parasite n'ait pas été prélevé, bien que nous ayons vortexé nos extraits avant le prélèvement afin de limiter ce risque. Ainsi, il se peut que nous ayons eu des faux négatifs au cours de notre étude.

Enfin, les études précédentes sur la recherche de transmission verticale utilisant des fœtus ou des avortons montraient la présence de *Sarcocystis* dans les cellules endothéliales vasculaires du cerveau et non dans les tissus musculaires comme c'est le cas pour notre étude. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure que le parasite ait pu être présent dans le cerveau de certains fœtus prélevés, dont les résultats sont apparus négatifs lors des PCR réalisées sur les muscles.

La prévalence de la sarcosporidiose chez les fœtus est faible et ne permet donc pas d'expliquer à elle seule la forte prévalence observée chez les mères. Un autre mode de transmission envisageable pour la sarcosporidiose chez les bovins pourrait être une transmission par le lait ou le colostrum. En effet, une étude a montré que les bovins se contaminaient très précocement. Ainsi, sur 25 veaux séronégatifs à la naissance, 100 % sont devenus séropositifs à 7 mois d'âge. Or, la demi-vie des anticorps colostraux n'étant que de 20 jours, cela suppose que l'infection a eu lieu très tôt dans la vie des animaux (Moré *et al.*, 2009). La forte incidence dans les premiers jours de vie des veaux pourrait peut-être être due à une ingestion de *Sarcocystis* via le colostrum ou le lait. En effet, des tachyzoïtes de *T. gondii* ont été retrouvés dans différents organes et sécrétions chez les bovins, notamment dans le colostrum et dans le lait. Les zoïtes de *S. cruzi* et *T. gondii* étant morphologiquement similaires, subissant la même multiplication par endodyogénie et étant retrouvés dans le flux sanguin, Fayer *et al.* ont recherché la possibilité de transmission de *Sarcocystis* par le lait (Fayer *et al.*, 1982). Afin d'étudier ce phénomène, 16 vaches Prim'Holstein gestantes ont été inoculées *per os* avec deux doses différentes de sporocystes 30 jours avant le part. Des frottis colorés ont ensuite été réalisés sur le colostrum et étudiés par microscopie afin de rechercher des zoïtes de *Sarcocystis*. Les veaux issus des mères contaminées et ayant ingéré le colostrum ainsi que le lait ont également été abattus à 61 et 68 jours d'âge et leurs tissus ont été inspectés par microscopie. Aucun zoïte n'a été retrouvé dans le colostrum et de même aucun kyste de *Sarcocystis* n'a pu être observé chez les veaux. Cette étude montre donc qu'il ne semble pas qu'il existe une transmission lactogénique de la sarcosporidiose chez les bovins.

4.4.3. Prévalence obtenue dans le placenta

Nous avons obtenu une prévalence de 1,4 %. Cette prévalence est très faible comparée à celle observée chez les mères (93,6 %) et est également plus faible que celle obtenue chez les fœtus (8 %). Cependant, compte tenu des difficultés rencontrées aux étapes de digestion et d'extraction d'ADN, nous pouvons supposer que la prévalence obtenue pour les placentas est sous-estimée.

Les fœtus associés aux placentas positifs étaient quant à eux négatifs en PCR. Inversement, tous les fœtus positifs avaient des placentas négatifs. Ces résultats semblent similaires à une étude menée en 1976 dans laquelle des protozoaires ressemblant à des schizontes de *Sarcocystis* avaient été observés en microscopie dans quatre placentas provenant de fœtus au sein desquels aucun parasite n'avait pu être observé (Munday et Black, 1976).

La présence du parasite dans le placenta mais son absence dans les muscles de fœtus pourrait s'expliquer par le fait que la pénétration des schizontes dans les cellules musculaires puis la formation de métrocytes initiant la formation des sarcocystes se produit à la suite d'une diffusion des schizontes matures et immatures dans le flux sanguin. Ainsi, nous pouvons supposer qu'au moment des prélèvements, ces schizontes ne se soient pas encore fixés dans les tissus musculaires des fœtus et soient seulement présents dans le flux sanguin. Le placenta étant richement vascularisé, en particulier au niveau des cotylédons, le parasite peut ainsi être retrouvé dans le placenta mais pas dans les muscles de fœtus. Inversement, les fœtus positifs pour *Sarcocystis* présentent des placentas négatifs car nous pouvons supposer que le parasite ait fini sa migration par voie sanguine pour se fixer dans les muscles du fœtus.

4.5. Comparaison de la transmission transplacentaire de *Sarcocystis* avec celles de deux autres protozoaires : *Toxoplasma* et *Neospora*

Il semble intéressant de comparer la transmission transplacentaire de la sarcosporidiose chez les bovins que nous avons mis en évidence dans cette étude à la transmission transplacentaire d'autres protozoaires chez les bovins tels que *Toxoplasma gondii* et *Neospora caninum* pour lesquels plusieurs études ont été menées.

Les bovins sont considérés comme résistants à *T. gondii* mais sensibles à *N. caninum*. Cependant ces deux parasites ont la capacité d'engendrer des transmissions verticales. Il semble toutefois que la transmission transplacentaire de la toxoplasmose n'apparaisse que lorsque l'infection des bovins se fait durant la gestation alors que *Neospora caninum* a la capacité de se transmettre au fœtus lorsque la mère souffre de formes latentes ou aiguës. *N. caninum* a donc une plus forte capacité de transmission transplacentaire comparé à *T. gondii* (Wiengcharoen *et al.*, 2011).

Les fréquences de transmission horizontale et verticale de *S. cruzi* et *N. caninum* ont été comparées. Pour cela, la technique d'IFAT a été utilisée avant la première prise colostrale afin de rechercher les anticorps de *Sarcocystis* et de *Neospora* témoin de la transmission des parasites *in utero*. Les antigènes utilisés étaient des bradyzoïtes de *S. cruzi* provenant de bovins infectés naturellement et des tachyzoïtes de *N. caninum* (souche NC-1). Il a été montré que la fréquence de transmission transplacentaire était de 1,7 % pour *Sarcocystis* contre 37,1 % pour *Neospora* (Moré *et al.*, 2009). *N. caninum* a donc une plus forte fréquence de transmission verticale que *S. cruzi*.

La transmission transplacentaire de *T. gondii* a été estimée à 6 % lors d'une étude menée sur 50 fœtus récupérés à l'abattoir de Sao Paulo et analysés par IFAT et histologie. Les auteurs ont également essayé d'induire une transmission verticale en inoculant 9 vaches à différents stades de gestation. Aucun *T. gondii* n'a été retrouvé dans les 9 fœtus. L'hypothèse avancée sur les mécanismes de transmission était que la transmission transplacentaire pourrait dépendre de la pathogénicité de la souche impliquée (Costa *et al.*, 2011). Nous pouvons supposer que cette hypothèse pourrait également s'appliquer à la transmission de *Sarcocystis*.

Ainsi, il semble que *Sarcocystis* ait une probabilité de transmission transplacentaire similaire à celle de *T. gondii*.

4.6. Conclusions et perspectives de notre étude

Nous avons montré qu'il existait une transmission verticale de *Sarcocystis*, mais cette transmission se révèle très faible compte tenu de la prévalence de la sarcosporidiose chez les bovins adultes. Ainsi, la transmission transplacentaire de *Sarcocystis* n'explique pas à elle seule les fortes prévalences de la sarcosporidiose rencontrées à travers le monde.

Notre étude a également montré que bien que *Sarcocystis* n'ait été retrouvé que dans un nombre très faible de placentas, il est toutefois parfois présent. Ainsi, il est conseillé d'éliminer les placentas dans les bacs d'équarissage après chaque mise bas afin d'arrêter le cycle de parasite. En effet, les chiens et les chats étant très souvent présents au sein des élevages bovins, ils pourraient pérenniser le cycle du parasite par ingestion de placenta après la mise bas. Le retrait systématique du placenta suite à la mise bas permet également de limiter la transmission d'autres maladies tels que la Néosporose, la Fièvre Q... ce qui présente également un intérêt.

La contamination des bovins par *Sarcocystis* semble être précoce (dans les premiers mois de vie d'après une étude de Moré *et al.* en 2009). Cependant la contamination ne semble pas se faire par l'intermédiaire du colostrum ou du lait (Fayer *et al.*, 1982).

Il aurait semblé intéressant de mesurer la quantité de *Sarcocystis* présente chez les mères par PCR quantitative afin de connaître s'il existe un lien entre la quantité de parasites et la probabilité de transmission verticale. Cependant, le parasite se répartissant de façon hétérogène et plus ou moins aléatoire dans les muscles de bovins (même s'il a été démontré qu'il existait des sites de localisation préférentielle), cette quantification n'est pas pertinente.

Afin de poursuivre cette étude, il serait intéressant de réaliser des analyses PCR sur des veaux âgés de 0 à 7 mois afin de caractériser la chronologie de la contamination. Des sérologies avec recherches d'anticorps anti-*Sarcocystis* (méthode moins invasive que dans le cas de la récolte des prélèvements en vue d'analyses PCR) pourraient également être envisagées. Cependant, ces prises de sang devront être réalisées avant la première prise colostrale ou après les vingt premiers jours de vie afin d'éviter toute interférence avec les anticorps maternels.

Enfin, la réalisation de mesures pour quantifier les ookystes présents dans l'environnement des bovins serait intéressante, mais la mise en œuvre de ces mesures demeure trop compliquée pour être réalisable à ce jour.

CONCLUSION

La sarcosporidiose des bovins est une maladie parasitaire très fréquente dans le monde, allant même jusqu'à atteindre 100 % de prévalence dans certaines régions. Cette affection, bien qu'asymptomatique dans la quasi-totalité des cas, provoque de lourdes pertes par les saisies pour myosite éosinophilique qu'elle engendre chez certains bovins.

Notre étude avait pour objectif de comprendre comment la prévalence de la sarcosporidiose pouvait être aussi élevée et pourquoi les bovins se parasitaient si précocement. En particulier nous voulions chercher à voir s'il existait une transmission transplacentaire pouvant expliquer cette très forte prévalence. L'objectif secondaire de notre étude était de rechercher le rôle que pouvait avoir le placenta sur la transmission du parasite.

Les analyses par PCR Multiplex et par PCR Genre sur les muscles striés squelettiques de 150 fœtus et de leurs mères nous ont permis de confirmer, dans un premier temps, que des bovins adultes d'apparence sains présentaient à 93,6 % *Sarcocystis* au sein de leurs muscles. Nous avons, dans un second temps, pu mettre en évidence l'existence d'une transmission transplacentaire de la sarcosporidiose bovine. Cette étude constitue donc la première description de la présence de *Sarcocystis* dans des tissus musculaires de fœtus de bovins, indiquant une transmission *in utero* du parasite. Les espèces de *Sarcocystis* retrouvées chez les fœtus étaient majoritairement *S. hominis* suivi de *S. cruzi*. Aucun *S. hirsuta* n'a pu être mis en évidence chez les fœtus, mais ceci peut s'expliquer par la faible prévalence de cette espèce rencontrée chez les mères. Cependant, toutes espèces confondues, la prévalence observée chez les fœtus est faible - 8 % - et ne permet donc pas à elle seule d'expliquer la très forte prévalence rencontrée chez les mères.

Les données récoltées concernant les mères nous ont permis de constater qu'il n'existait pas d'effet de l'âge des mères ni du stade de gestation sur la transmission verticale du parasite. De même, aucune espèce de *Sarcocystis* ne semble se transmettre de façon significativement plus importante que les autres.

Nous avons également pu mettre en évidence une très faible proportion de placentas présentant *Sarcocystis* (2/142). Ainsi, le placenta peut jouer un rôle, certes minime, dans la poursuite du cycle du parasite lors de la mise bas.

Pour poursuivre cette étude, afin de mieux connaître les facteurs de risque de la sarcosporidiose et de diminuer à terme le nombre de cas de myosite éosinophilique observé chez les bovins adultes, il semblerait intéressant de réaliser des analyses moléculaires sur les veaux dans les premiers mois de vie afin de mieux connaître la période au cours de laquelle les bovins se contaminent.

ANNEXES

Annexe 1 : Protocole de digestion enzymatique

Matériel :

- Flacon de 1 L
- Flacon de 250 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 congélation pour viande hachée
- Bain-marie 37 °C avec agitateur
- Tamis avec mailles de 400 µm
- Ampoule à décanter de 500 mL
- Tubes de prélèvement de 20 mL
- Tubes de 1,5 mL pour congélation

Technique :

- Mettre les échantillons à décongeler au réfrigérateur à 4 °C la veille de la digestion.
- Mettre le bain marie à chauffer à 37 °C.
- Préparer la solution de digestion (S₀ 1 L permet de traiter 10 échantillons).

Verser dans le flacon d'1 L :

- 1 L d'eau déminéralisée
- 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® 1000 W).
- Prélever 20 g et les placer dans un flacon de 200 mL avec 100 mL de S₀ (Placer les 180 g restants dans un sachet de congélation et les congeler à -20 °C)
- Agiter le mélange obtenu au bain-marie pendant 30 min.
- Filtrer l'ensemble du contenu au tamis 400 µm. Placer le filtrat dans une ampoule à décanter pendant 30 min.
- Récupérer environ 10 mL de culot de décanter dans un tube de prélèvement. Placer 1,5 mL à l'aide d'une pipette graduée dans chaque tube (3 tubes) de congélation. Les placer dans les boîtes de stockage.

Placer les boîtes au congélateur à -20 °C en attente des étapes suivantes.

Annexe 2 : Protocole d'extraction d'ADN

Matériel :

- Kit « NucleoSpin[®]Tissue » (Macherey-Nagel[®])
- Micropipettes et cônes
- Tube Eppendorf de 1,5 mL
- Bain-marie à 70 °C
- Bain-marie à 56 °C
- Vortex
- Ethanol 95 %
- Centrifugeuse
- Petits tubes Eppendorf pour la congélation des extraits

Technique :

- Faire décongeler un tube de 1,5 mL pour chaque échantillon à traiter à 4 °C, 20 min avant le début des manipulations.
- Mettre les bain-maries 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.
 - Vortex.
 - Incuber 1 h à 56 °C (dans un souci de temps, il est possible de laisser les prélèvements incuber toute la nuit).
 - ✓ Lyse de l'échantillon :
 - Vortex.
 - Ajouter 200 µL de B3.
 - Vortex.
 - Incubation 10 min au bain-marie à 70 °C (pendant ce temps-là, identifier les colonnes à silice et les petits tubes Eppendorf 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. Pour les échantillons de muscle de fœtus, centrifuger 5 minutes à 13 000 g.
 - Eliminer le liquide contenu dans le tube collecteur.

Mettre BE à chauffer dans le bain-marie à 70 °C.

- ✓ Lavage de la membrane de silice
 - Lavage 1 : Ajouter 500 µL de BW, centrifugation 1 min à 11 000 g, éliminer le contenu dans le tube collecteur.
 - Lavage 2 : Ajouter 600 µL de B5, centrifugation 1 min à 11 000 g, éliminer le contenu dans le tube collecteur.
- ✓ Séchage de la membrane de silice
 - Centrifugation 1 min à 11 000 g. Pour les échantillons de muscle de fœtus, centrifuger 5 minutes à 13 000 g.
- ✓ Elution de l'ADN
 - Placer les colonnes dans des tubes Eppendorf auxquels on retirera le couvercle afin qu'ils passent dans la centrifugeuse.
 - Ajouter 100 µL de BE à 70 °C (se placer à proximité du bain-marie pour conserver la température) dans les colonnes à silice.
 - Laisser incuber 1 min à température ambiante.
 - Centrifuger 1 min 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 Touch down *Sarcocystis spp.*

Matériel :

- Tube PCR
- Micropipettes et cônes
- Tube Eppendorf de 1,5 mL
- Vortex
- Réactifs PCR
- Thermocycleur
- Cuve à électrophorèse
- TBE 0,5 X
- Gel d'agarose

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 suivants :

Réactifs	Concentration finale	Quantité (en μL)
H ₂ O		11,4
Tampon PCR	1 mM	2,5
Amorce 1 (25 μM)	1 μM	1
Amorce 2 (25 μM)	1 μM	1
Amorce 3 (25 μM)	1 μM	1
Amorce 4 (25 μM)	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 reverse de *Sarcocystis spp.*
5' AACCTAATTCCCCGTTA 3'

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

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

Amorce 4 : Amorce sens de *Sarcocystis hirsuta*
5' CATTTCGGTGATTATTGG 3'

- Préparation des échantillons :

Vortexer le tube contenant le mix.

Répartir 20 µL de Master Mix dans chaque tube à paroi fine.

Ajouter 5 µL d'échantillon d'ADN dans chaque tube de PCR.

Pour le témoin positif, ajouter 5 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	}	2 cycles
62 °C pendant 1 minute		
72 °C pendant 30 secondes		
94 °C pendant 1 minute	}	2 cycles
61 °C pendant 1 minute		
72 °C pendant 30 secondes		
94 °C pendant 1 minute	}	2 cycles
60 °C pendant 1 minute		
72 °C pendant 30 secondes		
94 °C pendant 1 minute	}	2 cycles
59 °C pendant 1 minute		
72 °C pendant 30 secondes		
94 °C pendant 1 minute	}	2 cycles
58 °C pendant 1 minute		
72 °C pendant 30 secondes		
94 °C pendant 1 minute	}	2 cycles
57 °C pendant 1 minute		
72 °C pendant 30 secondes		
94 °C pendant 1 minute	}	30 cycles
56 °C pendant 1 minute		
72 °C pendant 30 secondes		

72 °C pendant 10 minutes

Refroidissement et maintien à 14 °C

- Analyse des produits de PCR par électrophorèse :

Gel d'agarose à 2,2 % dans un tube TBE 0,5 X.

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

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

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

- Interprétation :

Fragments amplifiés selon l'espèce de *Sarcocystis* :

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

Annexe 4 : Protocole de PCR Genre *Sarcocystis* spp.

Amorce SARF : 5'TGGCTAATACATGCGCAAATA

Amorce SARR : 5'AACTTGAATGATCTATCGCCA

Matériel :

- Tube PCR
- Micropipettes et cônes
- Tube Eppendorf de 1,5 mL
- Vortex
- Réactifs PCR
- Thermocycleur
- Cuve à électrophorèse
- TBE 1 X
- Gel d'agarose

Technique :

- Préparation du Master Mix :

MASTER MIX (contient tous les réactifs, excepté l'échantillon d'extrait d'ADN). Dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL ajouter dans l'ordre la quantité nécessaire de chacun des réactifs ci-dessous (pour chaque réaction) :

Réactif	Concentration finale	Volume à ajouter
H ₂ O		15,15 µL
Tampon PCR 10X avec MgCl ₂	1 mM	2,5 µL
Amorce SARF 25 µM	1 µM	1 µL
Amorce SARR 25 µM	1 µM	1 µL
dNTPs 10 mM	0,2 mM	0,25 µL
Taq (5u/µL)	0,5 unité / 25 µL	0,1 µL

- Préparation des échantillons :

Vortexer le tube contenant le mix.

Répartir 20 µL de Master Mix dans chaque tube à paroi fine.

Ajouter 5 µL d'échantillon d'ADN dans chaque tube de PCR.

Pour le témoin positif, ajouter 5 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

63 °C pendant 1 minute

72 °C pendant 1 minute

} 40 cycles

72 °C pendant 10 minutes

Refroidissement et maintien à 14 °C

- Analyse des produits de PCR par électrophorèse :

Gel d'agarose à 2,2 % dans un tube TBE 1 X.

Introduire dans chaque puits 20 µL de produit PCR + 4 µL de solution de dépôt.

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

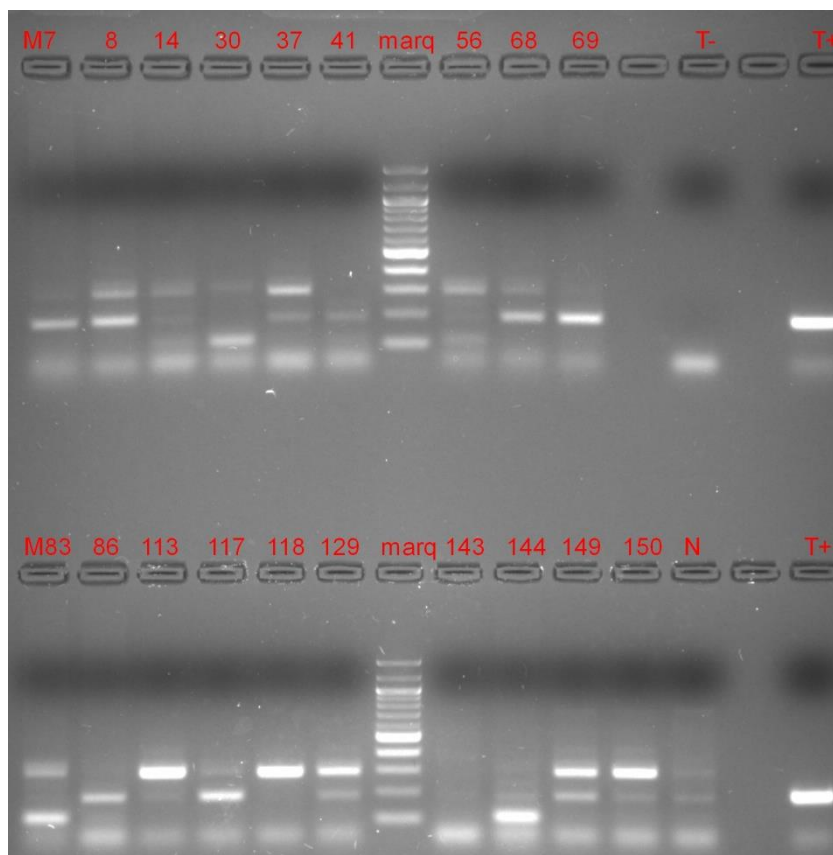
Faire migrer dans un tampon TBE 0,5 X, pendant 1 heure à 100 W et 400 mA.

- Interprétation :

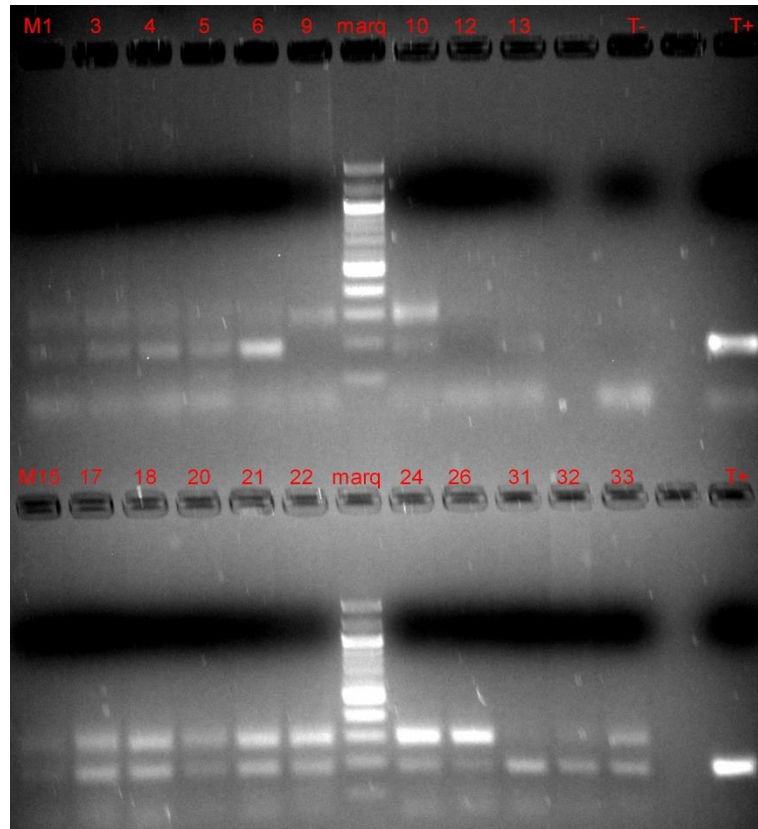
Fragments amplifiés à 164 pb

Annexe 5 : Résultats des électrophorèses après analyses par PCR Multiplex

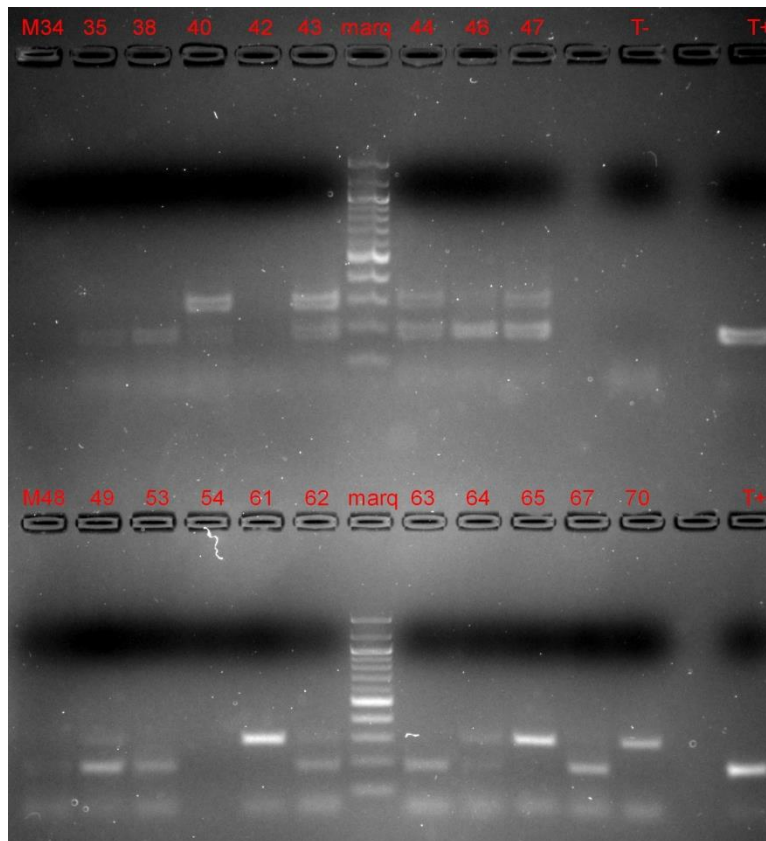
1- Résultats des PCR Multiplex des mères :



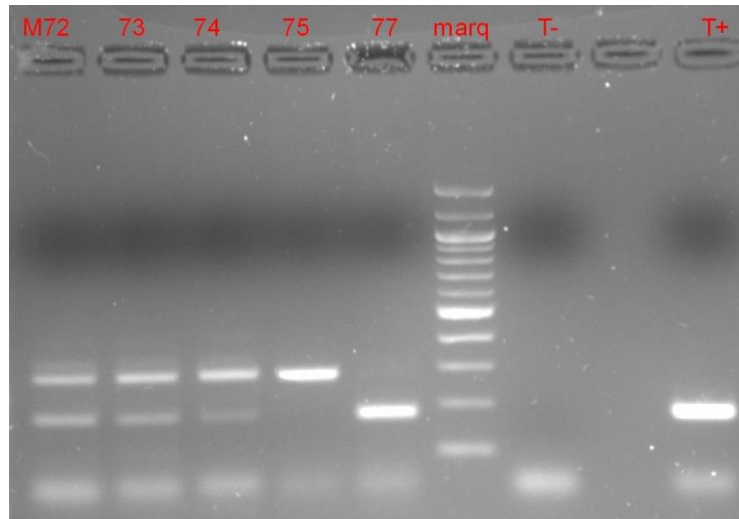
Gel du 09/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
M7	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M113	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M8	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M117	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M14	Positif <i>S. hirsuta</i> , <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M118	Positif <i>S. cruzi</i>
M30	Positif <i>S. hirsuta</i> et <i>S. cruzi</i>	M129	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M37	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M143	Positif <i>S. hominis</i>
M41	Positif <i>S. hominis</i>	M144	Positif <i>S. hirsuta</i> et <i>S. hominis</i>
M56	Positif <i>S. hirsuta</i> et <i>S. cruzi</i>	M149	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M68	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M150	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M69	Positif <i>S. hominis</i>	N	Echantillon ne faisant pas parti de l'étude
M83	Positif <i>S. hirsuta</i> et <i>S. cruzi</i>	T+	Positif <i>S. hominis</i>
M86	Positif <i>S. hominis</i>	T-	Négatif



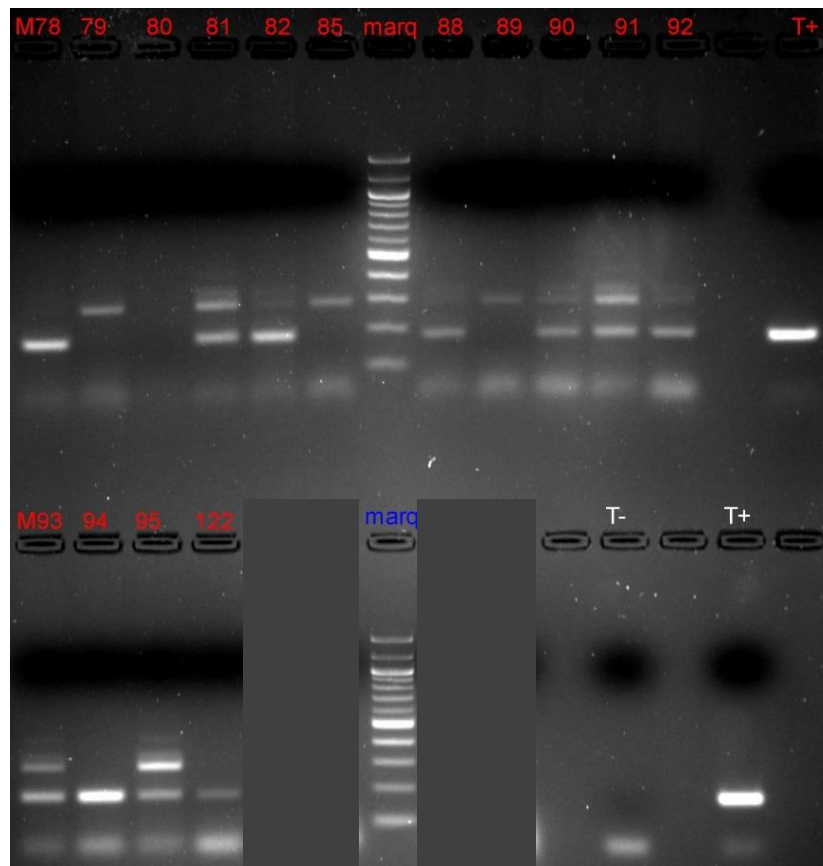
Gel du 10/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
M1	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M18	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M3	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M20	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M4	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M21	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M5	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M22	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M6	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M24	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M9	Positif <i>S. cruzi</i>	M26	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M10	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M31	Positif <i>S. hominis</i>
M12	Négatif	M32	Positif <i>S. hominis</i>
M13	Positif <i>S. hominis</i>	M33	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M15	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	T+	Positif <i>S. hominis</i>
M17	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	T-	Négatif



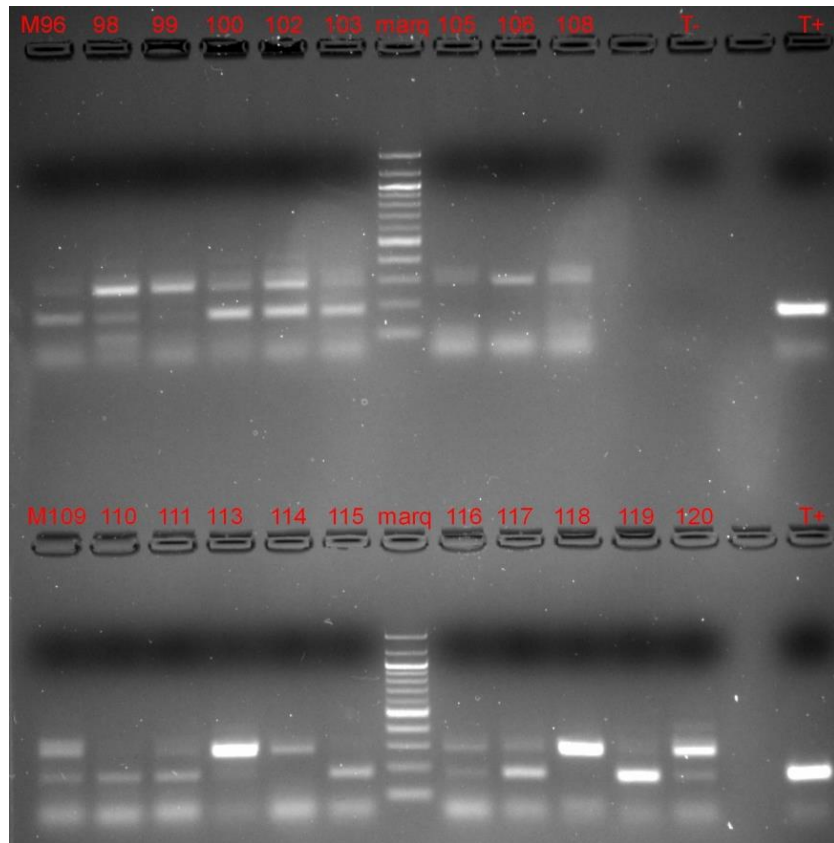
Gel du 10/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
M34	Négatif	M53	Positif <i>S. hominis</i>
M35	Positif <i>S. hominis</i>	M54	Négatif
M38	Positif <i>S. hominis</i>	M61	Positif <i>S. cruzi</i>
M40	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M62	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M42	Négatif	M63	Positif <i>S. hominis</i>
M43	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M64	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M44	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M65	Positif <i>S. cruzi</i>
M46	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M67	Positif <i>S. hominis</i>
M47	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M70	Positif <i>S. cruzi</i>
M48	Positif <i>S. hominis</i>	T+	Positif <i>hominis</i>
M49	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	T-	Négatif



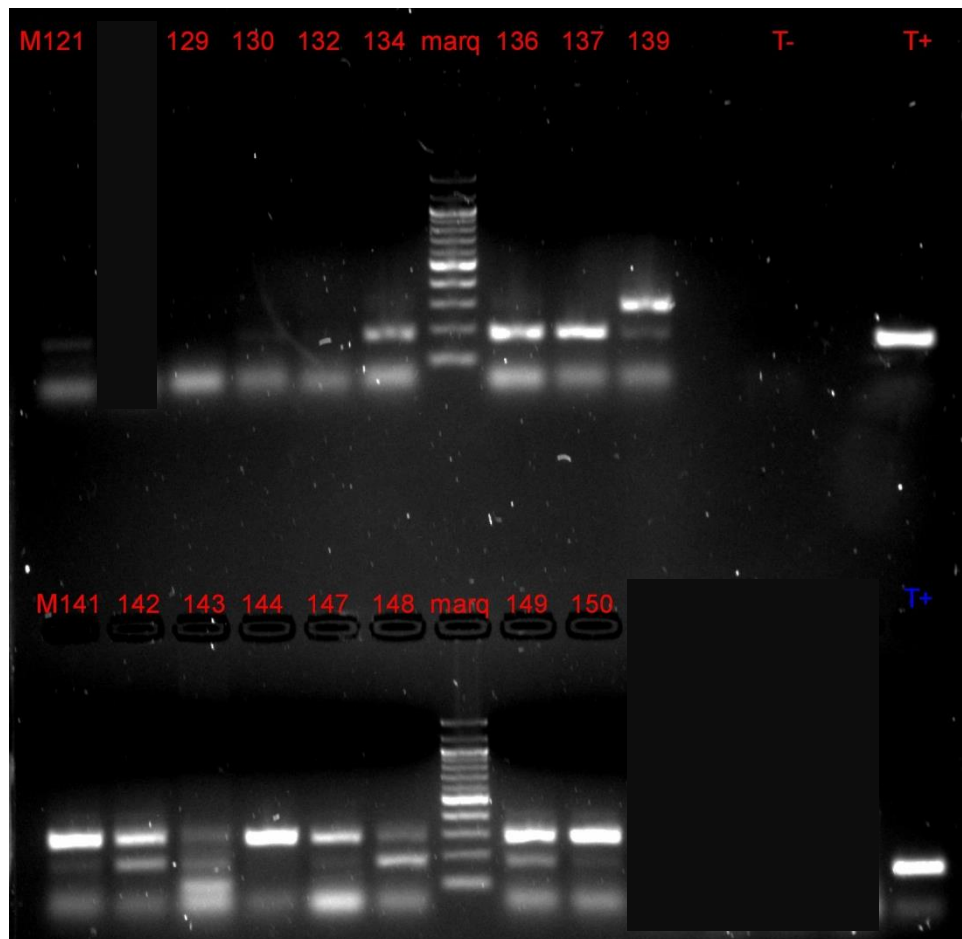
Gel du 10/06/2016	
Echantillon	Résultat
M72	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M73	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M74	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M75	Positif <i>S. cruzi</i>
M77	Positif <i>S. hominis</i>
T+	Positif <i>S. hominis</i>
T-	Négatif



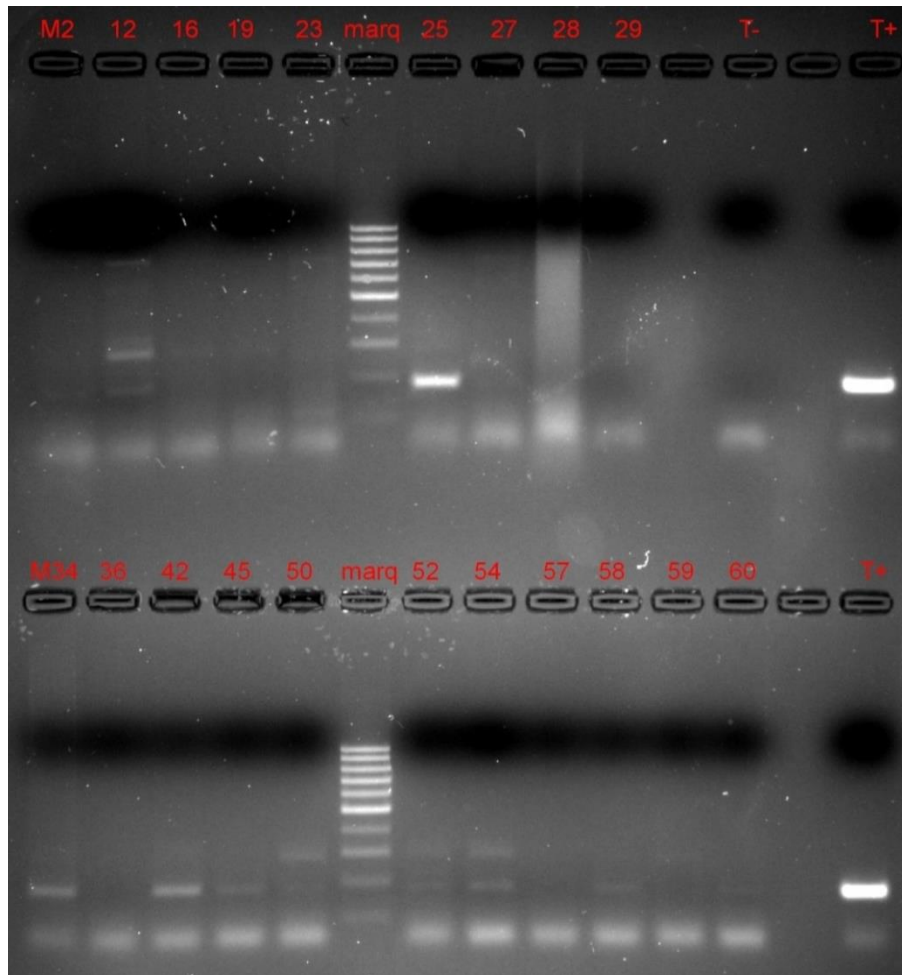
Gel du 10/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
M78	Positif <i>S. hominis</i>	M91	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M79	Positif <i>S. cruzi</i>	M92	Exclu de l'étude (erreur de prélèvement)
M80	Négatif	M93	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M81	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M94	Positif <i>S. hominis</i>
M82	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M95	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M85	Positif <i>S. cruzi</i>	M122	Positif <i>S. hominis</i>
M88	Positif <i>S. hominis</i>	T+	Positif <i>S. hominis</i>
M89	Positif <i>S. cruzi</i>	T-	Négatif
M90	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>		



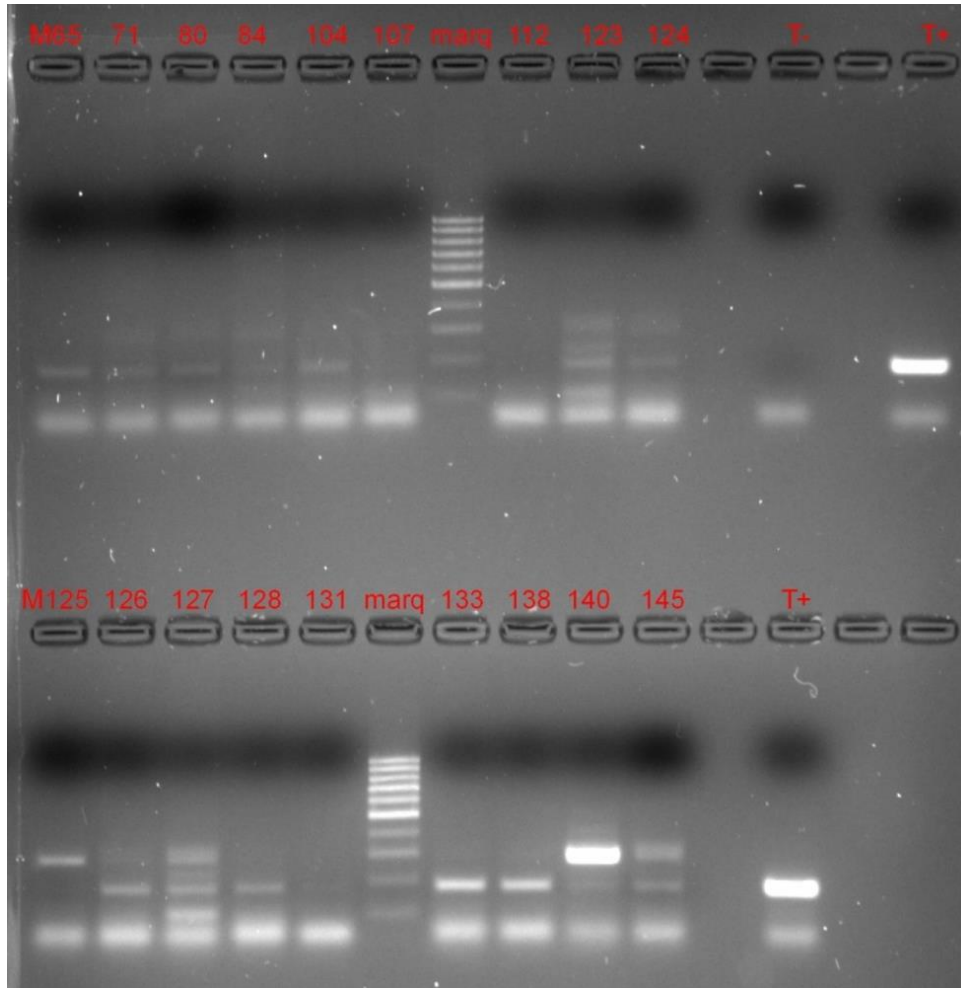
Gel du 10/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
M96	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M111	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M98	Positif <i>S. hominis</i> , <i>S. cruzi</i> et <i>S. hirsuta</i>	M113	Positif <i>S. hominis</i>
M99	Positif <i>S. cruzi</i>	M114	Positif <i>S. cruzi</i>
M100	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M115	Positif <i>S. hominis</i>
M102	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M116	Positif <i>hominis</i> et <i>cruzi</i>
M103	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M117	Positif <i>hominis</i> et <i>cruzi</i>
M105	Positif <i>S. cruzi</i>	M118	Positif <i>S. cruzi</i>
M106	Positif <i>S. cruzi</i>	M119	Positif <i>S. hominis</i>
M108	Positif <i>S. cruzi</i>	M120	Positif <i>S. hominis</i> et <i>cruzi</i>
M109	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	T+	Positif <i>S. hominis</i>
M110	Positif <i>S. hominis</i>	T-	Négatif



Gel du 10/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
M121	Positif <i>S. hominis</i>	M142	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M128	Négatif	M143	Positif <i>S. hirsuta</i> , <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M130	Positif <i>S. hominis</i>	M144	Positif <i>S. cruzi</i>
M132	Positif <i>S. hominis</i>	M147	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M134	Positif <i>S. hominis</i>	M148	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M136	Positif <i>S. hominis</i>	M149	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M137	Positif <i>S. hominis</i>	M150	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M139	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	T+	Positif <i>S. hominis</i>
M141	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	T-	Négatif

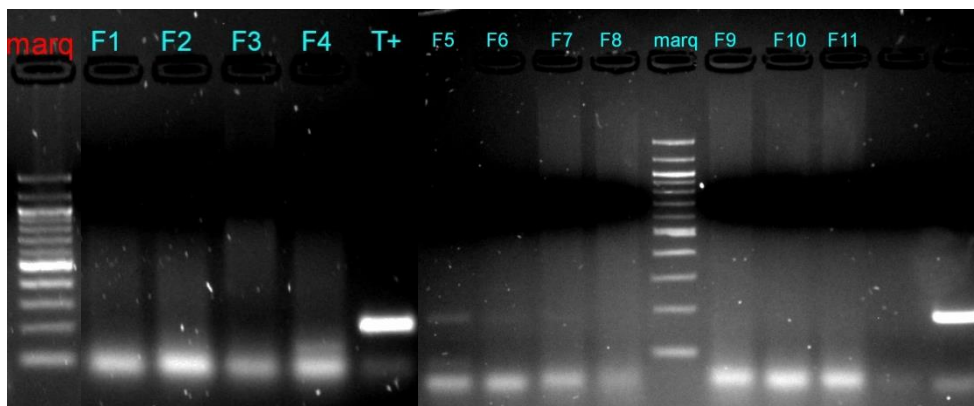


Gel du 14/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
M2	Positif <i>S. hominis</i>	M42	Positif <i>S. hominis</i>
M12	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M45	Positif <i>S. hominis</i>
M16	Négatif	M50	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M19	Négatif	M52	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M23	Positif <i>S. hominis</i>	M54	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M25	Positif <i>S. hominis</i>	M57	Négatif
M27	Négatif	M58	Positif <i>S. hominis</i>
M28	Négatif	M59	Négatif
M29	Négatif	M60	Positif <i>S. hominis</i>
M34	Positif <i>S. hominis</i>	T+	Positif <i>S. hominis</i>
M36	Négatif	T-	Négatif

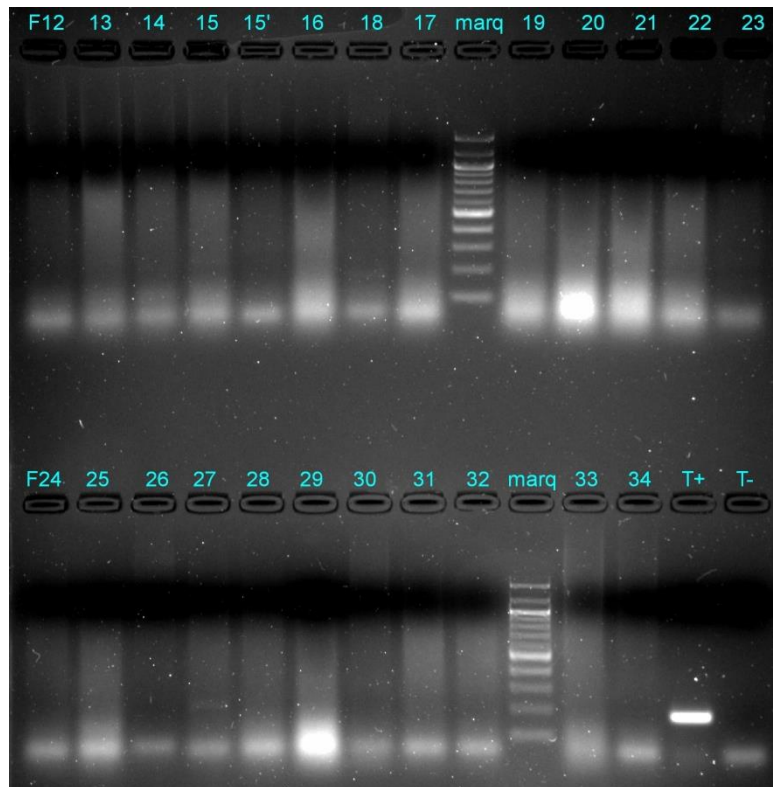


Gel du 14/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
M66	Positif <i>S. hominis</i>	M126	Positif <i>S. hominis</i>
M71	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M127	Positif <i>S. hominis</i> , <i>S. cruzi</i> , <i>S. hirsuta</i>
M80	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M128	Positif <i>S. hominis</i>
M84	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	M131	Négatif
M104	Positif <i>S. hominis</i>	M133	Positif <i>S. hominis</i>
M107	Négatif	M138	Positif <i>S. hominis</i>
M112	Négatif	M140	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M123	Positif <i>S. hominis</i> , <i>S. cruzi</i> , <i>S. hirsuta</i>	M145	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>
M124	Positif <i>S. hominis</i> et <i>S. cruzi</i>	T+	Positif <i>S. hominis</i>
M125	Positif <i>S. cruzi</i>	T-	Négatif

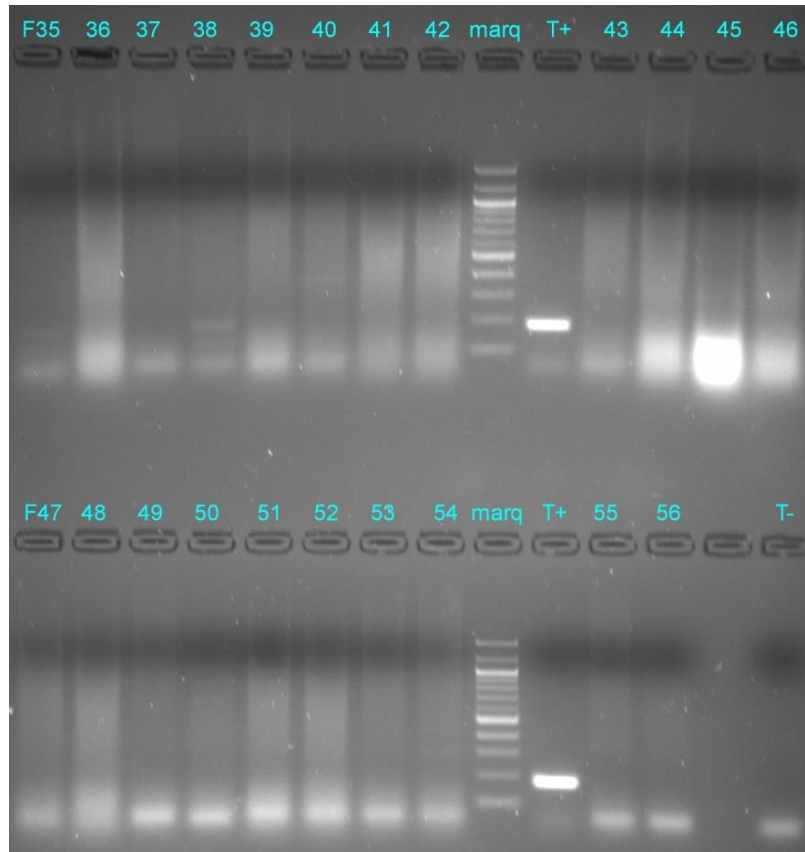
2- Résultats des PCR Multiplex des foetus



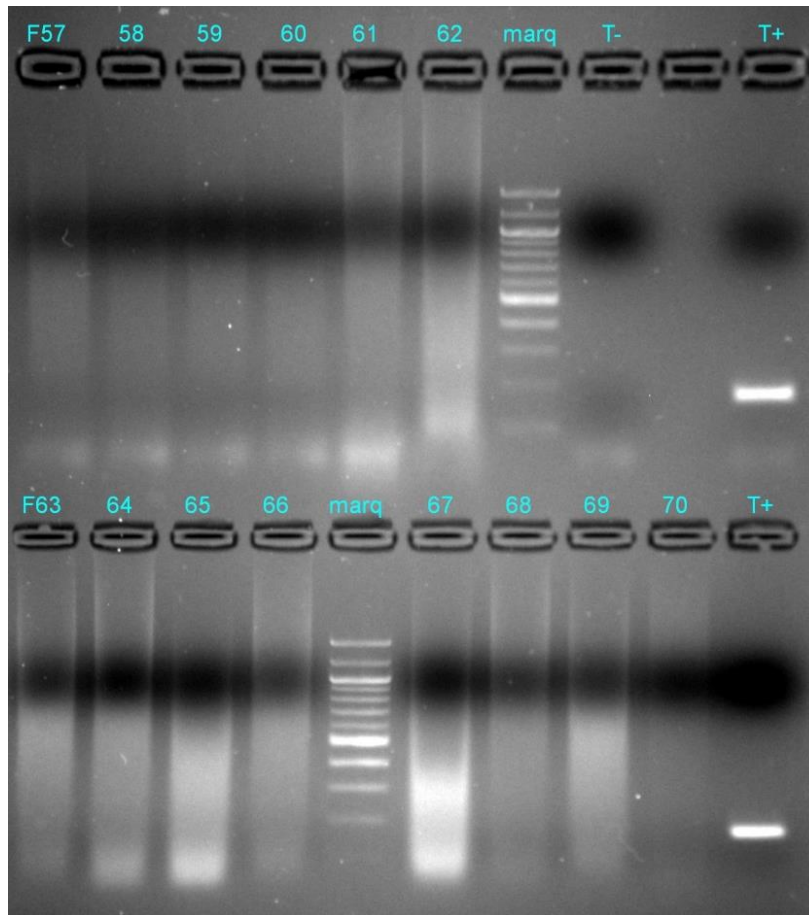
Gel du 10/06/2016	
Echantillon	Résultat
F1	Négatif
F2	Négatif
F3	Négatif
F4	Négatif
F5	Positif <i>S. hominis</i>
F6	Négatif
F7	Négatif
F8	Négatif
F9	Négatif
F10	Négatif
F11	Négatif
T+	Positif <i>S. hominis</i>
T-	Négatif



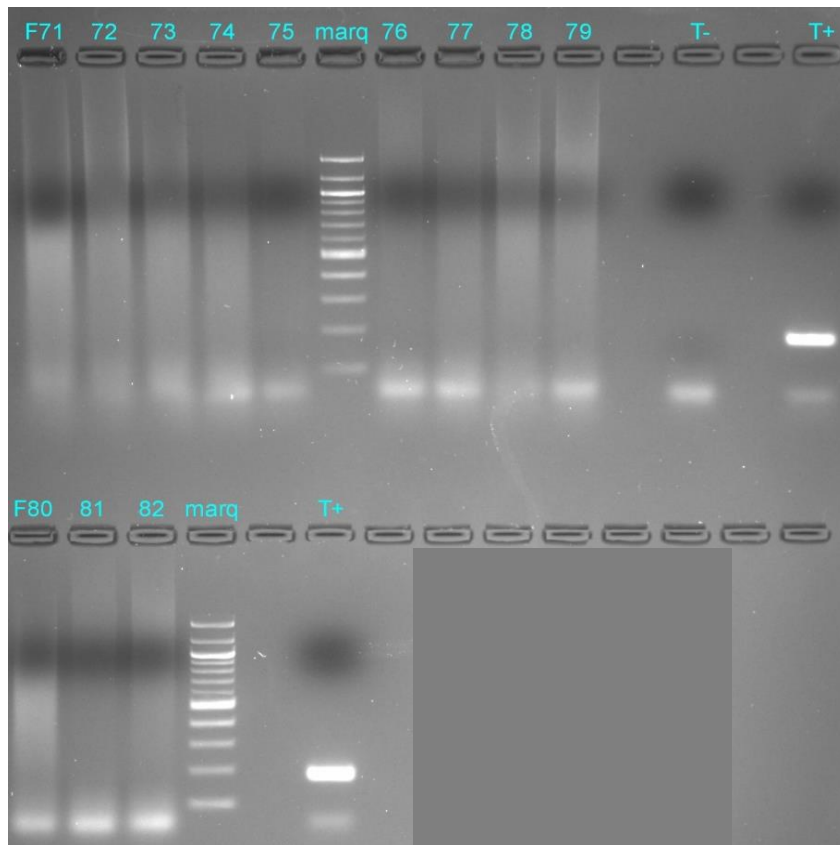
Gel du 13/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
F12	Négatif	F24	Négatif
F13	Négatif	F25	Négatif
F14	Négatif	F26	Négatif
F15	Négatif	F27	Positif <i>S. cruzi</i>
F15'	Négatif	F28	Négatif
F16	Négatif	F29	Négatif
F17	Négatif	F30	Négatif
F18	Positif <i>S. hominis</i>	F31	Négatif
F19	Négatif	F32	Négatif
F20	Négatif	F33	Négatif
F21	Négatif	F34	Négatif
F22	Négatif	T+	Positif <i>S. hominis</i>
F23	Négatif	T-	Négatif



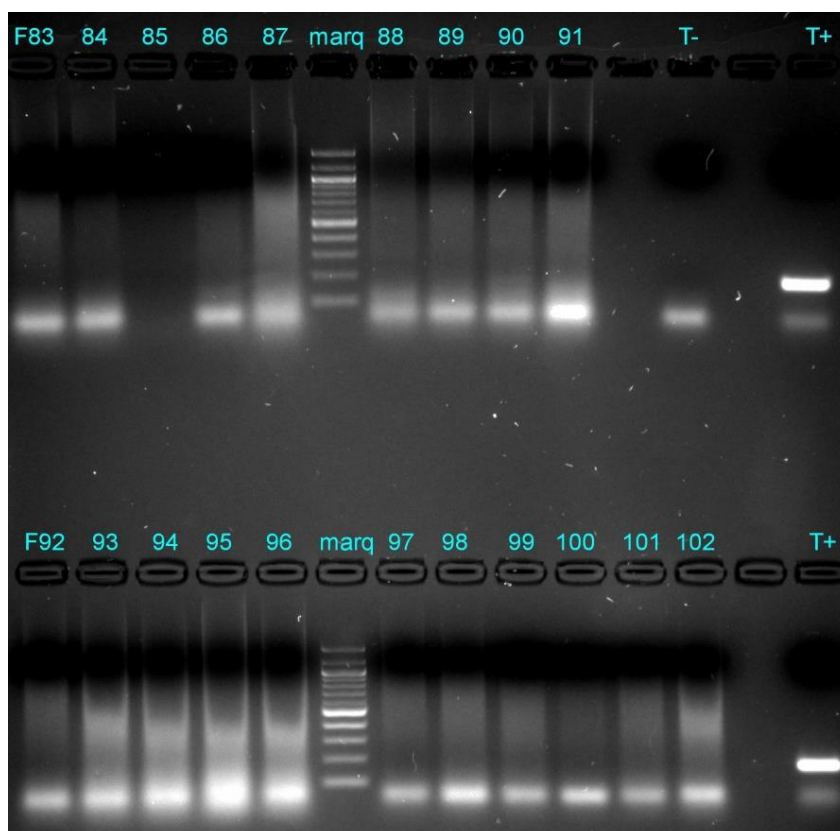
Gel du 13/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
F35	Positif <i>S. hominis</i>	F47	Négatif
F36	Négatif	F48	Négatif
F37	Négatif	F49	Négatif
F38	Positif <i>S. hominis</i>	F50	Négatif
F39	Négatif	F51	Négatif
F40	Négatif	F52	Négatif
F41	Négatif	F53	Négatif
F42	Négatif	F54	Positif <i>S. cruzi</i>
F43	Négatif	F55	Négatif
F44	Négatif	F56	Négatif
F45	Négatif	T+	Positif <i>S. hominis</i>
F46	Négatif	T-	Négatif



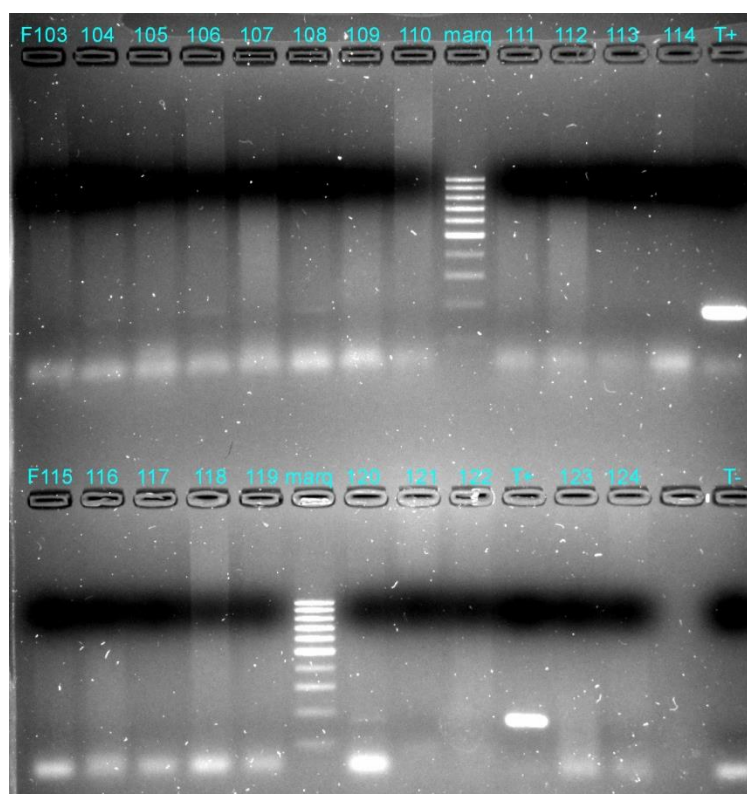
Gel du 13/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
F57	Négatif	F65	Négatif
F58	Négatif	F66	Négatif
F59	Négatif	F67	Négatif
F60	Négatif	F68	Négatif
F62	Négatif	F69	Négatif
F62	Négatif	F70	Négatif
F63	Négatif	T+	Positif <i>S. hominis</i>
F64	Négatif	T-	Négatif



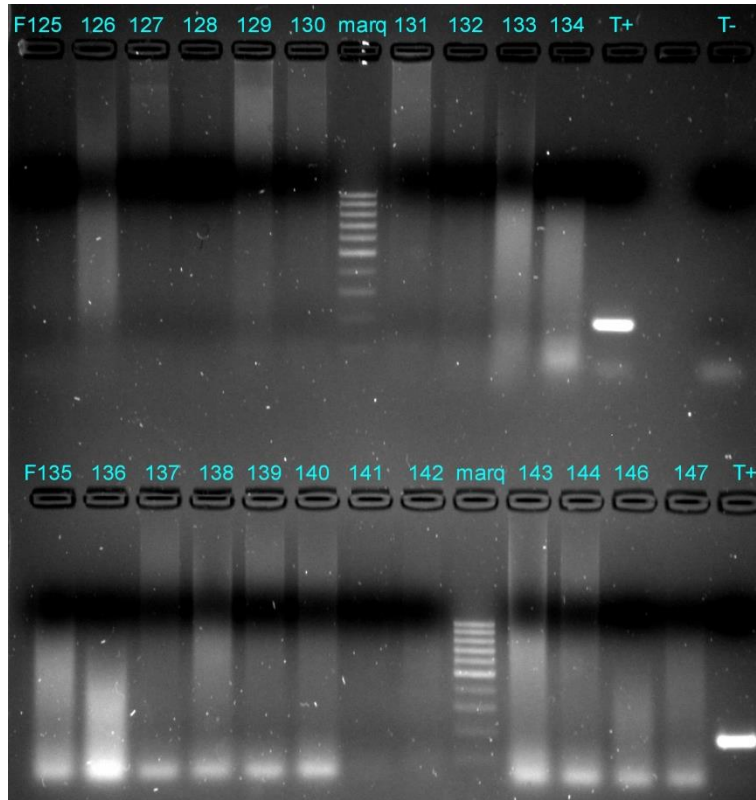
Gel du 13/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
F71	Négatif	F78	Négatif
F72	Négatif	F79	Négatif
F73	Négatif	F80	Négatif
F74	Négatif	F81	Négatif
F75	Négatif	F82	Négatif
F76	Négatif	T+	Positif <i>S. hominis</i>
F77	Négatif	T-	Négatif



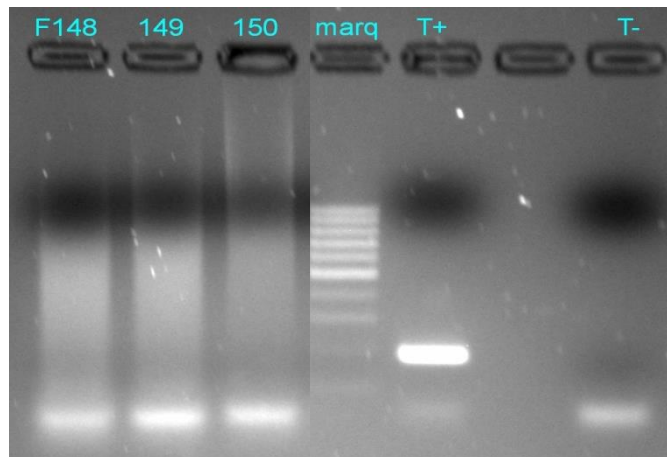
Gel du 13/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
F83	Négatif	F94	Négatif
F84	Négatif	F95	Négatif
F85	Négatif	F96	Négatif
F86	Positif <i>S. hirsuta</i>	F97	Négatif
F87	Négatif	F98	Négatif
F88	Négatif	F99	Négatif
F89	Négatif	F100	Négatif
F90	Positif <i>S. hominis</i>	F101	Négatif
F91	Négatif	F102	Négatif
F92	Négatif	T+	Positif <i>S. hominis</i>
F93	Négatif	T-	Négatif



Gel du 13/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
F103	Négatif	F115	Négatif
F104	Négatif	F116	Négatif
F105	Négatif	F117	Négatif
F106	Positif <i>S. hominis</i>	F118	Négatif
F107	Négatif	F119	Négatif
F108	Positif <i>S. hominis</i>	F120	Positif <i>S. hominis</i>
F109	Négatif	F121	Négatif
F110	Négatif	F122	Négatif
F111	Négatif	F123	Négatif
F112	Négatif	F124	Négatif
F113	Négatif	T+	Positif <i>S. hominis</i>
F114	Négatif	T-	Négatif



Gel du 13/06/2016			
Echantillon	Résultat	Echantillon	Résultat
F125	Négatif	F137	Négatif
F126	Négatif	F138	Négatif
F127	Négatif	F139	Négatif
F128	Négatif	F140	Négatif
F129	Négatif	F141	Négatif
F130	Négatif	F142	Négatif
F131	Négatif	F143	Négatif
F132	Négatif	F144	Négatif
F133	Négatif	F146	Négatif
F134	Négatif	F146	Négatif
F135	Négatif	T+	Positif <i>S. hominis</i>
F136	Négatif	T-	Négatif



Gel du 13/06/2016	
Echantillon	Résultat
F148	Négatif
F149	Négatif
F150	Négatif
T+	Positif <i>S. hominis</i>
T-	Négatif

Annexe 6 : Tableau récapitulatif des données concernant les prélèvements et résultats des analyses

Code race	Nom de la race
23	Salers
24	Bazadaise
34	Limousine
38	Charolaise
39	Croisée mixte
46	Montbéliarde
56	Normande
66	Prim'Holstein
79	Blonde d'Aquitaine

NP : Non prélevé
 NR : Non renseigné
■ : Analyses non réalisées
 + : positif
 - : négatif

Légendes du tableau

MERES							FCETUS						PLACENTAS				
N°	Code Race	Age (mois)	PCR genre	PCR Multiplex			N°	stade de gestation (en tiers)	PCR genre	PCR Multiplex			N°	PCR genre	PCR Multiplex		
				S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>				S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>			S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>
M 1	39	46	+	+	+	-	F 1	1	-	-	-	-	NP				
M 2	39	42	+	-	+	-	F 2	1	-	-	-	-	NP				
M 3	34	78	+	+	+	-	F 3	2	-	-	-	-	P3	-	-	-	-
M 4	66	99	+	+	+	-	F 4	1	-	-	-	-	P4	-	-	-	-
M 5	39	70	+	+	+	-	F 5	1	-	-	+	-	P5	-	-	-	-
M 6	39	118	+	+	+	-	F 6	2	-	-	-	-	P6	-	-	-	-
M 7	34	143	+	+	+	-	F 7	2	-	-	-	-	P7	-	-	-	-
M 8	38	120	+	+	+	-	F 8	2	-	-	-	-	P8	-	-	-	-
M 9	66	100	+	+	-	-	F 9	2	-	-	-	-	P9	-	-	-	-
M 10	66	102	+	+	+	-	F 10	2	-	-	-	-	P10	-	-	-	-
NP	66	64					F 11	3	-	-	-	-	P11	-	-	-	-
M 12	66	75	+	+	+	-	F 12	1	-	-	-	-	P12	-	-	-	-

MERES							FŒTUS						PLACENTAS				
N°	Code Race	Age (mois)	PCR genre	PCR Multiplex			N°	stade de gestation (en tiers)	PCR genre	PCR Multiplex			N°	PCR genre	PCR Multiplex		
				S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>				S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>			S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>
M 13	66	56	+	-	+	-	F 13	1	-	-	-	-	P13	-	-	-	-
M 14	66	48	+	+	+	+	F 14	3	-	-	-	-	P14	-	-	-	-
M 15	66	85	+	+	+	-		2	-	-	-	-	P15	-	-	-	-
							F15'		-	-	-	-					
M 16	34	85	-	-	-	-	F 16	2	-	-	-	-	P16	-	-	-	-
M 17	56	63	+	+	+	-	F 17	2	+	-	-	-	P17	-	-	-	-
M 18	46	75	+	+	+	-	F 18	2	-	-	+	-	P18	-	-	-	-
M 19	34	55	-	-	-	-	F 19	2	-	-	-	-	P19	-	-	-	-
M 20	66	37	+	+	+	-	F 20	1	-	-	-	-	P20	-	-	-	-
M 21	38	123	+	+	+	-	F 21	1	-	-	-	-	P21	-	-	-	-
M 22	66	102	+	+	+	-	F 22	2	-	-	-	-	P22	-	-	-	-
M 23	66	29	-	-	-	+	F 23	3	-	-	-	-	P23	-	-	-	-
M 24	66	28	+	+	+	-	F 24	1	-	-	-	-	P24	-	-	-	-
M 25	66	51	+	-	+	-	F 25	2	-	-	-	-	P25	-	-	-	-
M 26	46	164	+	+	+	-	F 26	3	-	-	-	-	P26	-	-	-	-
M 27	56	30	-	-	-	-	F 27	2	-	+	-	-	P27	-	-	-	-
M 28	56	54	-	-	-	-	F 28	2	-	-	-	-	P28	-	-	-	-
M 29	39	89	-	-	-	-	F 29	1	-	-	-	-	P29	-	-	-	-
M 30	56	82	+	+	-	+	F 30	3	-	-	-	-	P30	-	-	-	-
M 31	39	52	+	-	+	-	F 31	1	-	-	-	-	P31	-	-	-	-
M 32	39	41	+	-	+	-	F 32	1	-	-	-	-	P32	-	-	-	-
M 33	34	36	+	+	+	-	F 33	3	-	-	-	-	P33	-	-	-	-
M 34	39	79	+	-	+	-	F 34	3	-	-	-	-	P34	-	-	-	-
M 35	34	147	+	-	+	-	F 35	3	-	-	+	-	P35	-	-	-	-
M 36	34	35	-	-	-	-	F 36	2	-	-	-	-	P36	-	-	-	-
M 37	66	41	+	+	+	-	F 37	3	-	-	-	-	P37	-	-	-	-
M 38	66	40	+	-	+	-	F 38	3	-	-	+	-	P38	-	-	-	-

MERES							FŒTUS						PLACENTAS				
N°	Code Race	Age (mois)	PCR genre	PCR Multiplex			N°	stade de gestation (en tiers)	PCR genre	PCR Multiplex			N°	PCR genre	PCR Multiplex		
				S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>				S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>			S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>
NP	NR	NR					F 39	3	-	-	-	-	P39	-	-	-	-
M 40	24	145	+	+	+	-	F 40	2	-	-	-	-	P40	-	-	-	-
M 41	46	49	+	-	+	-	F 41	2	-	-	-	-	P41	-	-	-	-
M 42	34	122	+	-	+	-	F 42	2	-	-	-	-	P42	-	-	-	-
M 43	46	77	+	+	+	-	F 43	2	-	-	-	-	P43	-	-	-	-
M 44	39	49	+	+	+	-	F 44	3	-	-	-	-	P44	-	-	-	-
M 45	34	95	+	-	+	-	F 45	3	-	-	-	-	P45	-	-	-	-
M 46	39	113	+	+	+	-	F 46	2	-	-	-	-	P46	-	-	-	-
M 47	46	90	+	+	+	-	F 47	2	-	-	-	-	P47	-	-	-	-
M 48	39	27	+	-	+	-	F 48	1	-	-	-	-	P48	-	-	-	-
M 49	66	24	+	+	+	-	F 49	2	-	-	-	-	P49	-	-	-	-
M 50	66	48	+	+	+	-	F 50	1	-	-	-	-	P50	-	-	-	-
NP	57	108					F 51	2	-	-	-	-	P51	-	-	-	-
M 52	56	53	+	+	+	-	F 52	2	-	-	-	-	P52	-	-	-	-
M 53	46	44	+	-	+	-	F 53	3	-	-	-	-	P53	-	-	-	-
M 54	46	90	+	+	+	-	F 54	3	-	+	-	-	P54	-	-	-	-
							F 55		-	-	-	-					
M 56	46	42	+	+	-	+	F 56	1	-	-	-	-	P56	-	-	-	-
M 57	46	51	+	-	-	-	F 57	1	-	-	-	-	P57	-	-	-	-
M 58	46	54	+	-	+	-	F 58	2	-	-	-	-	P58	-	-	-	-
M 59	34	23	-	-	-	-	F 59	1	-	-	-	-	P59	-	-	-	-
M 60	39	54	+	-	+	-	F 60	1	-	-	-	-	P60	-	-	-	-
M 61	39	44	+	+	-	-	F 61	3	-	-	-	-	P61	-	-	-	-
M 62	34	126	+	+	+	-	F 62	3	-	-	-	-	P62	-	-	-	-
M 63	66	47	+	-	+	-	F 63	3	-	-	-	-	P63	-	-	-	-
M 64	39	155	+	+	+	-	F 64	3	-	-	-	-	P64	-	-	-	-
M 65	38	123	+	+	-	-	F 65	1	-	-	-	-	P65	-	-	-	-

MERES							FŒTUS						PLACENTAS				
N°	Code Race	Age (mois)	PCR genre	PCR Multiplex			N°	stade de gestation (en tiers)	PCR genre	PCR Multiplex			N°	PCR genre	PCR Multiplex		
				S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>				S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>			S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>
M 66	39	169	+	-	+	-	F 66	3	-	-	-	-	P66	-	-	-	-
M 67	39	61	+	-	+	-	F 67	2	-	-	-	-	P67	-	-	-	-
M 68	34	159	+	+	+	-	F 68	3	-	-	-	-	P68	-	-	-	-
M 69	34	133	+	-	+	-	F 69	1	-	-	-	-	P69	-	-	-	-
M 70	34	169	+	+	-	-	F 70	3	-	-	-	-	P70	-	-	-	-
M 71	39	53	+	+	+	-	F 71	2	-	-	-	-	P71	-	-	-	-
M 72	39	68	+	+	+	-	F 72	2	-	-	-	-	P72	-	-	-	-
M 73	39	39	+	+	+	-	F 73	2	-	-	-	-	P73	-	-	-	-
M 74	39	28	+	+	+	-	F 74	1	-	-	-	-	P74	+	-	-	-
M 75	66	41	+	+	-	-	F 75	3	-	-	-	-	P75	-	-	-	-
							F 76		+	-	-	-					
M 77	NR	NR	+	-	+	-	F 77	2	-	-	-	-	P77	-	-	-	-
M 78	66	53	+	-	+	-	F 78	2	-	-	-	-	P78	-	-	-	-
M 79	66	55	+	+	-	-	F 79	2	-	-	-	-	P79	-	-	-	-
M 80	38	97	+	+	+	-	F 80	2	-	-	-	-	P80	-	-	-	-
M 81	79	131	+	+	+	-	F 81	3	-	-	-	-	P81	-	-	-	-
M 82	66	55	+	+	+	-	F 82	3	-	-	-	-	P82	-	-	-	-
M 83	39	23	+	+	-	+	F 83	2	-	-	-	-	P83	-	-	-	-
M 84	46	138	+	+	+	-	F 84	3	-	-	-	-	P84	-	-	-	-
M 85	66	63	+	+	-	-	F 85	2	-	-	-	-	P85	-	-	-	-
M 86	66	58	+	+	+	-	F 86	3	-	-	-	-	P86	-	-	-	-
M 87	39	63	+	+	+	-	F 87	2	-	-	-	-	P87	-	-	-	-
M 88	NR	NR	+	-	+	-	F 88	3	-	-	-	-	P88	-	-	-	-
M 89	34	133	+	+	+	-	F 89	3	-	-	-	-	P89	-	-	-	-
M 90	34	105	+	+	+	-	F 90	3	+	-	+	-	P90	-	-	-	-
M 91	34	121	+	+	+	-	F 91	3	-	-	-	-	P91	-	-	-	-
NP	NR	NR					F 92	3	-	-	-	-	P92	-	-	-	-

MERES							FŒTUS						PLACENTAS				
N°	Code Race	Age (mois)	PCR genre	PCR Multiplex			N°	stade de gestation (en tiers)	PCR genre	PCR Multiplex			N°	PCR genre	PCR Multiplex		
				S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>				S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>			S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>
M 93	66	56	+	+	+	-	F 93	2	-	-	-	-	P93	-	-	-	-
M 94	34	126	+	-	+	-	F 94	2	-	-	-	-	P94	-	-	-	-
M 95	39	61	+	+	+	-	F 95	2	-	-	-	-	P95	-	-	-	-
M 96	46	97	+	+	+	-	F 96	2	-	-	-	-	P96	-	-	-	-
							F 97		-	-	-	-					
M 98	39	61	+	+	+	+	F 98	2	-	-	-	-	P98	-	-	-	-
M 99	39	108	+	+	-	-	F 99	1	-	-	-	-	P99	-	-	-	-
M 100	46	139	+	+	+	-	F 100	1	-	-	-	-	P100	-	-	-	-
	46	139	+	+	+	-	F 101		-	-	-	-					
M 102	23	60	+	+	+	-	F 102	2	-	-	-	-	P102	-	-	-	-
M 103	56	94	+	+	+	-	F 103	2	-	-	-	-	P103	-	-	-	-
M 104	66	31	+	-	+	-	F 104	2	-	-	-	-	P104	-	-	-	-
M 105	56	53	+	+	-	-	F 105	2	-	-	-	-	P105	-	-	-	-
M 106	56	107	+	+	-	-	F 106	2	-	-	+	-	P106	-	-	-	-
M 107	34	155	-	-	-	-	F 107	2	-	-	-	-	P107	-	-	-	-
M 108	34	109	+	+	-	+	F 108	2	-	-	+	-	P108	-	-	-	-
M 109	46	41	+	+	+	-	F 109	2	-	-	-	-	P109	-	-	-	-
M 110	56	37	+	-	+	-	F 110	3	-	-	-	-	P110	-	-	-	-
M 111	39	31	+	+	+	-	F 111	2	-	-	-	-	P111	-	-	-	-
M 112	66	83	-	-	-	-	F 112	2	-	-	-	-	P112	-	-	-	-
M 113	66	54	+	+	-	-	F 113	3	-	-	-	-	P113	-	-	-	-
M 114	66	68	+	+	-	-	F 114	2	-	-	-	-	P114	-	-	-	-
M 115	66	98	+	-	+	-	F 115	3	-	-	-	-	P115	-	-	-	-
M 116	79	47	+	+	+	-	F 116	2	-	-	-	-	P116	-	-	-	-
M 117	34	188	+	+	+	-	F 117	3	-	-	-	-	P117	-	-	-	-
M 118	66	76	+	+	-	-	F 118	2	-	-	-	-	P118	-	-	-	-
M 119	66	38	+	-	+	-	F 119	3	-	-	-	-	P119	-	-	-	-

MERES							FŒTUS						PLACENTAS				
N°	Code Race	Age (mois)	PCR genre	PCR Multiplex			N°	stade de gestation (en tiers)	PCR genre	PCR Multiplex			N°	PCR genre	PCR Multiplex		
				S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>				S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>			S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>
M 120	39	99	+	+	+	-	F 120	3	-	-	+	-	P120	-	-	-	-
M 121	66	48	+	-	+	-	F 121	2	-	-	-	-	P121	-	-	-	-
M 122	38	127	+	-	+	-	F 122	2	-	-	-	-	P122	+	-	-	-
M 123	66	65	+	+	+	+	F 123	3	-	-	-	-	P123	-	-	-	-
M 124	79	96	+	+	+	-	F 124	1	-	-	-	-	P124	-	-	-	-
M 125	39	45	+	+	-	-	F 125	2	-	-	-	-	P125	-	-	-	-
M 126	38	39	+	-	+	-	F 126	2	-	-	-	-	P126	-	-	-	-
M 127	34	126	+	+	+	+	F 127	3	-	-	-	-	P127	-	-	-	-
M 128	66	85	+	-	+	-	F 128	2	-	-	-	-	P128	-	-	-	-
M 129	66	81	+	+	+	-	F 129	3	-	-	-	-	P129	-	-	-	-
M 130	66	64	+	-	+	-	F 130	3	-	-	-	-	P130	-	-	-	-
M 131	66	80	-	-	-	-	F 131	3	-	-	-	-	P131	-	-	-	-
M 132	66	80	+	-	+	-	F 132	2	-	-	-	-	P132	-	-	-	-
M 133	39	47	+	-	+	-	F 133	2	-	-	-	-	P133	-	-	-	-
M 134	39	41	+	-	+	-	F 134	2	-	-	-	-	P134	-	-	-	-
							F 135	2	-	-	-	-					
M 136	39	110	+	-	+	-	F 136	1	-	-	-	-	P136	-	-	-	-
M 137	79	74	+	-	+	-	F 137	3	-	-	-	-	P137	-	-	-	-
M 138	39	64	+	-	+	-	F 138	3	-	-	-	-	P138	-	-	-	-
M 139	39	37	+	+	+	-	F 139	3	-	-	-	-	P139	-	-	-	-
M 140	39	36	+	+	+	-	F 140	3	-	-	-	-	P140	-	-	-	-
M 141	39	35	+	+	+	-	F 141	3	-	-	-	-	P141	-	-	-	-
M 142	39	35	+	+	+	-	F 142	3	-	-	-	-	P142	-	-	-	-
M 143	66	102	+	+	+	+	F 143	3	-	-	-	-	P143	-	-	-	-
M 144	39	36	+	+	-	+	F 144	3	-	-	-	-	P144	-	-	-	-
M 145	66	89	+	+	+	-	F 145	1					P145	-	-	-	-
							F 146		-	-	-	-					

MERES							FŒTUS						PLACENTAS				
N°	Code Race	Age (mois)	PCR genre	PCR Multiplex			N°	stade de gestation (en tiers)	PCR genre	PCR Multiplex			N°	PCR genre	PCR Multiplex		
				S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>				S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>			S. <i>cruzi</i>	S. <i>hominis</i>	S. <i>hirsuta</i>
M 147	66	47	+	+	+	-	F147	2	-	-	-	-	P147	-	-	-	-
M 148	34	186	+	+	+	-	F148	2	-	-	-	-	P148	-	-	-	-
M 149	38	206	+	+	+	-	F149	2	-	-	-	-	P149	-	-	-	-
M 150	66	93	+	+	+	-	F150	3	-	-	-	-	P150	-	-	-	-

BIBLIOGRAPHIE

AGERHOLM J.S., DUBEY J.P. (2014). *Sarcocystis* in a Stillborn Lamb. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 60-63.

ALVIN A., GAJADHAR 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.

BALLAS P. (2015). *Sarcocystis spp.* infection prevalence in the human population of Northwestern France. Master Thesis, Faculté de Médecine de Nantes et Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique. 118 p.

BARONE R. (1980). Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome II : Arthrologie et myologie. Deuxième édition. Vigot., 984 p., ISBN 978 2 71140 410 0.

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

BERTIN M., LEMIEUX D., ROSSERO A., ALBARIC O., WILLEMSE C., CHIESA F., MAGRAS C., CAPPELIER J.M. (2014). *Sarcocystis hominis* est fréquemment associé aux lésions de myosite éosinophilique chez les bovins. *Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants*, 21, 321-324.

BONNES G., DESCLAUDE J., DROGOUL C., GADOUD R., JUSSIAU R., LE LOC'H A., MONTMERAS L., ROBIN G. (2005). Reproduction des animaux d'élevage. Deuxième édition, Educagri éditions : Dijon. 407 p., ISBN 978 2 84444 410 3.

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., LEMIEUX D., BERTIN M. (2015). Sarcosporidiose et myosite éosinophilique : des causes occultes de saisie totale. *Le point vétérinaire : Parasitoses en élevage bovin*, 356, 46-52.

CHEN X., ZUO Y.X., ROSENTHAL B.M., HE Y., CUI L., YANG Z. (2011). *Sarcocystis sinensis* is an ultrastructurally distinct parasite of water buffalo that can cause foodborne illness but cannot complete its life-cycle in human beings. *Veterinary Parasitology*, 178, 35-39.

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, 383-398.

- DESCOTEAUX L., GNEMMI G., COLLOTON J. (2009).** Guide pratique d'échographie pour la reproduction des ruminants. Editions MED'COM., Paris, 83-125, ISBN 978 2 35403 028 5.
- DESSPORTES-LIVAGE I., DATRY A. (2005).** Infections à microsporidies, *Isospora* et *Sarcocystis*. *EMC- Maladies infectieuses*, 2, 178-196.
- DUBEY J. P., VAN WILPE E., CALERO-BERNAL R., VERMA S. K., FAYER R. (2015a).** *Sarcocystis heydorni*, n. sp. (Apicomplexa : Sarcocystidea) with cattle (*Bos Taurus*) and human (*Homo sapiens*) cycle. *Parasitology Research*, 114, 436 p.
- DUBEY J.P., MORE G., WILPE E.V., CALERO-BERNAL R., VERMA S.K. & SCHARES G. (2015b).** *Sarcocystis rommeli* sp. (Apicomplexa: Sarcocystidea) from Cattle (*Bos Taurus*) and its Differentiation from *Sarcocystis hominis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63, 62-68.
- DUBEY J.P., LINDSAY D.S. (2006).** Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. *Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice*, 22, 658-671.
- DUBEY J.P., SPEER C.A., CHARLESTON W.A.G. (1989a).** Ultrastructural Differentiation between Sarcocysts of *Sarcocystis hirsuta* and *Sarcocystis hominis*. *Veterinary Parasitology*, 34, 153-157.
- DUBEY J.P., SPEER C.A., FAYER R. (1989b).** Sarcocystosis of animals and man. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 215 p., ISBN 0 8493 6364 0.
- DUBEY J.P., BERGERON J.A. (1982).** *Sarcocystis* as a cause of Placentitis and Abortion in Cattle. *Veterinary Parasitology*, 19, 315-318.
- EUZEBY J. (1998).** Les Sarcosporidioses zoonotiques : des coccidioses à *Sarcocystis* à la myosite éosinophilique sarcocystique. *Bulletin de la société de pathologie exotique*, 90, 200-204.
- EUZEBY J. (1997).** Les parasites des viandes : épidémiologie, physiopathologie, incidences zoonosiques. Paris : Tec & Doc, 402 p.
- FAYER R., ESPOSITO D.H., DUBEY J.P. (2015).** Human Infections with *Sarcocystis* Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 28, 295-311.
- FAYER R. (2004).** *Sarcocystis* spp. In Human Infections. *Clinical Microbiology Review*, 17, 894-902.
- FAYER R., LEEK R.G., LYNCH G.P. (1982).** Attempted transmission of *Sarcocystis bovicanis* from cows to calves via colostrum. *Journal of Parasitology*, 68, 1127-1129.
- FAYER R. (1980).** Epidemiology of protozoan infections: the coccidian. *Veterinary Parasitology*, 6, 75-103.

- FOREYT W.J. (1986).** Evaluation of decoquinate, lasalocid, and monensin against experimentally induced sarcocystosis in calves. *American Journal of Veterinary Research*, 47, 1674-1676.
- GAJADHAR A.A., MARQUARDT W.C., BLAIR C.D. (1992).** Development of a Model Ribosomal RNA Hybridization Assay for the Detection of *Sarcocystis* and other Coccidia. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 56, 41-46.
- GAJADHAR A.A., YATES W.D., ALLEN J.R. (1987).** Association of eosinophilic myositis with an unusual species of *Sarcocystis* in a beef cow. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 51, 373-378.
- GASBARRE L.C., SUTER P., FAYER R. (1984).** Humoral and cellular immune responses in cattle and sheep inoculated with *Sarcocystis*. *American Journal of Veterinary Research*, 45, 1592-1596.
- GHISLENI G., ROBBA S., GERMANI O., SCANZIANI E. (2006).** Identification and prevalence of *Sarcocystis spp.* cysts in bovine canned meat. *Food control*, 17, 691-694.
- 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, 579-591.
- GÜÇLÜ F., ALDEM-R O.S., GÜLER L. (2004).** Differential identification of cattle *Sarcocystis* spp. By random amplified Polorphic DNA Polymerase chain reaction (RAPD-PCR). *Revue de médecine vétérinaire*, 155, 440-444.
- HONG C.B., GILES R.C., NEWMAN L.E., FAYER R. (1982).** *Sarcocystis* in an aborted bovine fetus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181, 585-589.
- 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, 104 p.
- 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 cater buffalo (*Bubalus bubalis*) in Northern Vietnam. *Veterinary Parasitology*, 166, 314-320.
- LATIF B., AL-DELEMI J.K., MOHAMMED B.S., AL-BAYATI S.M., AL-AMIRY A.M. (1999).** Prévalence of *Sarcocystis spp.* in meat-producing animals in Iraq. *Veterinary Parasitology*, 84, 85-90.
- 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, 136 p.

LEONARD V. (2014). *Facteurs de risque de la sarcosporidiose bovine : étude de cas en Midi-Pyrénées.* Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Toulouse, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 191 p.

MACPHERSON J.M., GAJADHAR A.A. (1994). Specific amplification of *Sarcocystis cruzi* DNA using a randomly primed polymerase chain reaction assay. *Veterinary Parasitology*, 55, 267-277.

McCAUSLAND P., BADMAN R.T., HIDES S., SLEE K.J. (1984). Multiple apparent *Sarcocystis* abortion in four bovine herds. *Cornell University College of Veterinary Medicine*, 74, 146-154.

METWALLY A.M., ABD ELLAH A.R., AL-HOSARY A.A., OMAR M.A. (2014). Microscopical and serological studies on *Sarcocystis* infection with first report of *S. cruzi* in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Assiut, Egypt. *Journal of Parasitic Diseases*, 38, 378-382.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORET, 2009. Guide de classification des sous-produits animaux et de leurs devenir, [en ligne]. Disponible sur : <http://agriculture.gouv.fr/telecharger/46671?token=774557f295d210e674d17dfcec299074>, (consulté le 15/03/2016).

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, 2223-2230.

MORE G., SHARES 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.

MORE G., ABRAHAMOVICH P., JURADO S., BACIGALUPE D., MARIN J.C., RAMBEAUD M., VENTURINI L., VENTURINI M.C. (2011). Prévalence 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, 51-54.

MORE G., BASSO W., BACIGALUPE D., VENTURINI M.C., VENTURINI L. (2008). Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. *Parasitologie Research*, 102, 671-675.

MUNDAY B.L., BLACK H. (1976). Suspected infections of the bovine placenta and foetus. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 51, 129-132.

NIMRI L. (2014). Unusual case presentation of intestinal *Sarcocystis hominis* infection in healthy adult. *Journal of Medical Microbiology Case Reports*, 10, 1099-2001.

- NDIRITU W., CAWTHORN R.J., KIBENGE F.S.B., MARKHAM R.J., HORNEY B.S., CHAN C.B. (1996).** Use of genomic DNA probes for the diagnosis of acute sarcocystosis in experimentally infected cattle. *Veterinary Parasitology*, 62, 9-25.
- NOGUEIRA COSTA G.H., DA COSTA A.J., ZANETTI LOPES W.D., SARAIVA BRESCIANI K.D., DOS SANTOS T.R., ESPER C.R., SANTANA A.E. (2011).** *Toxoplasma gondii*: infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. *Experimental Parasitology*, 172, 277-281.
- NOUROLLAHI FARD S.R., ASGHARI M., NOURI F. (2009).** Survey of *Sarcocystis* infection in slaughtered cattle in Kerman, Iran. *Tropical Animal Health and Production*, 41, 1633-1636.
- PEREZ-CREO A., PANADERO R., LOPEZ C., DIAZ P., VAZQUEZ L., DIEZ-BANOS P., MORRONDO P. (2013).** Prevalence and identity of *Sarcocystis* spp. in roe deer (*Capreolus capreolus*) in Spain: A morphological study. *Research in Veterinary Science*, 95, 1036-1040.
- POULSEN C.S., STENSVOLD C.R. (2014).** Current Status of Epidemiology and Diagnosis of Human Sarcocystosis. *Journal of Clinical Medicine*, 52, 3524-3530.
- PUSTERLA N., MACKIE S., PACKHAM A., CONRAD P.A. (2014).** Serological investigation of transplacental infection with *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* in broodmares. *The Veterinary Journal*, 202, 649-650.
- ROBERTS S.J. (1986).** Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriology). 3rd edition David and Charles inc.: Woostock, 981 p., ISBN 9 9976 7092 2.
- SAVINI G., ROBERTSON I.D., DUNSMORE J.D. (1997).** Class-specific antibody responses in cattle following experimental challenge with sporocysts or merozoites of *Sarcocystis cruzi*. *Veterinary Parasitology*, 72, 121-127.
- 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 pathology*, 64, 319-327.
- SAVINI G., ROBERTSON I.D., DUNSMORE J.D. (1994).** Risk factors associated with the occurrence of sarcocystosis in Western Australia: results of a postal survey. *Preventive Veterinary Medicine*, 19, 137-144.
- SAVINI G., DUNSMORE J.D., ROBERTSON I.D., SENEVIRATNA P. (1992).** The epidemiology of *Sarcocystis* spp. in cattle of Western Australia. *Epidemiology and Infection*, 108, 107-113.
- STOJECKI K., KARAMON J., SROKA J., CENCEK T. (2012).** Molecular diagnosis of *Sarcocystis* spp. Infections. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15, 589-596.
- TENTER A.M. (1995).** Current Research on *Sarcocystis* Species of Domestic Animals. *International Journal of Parasitology*, 4, 1311-1330.

TRAPPE D., STICH A., LANGEHEINECKE A., VON SONNENBURG F., MUNTAU B., SCHAFER J., SLESAK G. (2014). Suspected new wave of muscular sarcocystosis in travellers returning from Tioman Island, Malaysia, May 2014. *Eurosurveillance* [en ligne], 1-3. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20816> (consulté le 14/03/2016).

UGGLA A., BUXTON D. (1990). Immune responses against *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infections in ruminants: diagnosis and prospects for vaccination. *Revue Scientifique et Technique de l'Office Internationale des Epizooties*, 9, 441-462.

VANGEEL L., HOUF K., GELHHOF 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, 224-230.

VIJAYAMMA T., DISSANAIKE A.S. (1978). Antibodies to *Sarcocystis* in Malaysians. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, 303-306.

WIENGCHAROEN J., ANDREW THOMPSON R.C., NAKTHONG C., RATTANAKORN P., SUKTHANA Y. (2011). Transplacental transmission in cattle: is *Toxoplasma gondii* less potent than *Neospora caninum*. *Parasitology Research*, 108, 1235-1241.

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., HEN X., YANG L., HE Y., JIANG R., ROSENTHAL B.M., LUAN P., ATTWOOD S.W., ZUO Y., HANG Y.P., YANG Z. (2009). Non-invasive methods for identifying oocysts of *Sarcocystis* spp. from definitive hosts. *Parasitology International*, 58, 293-296.

ZUO Y.X., YANG Z.Q. (2015). The validity of *Sarcocystis sinensis*. *Zoological Research*, 36, 119-111.

Vu: L'enseignant Rapporteur

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

Pr. Cappeller Jean-Michel
Dpt Santé des Animaux d'élevages
et Santé publique
HQA - UMR SECALIM

Vu: La Directrice Générale

De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Nantes Atlantique Oniris
D. BUZONI-GATEL



Nantes, le 09/09/2016

Vu:

Le Président de la Thèse

Professeur Didier LEPELLETIER



Vu:

Le Doyen de la Faculté de
Médecine de Nantes

Professeur Pascale JOLLIET



Vu et permis d'imprimer

NOM : POIRIER
Prénom : Léa

SARCOSPORIDIOSE BOVINE :
ETUDE DE LA TRANSMISSION TRANSPLACENTAIRE
BOVINE SARCOCYSTOSIS:
STUDY OF THE TRANSPLACENTAL TRANSMISSION

RESUME

Les bovins adultes présentent une très forte prévalence pour la sarcosporidiose. L'objectif de cette étude est d'explorer la possibilité d'une transmission transplacentaire de la sarcosporidiose en recherchant le parasite dans les muscles de fœtus et dans le placenta. Les analyses PCR menées sur 150 fœtus, leurs mères et les placentas nous ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, que 8 % des fœtus possédaient le parasite dans leurs tissus musculaires muscles (contre 93,6 % chez les mères) et que 1,4 % des placentas étaient contaminés. La transmission verticale n'explique donc pas à elle seule la forte prévalence observée chez les adultes. Les analyses n'ont pas montré d'effet de l'âge de la mère, du stade de gestation ou de l'espèce de *Sarcocystis* sur la transmission transplacentaire. Bien que leur contamination soit minime, une bonne gestion des placentas après la mise bas est néanmoins conseillée afin de diminuer les risques de perpétuation du cycle, à la mise bas, par ingestion par des carnivores domestiques.

MOTS CLES

Sarcosporidiose, *Sarcocystis*, bovin, fœtus, placenta, transmission transplacentaire, parasite, prévalence, réaction de polymérisation.

SUMMARY

Adult cattle present a very high prevalence for sarcocystiosis. The objective of this study is to understand if there is a transplacental transmission of sarcocystiosis by looking for the parasite in the muscles of fetuses and in placentas. PCR analyses were led on 150 fetuses, their mothers and their placentas. It allowed us to highlight for the first time that 8 % of fetuses had the parasite in their muscular tissues against 93.6 % for the mothers and that 1.4 % of placentas were contaminated. Yet, the vertical transmission is not sufficient to explain the high prevalence observed among adults. Our analyses didn't reveal any effect related to the age of the mothers, the stage of gestation or the species of *Sarcocystis* on transplacental transmission. Although the level of transmission is very low, a good management of placentas after the birth is recommended to decrease the risk factor of cycle perpetuation by domestic carnivores' ingestions.

KEY WORDS

Sarcocystiosis, *Sarcocystis*, cattle, fetus, placenta, transplacental transmission, prevalence, polymerisation reaction.

JURY

Président : Monsieur Didier LEPELLETIER, Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

Rapporteur : Monsieur Jean-Michel CAPPELIER, Professeur à Oniris-Nantes

Assesseur : Monsieur Albert AGOULON, Maître de conférences à Oniris-Nantes

Membre invité : Monsieur Nicolas OUDOT, Vétérinaire conseil à Interbev Pays de la Loire

ADRESSE DE L'AUTEUR

105 Avenue de la Forêt
72110 Bonnétable

Imprimeur

Corep