



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 12265](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/12265)

**To cite this version :**

Flandrin, Camille. *Etude de la prévalence de la sarcosporidiose chez les bovins abattus en région Midi-Pyrénées*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 96 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# ETUDE DE LA PRÉVALENCE DE LA SARCOSPORIDIOSE CHEZ LES BOVINS ABATTUS EN RÉGION MIDI-PYRÉNÉES

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**FLANDRIN Camille**  
Née, le 23 septembre 1988 à CAEN (14)

---

**Directeur de thèse : Mme Geneviève BÉNARD**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Gérard CAMPISTRON**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**Mme Geneviève BÉNARD**  
**M. Emmanuel LIÉNARD**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

**Directeur** : M. Alain MILON

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

#### MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

#### MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
- Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

#### MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
- M. **DAHAN Julien**, *Médecine Interne*
- Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

#### ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*

## Remerciements

**A notre président de thèse,**

**A Monsieur le Professeur Gérard CAMPISTRON**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Physiologie-Hématologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

*Hommages respectueux.*

**A notre jury de thèse,**

**A Madame le Professeur Geneviève BÉNARD**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse et d'encadrer ce travail.

Pour son soutien et son intérêt stimulant pour la recherche,

*En témoignage de notre sincère reconnaissance.*

**A Monsieur le Professeur Emmanuel LIÉNARD**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Parasitologie

Qui nous a fait l'honneur d'apporter sa contribution à la direction de notre thèse et de prendre part à notre jury.

*Sincères remerciements.*

A toutes les personnes ayant aidé à l'aboutissement de cette thèse,

A Guy Patrier, pour avoir été à l'origine de ce sujet de thèse.

A Karen Statkiewicz, pour avoir soutenu ce projet avec l'aide de Marie Christophe.

A Alain Deloly, pour avoir fait les colorations et participé aux travaux d'échantillonnage, de digestion...

A Christelle Grisez, pour m'avoir formée aux techniques de biologie moléculaire et encadrée.

A Françoise Prévot, pour m'avoir aidée pendant mes travaux.

A Philippe Jacquiet, pour ses conseils sur la PCR.

A Jean-Michel Cappelier, pour nous avoir fourni un échantillon positif pour *S. hominis*.

A Tamara Ducry, pour nous avoir fourni deux échantillons positifs pour *T. gondii*.

A Jonathan d'Ambrosio, pour avoir échantillonné une grande partie des prélèvements.

A Lucie Laprèvote, Katia Juste, Lorelei Cazajoux pour m'avoir aidée à trier et numéroter les prélèvements.

A Véronique Léonard, pour avoir partagé cette thèse avec moi.

A toute ma famille,

A mes parents, pour m'avoir toujours soutenue, encouragée et motivée à chaque étape de ma vie. Merci de m'avoir donné les moyens d'arriver jusque-là.

A Grand-père et Mana, qui m'ont accompagnée de leurs pensées tout au long de mes études.

A ma sœur Amélie, séparées par plusieurs centaines de kilomètres mais toujours aussi proche, je t'aime fort.

A mes amis,

A Céline, Mathieu, Guillaume... pour toutes ces années d'amitiés

A mes amis de prépa : Mathilde, Priscilla, Muriel, Maria, Pauline... et au traditionnel resto de Noël

Au GDB : A Lorelei, pour les gros goûters et notre amour commun pour les comédies romantiques crétines et la SF.

A Lucie Tataa, pour toutes ces heures de coutures et cette semaine de folie aux urgences qui nous a valu le titre de « bande des joyeux drilles ».

A Véronique, la meilleure grosse lourde de rurale et la meilleure femme.

A Lucie, la plus grande vendeuse de rêve du monde.

A Katia, parce que tu commences à vendre encore plus de rêve que Lucie en étant toujours la première : première à faire un rempla, première à se marier...

A Damien, parce qu'une mamie n'est rien sans un papy et parce qu'on est les meilleurs au canoë

A mes docteurs : Perle, Amandine, Cécile et Florence qui m'ont fait débiter cette merveilleuse aventure à l'ENVT

A mes poulots : Eve, Amandine, Mahaut, Louis, Pauline et Rémi, la relève

A Marcelin, Winnie, Léa, Avril, Chloé, Calinou, Tanooga, Lenny, Kira, Wilson, Oréo et Pixel... et à toutes mes futures boules de poils

A tous les cochons d'inde, parce que vous êtes à l'origine de ma vocation.

A Nirmal, pour m'avoir soutenu pendant toutes ses années où je faisais passer les études, les rotations en cliniques, la thèse... avant tout le reste. Maintenant, une nouvelle vie s'offre à nous.

# Table des matières

---

Liste des Figures.....	10
Liste des Photos.....	11
Liste des Tableaux.....	12
Liste des Annexes.....	13
Liste des Abréviations.....	14
Introduction.....	<b>15</b>
Partie A : La sarcosporidiose bovine, étude bibliographique .....	17
I. Présentation générale .....	17
A. Systématique.....	17
B. Historique .....	17
C. Importance .....	17
II. Etiologie .....	18
A. Cycle évolutif .....	19
1. Etapes du cycle chez l'hôte intermédiaire.....	19
2. Etapes du cycle chez l'hôte définitif.....	21
B. Morphologie des différents stades .....	22
1. Ookystes.....	22
2. Sporocystes .....	22
3. Kyste.....	24
III. Epidémiologie descriptive .....	25
A. Prévalence de <i>Sarcocystis</i> spp.....	25
B. Prévalence par espèce de <i>Sarcocystis</i> .....	25
IV. Etude clinique .....	26
A. Symptômes chez l'hôte intermédiaire : le bovin .....	26
1. Sarcosporidiose aiguë.....	26
2. Sarcosporidiose musculaire chronique.....	28
B. Symptômes chez l'hôte définitif.....	30
1. Chez les animaux : chien et chat.....	30
2. Chez l'homme : importance en santé publique .....	31
V. Diagnostic .....	32
A. Diagnostic clinique.....	32
B. Diagnostic biochimique .....	33

C.	Diagnostic hématologique .....	33
D.	Diagnostic microscopique chez l'hôte intermédiaire .....	33
1.	La microscopie optique .....	33
2.	La microscopie électronique.....	35
E.	Diagnostic sérologique chez l'hôte intermédiaire .....	41
1.	L'IHAT (Indirect Hemmaglutination Antibody Test) .....	42
2.	L'AGID (Agar Gel ImmunoDiffusion).....	42
3.	L'IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test).....	42
4.	L'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	43
F.	Diagnostic moléculaire chez l'hôte intermédiaire.....	44
1.	La PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	45
2.	La PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) .....	45
3.	La PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) .....	46
4.	LA PCR multiplex en temps réel.....	46
5.	Le séquençage de l'ADN.....	47
G.	Diagnostic de troupeau chez les hôtes intermédiaires .....	48
H.	Diagnostic macroscopique chez l'hôte intermédiaire de la sarcosporidiose chronique : la myosite éosinophilique .....	48
I.	Diagnostic de la sarcosporidiose chez l'hôte définitif au stade parasitaire.....	50
1.	La coproscopie.....	50
2.	L'histologie .....	51
3.	La PCR .....	51
VI.	Moyens de lutte .....	51
A.	Prophylaxie médicale.....	51
B.	Prophylaxie sanitaire.....	52
1.	Chez l'hôte intermédiaire.....	52
2.	Chez l'hôte définitif .....	52
VII.	Importance économique .....	54
A.	Sarcosporidiose clinique ou sub-clinique .....	54
B.	Saisies à l'abattoir pour « lésions évoquant la sarcosporidiose ».....	54
1.	Nature de la saisie.....	54
2.	Définitions réglementaires concernant la saisie pour sarcosporidiose .....	55
3.	Suivi réglementaire des saisies pour sarcosporidiose au sein de l'Union Européenne.....	55
4.	Gestion de la sarcosporidiose en Midi-Pyrénées.....	56

Partie B : Etude expérimentale.....	58
I. Méthode histologique .....	58
A. Matériel et méthode .....	58
B. Résultats.....	58
C. Discussion.....	61
II. Méthode moléculaire .....	64
A. Matériel et méthode .....	64
1. Préparation des échantillons .....	64
2. Extraction de l'ADN .....	65
3. Choix des amorces et des sondes.....	66
4. Amplification de l'ADN .....	67
B. Résultats.....	68
C. Discussion.....	69
III. Séquençage du gène de l'ARN 18S.....	72
A. Matériel et méthode .....	72
1. Purification des échantillons .....	72
2. Séquençage.....	72
B. Résultats.....	73
C. Discussion.....	76
Conclusion.....	77
Annexes.....	86

# Liste des Figures

---

Figure 1 : Cycle des différentes espèces de sarcosporidies des bovins. ....	18
Figure 2 : Cycle d'après Dubey, Lindsay, 2006.....	19
Figure 3 : Schéma des étapes du cycle chez l'hôte intermédiaire.....	20
Figure 4 : Schéma des étapes du cycle chez l'hôte définitif.....	21
Figure 5 : Schéma d'un ookyste .....	22
Figure 6 : Schéma d'un sporocyste .....	23
Figure 7 : Schéma d'un kyste sarcosporidien .....	24
Figure 8 : Schéma de la pénétration du bradyzoïte dans la cellule hôte .....	36
Figure 9 : Schéma de la paroi kystique (détails) .....	37
Figure 10 : Schéma d'un bradyzoïte .....	38
Figure 11 : Carte des prévalences par abattoir (google maps) .....	63
Figure 12 : Alignement du domaine partiel 18S pour les espèces <i>S. hominis</i> et <i>S. sinensis</i> .... .....	74
Figure 13 : Arbre de Neighbor-Joining enraciné du domaine partiel 18S présentant les positions respectives de quatre espèces de <i>Sarcocystis</i> sp. ( <i>S. hominis</i> , <i>S. hominis-like</i> , <i>S.</i> <i>cruzi</i> , <i>S. hirsuta</i> , <i>S. sinensis</i> ).....	75

# Liste des Photos

---

Photo 1 : Kyste .....	24
Photo 2 : Carcasse présentant des lésions de myosite éosinophilique .....	29
Photo 3 : Détail de lésion de myosite éosinophilique .....	29
Photo 4 : Paroi kystique (échelle : 10 µm) .....	36
Photo 5 : Granulome (échelle : 500 µm).....	40
Photo 6 : A gauche, kyste à paroi épaisse = <i>S. hirsuta</i> ou <i>S. hominis</i> (échelle : 50 µm).	
Photo 7 : A droite, kyste à paroi fine = <i>S. cruzi</i> (échelle 10 µm).....	59
Photo 8 : Mélange de la solution de digestion et du broyat à l'étuve.....	64
Photo 9 : Système de filtration et ampoules à décanter .....	64
Photo 10 : Incubation des échantillons au bloc chauffant .....	65
Photo 11 : Echantillons dans la centrifugeuse .....	65

# Liste des Tableaux

---

Tableau 1 : Hôtes intermédiaires et définitifs des différentes espèces de sarcosporidies d'après Uggla, Buxton, 1990. ....	18
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des tailles des différents éléments de la paroi des kystes sarcosporidiens .....	38
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différentes méthodes diagnostiques de la sarcosporidiose chez l'hôte intermédiaire .....	50
Tableau 4 : Résultats de l'analyse microscopique des coupes histologiques classés par abattoir de prélèvement.....	59
Tableau 5 : Résultats de l'analyse microscopique des coupes histologiques classés par type de paroi des kystes et par abattoir de prélèvement. ....	59
Tableau 6 : Résultats de l'analyse microscopique des coupes histologiques présentant à la fois des kystes à paroi fine et des kystes à paroi épaisse classés par abattoir de prélèvement. ....	60
Tableau 7 : Résultats de l'analyse microscopique des coupes histologiques classés selon le nombre de kystes à paroi fine observés sur l'échantillon et par abattoir de prélèvement .....	60
Tableau 8 : Résultats de l'analyse microscopique des coupes histologiques classés selon le nombre de kystes à paroi épaisse observés sur l'échantillon et par abattoir de prélèvement .....	60
Tableau 9 : Comparaison des résultats histologiques et moléculaires pour les kystes à paroi fine : <i>S. cruzi</i> .....	69

## Liste des Annexes

---

Annexe 1 : Protocole d'inclusion à la paraffine

Annexe 2 : Protocole de coloration de Lillie et Pasternack

Annexe 3 : Protocole de digestion pepsique

Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN

Annexe 5 : Protocole de PCR multiplex en temps réel *Sarcocystis* spp.

Annexe 6 : Protocole de PCR en temps réel *Sarcocystis hominis* et *Sarcocystis sinensis*

Annexe 7 : Protocole de PCR en temps réel *Toxoplasma gondii*.

Annexe 8 : Protocole de purification des produits PCR

## Liste des Abréviations

---

AGID : Agar Gel Immunodiffusion

ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomal

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

EFSA : European Food Safety Authority

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbant Assay

FAR : Fonds d'Assainissement Régional

GMQ : Gain Moyen Quotidien

IFAT : Immunofluorescence Antibody Test

IHAT : Indirect Hemmaglutination Antibody Test

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor 1

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

Interbev : Association nationale interprofessionnelle du bétail et des viandes

InterSud : Interprofession régionale du bétail et des viandes de Midi-Pyrénées

LCM : Laser Capture Microdissection

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCR-RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

PCR-RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

OP : Organisation de Producteurs

Sp. : Espèce (*species*)

Spp. : Espèces (*species pluralis*)

VPN : Valeur Prédictive Négative

VPP : Valeur Prédictive Positive

# Introduction

---

La sarcosporidiose est une affection parasitaire due à des protozoaires du genre *Sarcocystis* infestant l'homme et de nombreuses espèces animales. Ces coccidies, de type kystogène, ont un cycle hétéroxène obligatoire avec un hôte intermédiaire herbivore ou omnivore et un hôte définitif carnivore ou omnivore.

Cette parasitose est commune chez les ruminants et a une distribution mondiale. 4 espèces ont été décrites chez les bovins : *S. cruzi*, *S. hirsuta*, *S. hominis* et *S. sinensis*. Chez le bovin, hôte intermédiaire, le parasite se localise sous forme de kystes dans les muscles. Chez le chien, le chat ou l'homme, hôtes définitifs, il se trouve dans l'intestin. Dans la majorité des cas, il n'y a aucune conséquence clinique associée à l'infestation. Cependant, chez les bovins, on peut observer une perte de poids, une anémie, des avortements. Il arrive également que les bovins infestés développent des lésions musculaires appelées lésions de myosite éosinophilique, découvertes à l'abattoir. Celles-ci sont responsables de saisies partielles ou totales. Chez l'homme infesté, des troubles gastro-intestinaux ont été décrits.

La majorité des bovins est infestée par des sarcosporidies mais seule une minorité développe des lésions de myosite éosinophilique. Cependant, depuis 2010, le FAR (Fonds d'Assainissement Régional) d'InterSud (Interprofession Régionale du bétail et des viandes de Midi-Pyrénées) a vu le nombre de cas de saisie augmenter fortement. Le FAR assure une prise en charge partielle des pertes financières liées à certaines saisies de carcasses pour cause sanitaire identifiée de manière exhaustive contre une cotisation individuelle de chaque éleveur adhérent (1,50€ par bovin abattu). Les causes sanitaires sont : la cysticercose, la dégénérescence musculaire au sens de la fibrolipomatose, l'ictère, la mélanose, la myosite éosinophilique (sarcosporidiose) et certains processus tumoraux. Or, avec l'augmentation des cas de sarcosporidiose, le nombre de demandes d'indemnisation des éleveurs augmente. La sarcosporidiose représente 58% des motifs de saisies pris en charge par le FAR et cela a un véritable impact économique pour ce fonds.

Le diagnostic de la sarcosporidiose repose sur des méthodes de microscopie pour rechercher les kystes dans les muscles, des méthodes de sérologie pour rechercher les anticorps, des méthodes moléculaires pour rechercher le génome du parasite ou des méthodes macroscopiques pour rechercher les lésions de myosite éosinophilique. Cependant, aucune méthode diagnostique n'est disponible en routine.

Le but de cette étude est de faire le point sur la sarcosporidiose bovine ainsi que sur les méthodes diagnostiques pour ensuite les appliquer afin de déterminer la prévalence de la sarcosporidiose ainsi que la prévalence de chaque espèce de sarcosporidies chez les bovins abattus en Midi-Pyrénées et ensuite mettre en place une prophylaxie et des moyens de lutte raisonnée selon l'hôte définitif impliqué. Pour cela, l'histologie, la PCR et le séquençage seront utilisées. En effet, ces méthodes

sont complémentaires et ce sont les seules méthodes diagnostiques permettant la mise en évidence des kystes et l'identification des espèces de sarcosporidies.

# Partie A : La sarcosporidiose bovine, étude bibliographique

---

## I. Présentation générale

### A. Systématique

La sarcosporidiose bovine est due à des coccidies, appartenant au phylum Apicomplexa, à la classe des Conoidasida, à la sous-classe des Coccidia, à l'ordre des Eucoccidiorida, au sous-ordre des Eimeriorina, à la famille des Sarcocystidae et à la sous famille des Sarcocystinae et au genre *Sarcocystis* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Il existe plus de 130 espèces de sarcosporidies pouvant infester les mammifères, les oiseaux et les animaux poïkilothermes. Les espèces ayant le bovin comme hôte intermédiaire sont : *Sarcocystis cruzi* (syn. *Sarcocystis bovi-hominis*), *Sarcocystis hirsuta* (syn. *Sarcocystis bovis-felis*), *Sarcocystis hominis* (syn. *Sarcocystis bovi-hominis*) et *Sarcocystis sinensis*.

Avec l'ancienne nomenclature, les parasites qui les déterminent étaient désignés par un binôme ayant pour dénomination spécifique, le nom linnéen de l'hôte intermédiaire et celui de l'hôte définitif : par exemple, *Sarcocystis bovi-hominis*, dont l'hôte intermédiaire est le bovin et l'hôte définitif l'homme ; cependant cette terminologie, qui viole le principe de la loi de priorité régissant les dénominations zoologiques, n'est plus admise (Euzéby, 1998).

### B. Historique

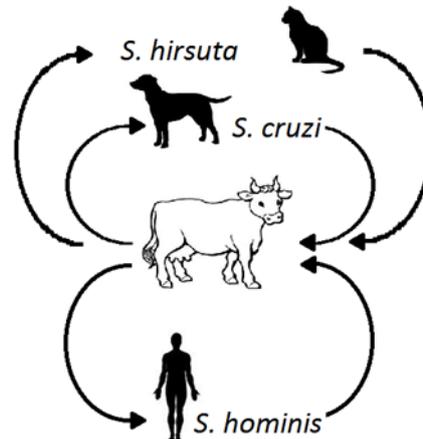
Les kystes sarcosporidiens ont été observés pour la première fois en 1843 par F. Miescher dans les muscles d'une souris grise. Puis, en 1865, une nouvelle espèce a été trouvée chez le porc par Kühn. Ce n'est qu'en 1967 que les bradyzoïtes ont été étudiés au microscope électronique à transmission et que les organites, qu'ils contenaient, ont été décrits par J. Senaud. La gamétogonie a ensuite été démontrée in vitro en 1972 par R. Fayer. Le cycle parasitaire a été décrit la même année par M. Rommel (Fayer, 2004).

### C. Importance

La sarcosporidiose est une des maladies parasitaires touchant le plus le bétail (bovins, ovins, caprins, porcins). Sa distribution est mondiale. De plus, certaines espèces (*S. hominis*, *S. sui-hominis*, avec pour hôtes intermédiaires respectifs les

bovins et les porcins) sont à l'origine de zoonoses et représenteraient un véritable danger pour la santé publique. Cependant, c'est une maladie peu étudiée car elle provoque peu ou pas de signes cliniques chez les bovins et entraîne uniquement des saisies partielles ou totales sur les carcasses de bovins à l'abattoir.

## II. Etiologie



**Figure 1 : Cycle des principales espèces de sarcosporidies des bovins.**

Le cycle est dixène, de type « prédateur-proie » avec un hôte intermédiaire herbivore : dans notre cas le bovin, et un hôte définitif carnivore : pour *S. cruzi* le chien, pour *S. hirsuta* le chat, et pour *S. hominis* l'homme. *S. sinensis* est une autre espèce de sarcosporidie ayant pour hôte intermédiaire le bovin mais son hôte définitif est encore inconnu. De plus, cette espèce reste peu étudiée car elle a souvent été confondue avec *S. hominis* (Chen et al., 2011; Moré et al., 2013).

Un même hôte intermédiaire peut être infesté par plusieurs espèces de sarcosporidies en même temps et une espèce de sarcosporidie peut infester plusieurs espèces d'hôtes intermédiaires, par exemple *S. cruzi* peut infester les bovins domestiques : *Bos taurus* et les buffles d'eau (Xiang et al., 2011), même si on considère que les espèces de sarcosporidies sont relativement spécifiques d'un hôte (Jehle et al., 2009). Pour leur hôte définitif, les espèces de sarcosporidies sont spécifiques d'une famille : par exemple, les canidés pour *S. cruzi*.

Hôtes intermédiaires	Espèce de sarcosporidie	Hôtes définitifs
Bovin + les genres <i>Bos</i> , <i>Bison</i> et <i>Bubalus</i> (Domenis et al., 2011)	<i>S. cruzi</i>	Chien, loup, coyote, renard (canidés)
	<i>S. hirsuta</i>	Chat, chat sauvage (félidés)
	<i>S. hominis</i>	Homme, autres primates
Bovin + Buffle d'eau	<i>S. sinensis</i>	inconnu

**Tableau 1 : Hôtes intermédiaires et définitifs des différentes espèces de sarcosporidies d'après Uggl, Buxton, 1990.**

## A. Cycle évolutif

Les sarcosporidies sont des parasites obligatoirement intracellulaires avec un cycle parasitaire en 3 étapes, typique des coccidies :

- mérogonie: reproduction asexuée
- gamétogonie: reproduction sexuée
- sporogonie: divisions donnant naissance aux formes infectieuses

Le parasite réalise sa multiplication asexuée dans les tissus de son hôte intermédiaire et sa reproduction sexuée dans les cellules épithéliales du tube digestif de son hôte définitif.

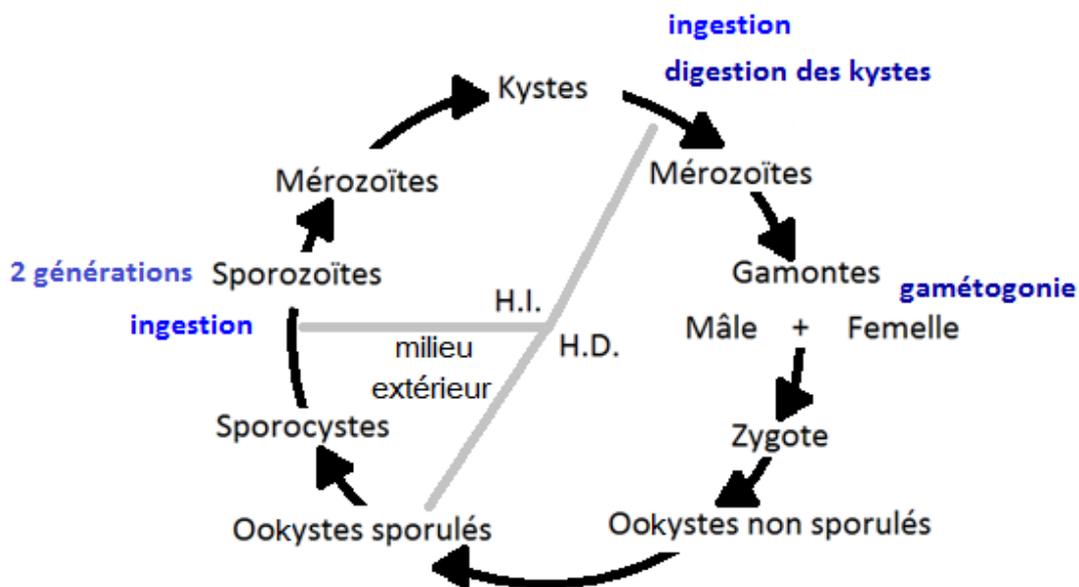


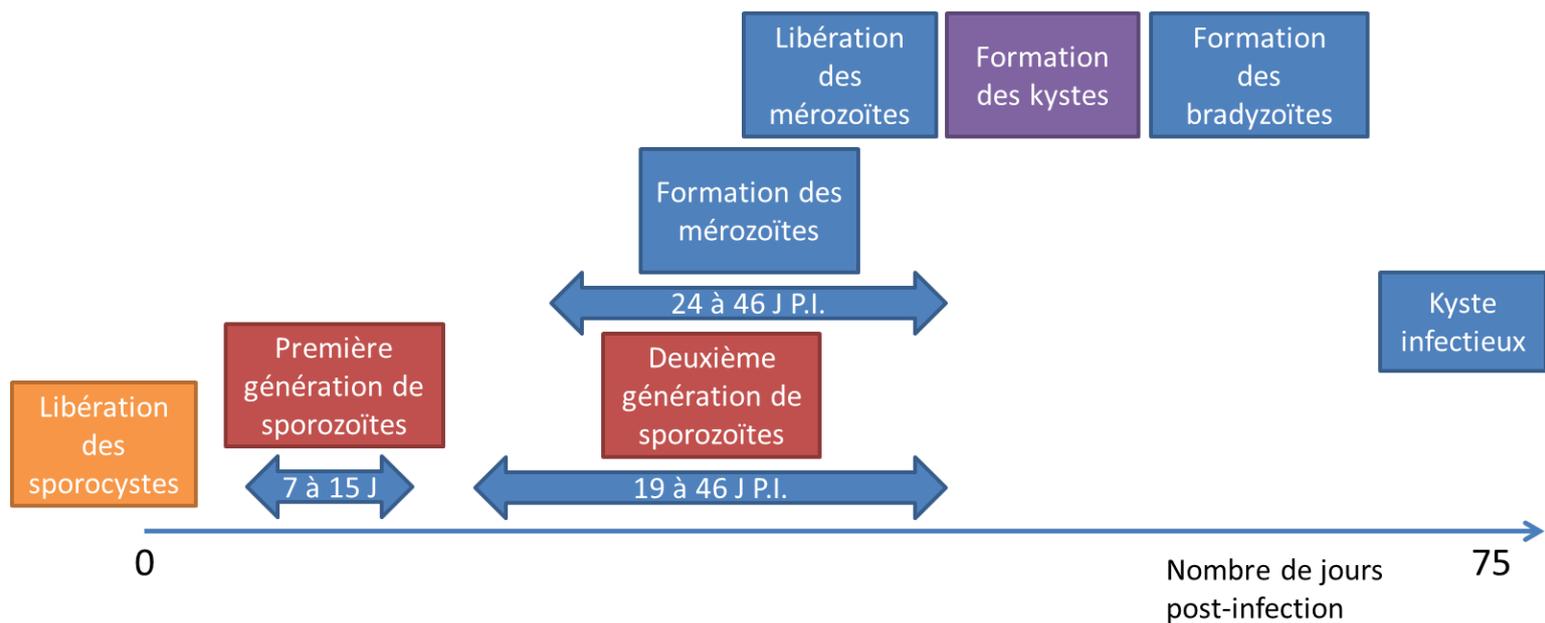
Figure 2 : Cycle évolutif d'après Dubey, Lindsay, 2006

### 1. Etapes du cycle chez l'hôte intermédiaire

Les bovins se contaminent en ingérant de l'eau et/ou des aliments contaminés par des sporocystes. C'est la forme de résistance du parasite, le cycle ne continue que si les sporocystes sont ingérés par l'hôte intermédiaire approprié.

A noter qu'il existe des cas de transmission verticale même si ceux-ci sont beaucoup plus rares que les cas de transmission horizontale. La fréquence a été estimée à 1,7% lors du suivi d'un troupeau en Argentine (Moré et al. , 2007).

La phase aiguë de l'infestation correspond aux deux premières tachy-endopolygénies endothéliales et la phase chronique de l'infestation correspond à la formation des kystes (Euzéby , 1997).



**Figure 3 : Schéma des étapes du cycle chez l'hôte intermédiaire**

Quand un bovin ingère les sporocystes, leur paroi se rompt. Les sporozoïtes mobiles sont libérés et pénètrent dans la paroi intestinale. Puis, ils vont infester les cellules endothéliales. La première génération de sporozoïtes est formée dans les cellules endothéliales des artérioles des intestins et des nœuds lymphatiques mésentériques, 7 à 15 jours après l'ingestion. La seconde génération de sporozoïtes est formée dans les cellules des capillaires de tous les organes internes, au bout de 19 à 46 jours. Ils sont généralement plus nombreux dans les capillaires des glomérules rénaux. Les sporozoïtes sont formés par multiplication tachy-endopolygénique ou bourgeonnement interne. Ils sont situés dans le cytoplasme des cellules hôtes et ne sont pas entourés d'une vacuole parasitophore, ils se divisent par bourgeonnement interne et donnent naissance aux mérozoïtes. Les mérozoïtes sont formés à la périphérie des sporozoïtes, environ 24 à 46 jours après l'ingestion ; la cellule hôte devient alors un schizonte ou « pseudo-kyste ». Puis, elle est lysée et les mérozoïtes sont libérés dans la circulation sanguine. Occasionnellement, on peut trouver des mérozoïtes dans des cellules mononuclées mais ils sont majoritairement extracellulaires.

Les mérozoïtes initient la formation de kystes dans les fibres musculaires striées de type 1 ou 2 après leur libération. On peut les retrouver de manière anecdotique dans le cerveau des animaux infestés. Ils pénètrent dans les cellules hôtes, s'entourent d'une vacuole parasitophore, prennent une forme ovoïde et deviennent des kystes. Ces kystes produisent des mérocytes, qui se divisent à maintes reprises par endodyogénie ou bipartition et finalement donnent naissance à des mérozoïtes en forme de banane : les bradyzoïtes ou cystozoïtes ou encore corpuscules de Rainey, forme infestante du parasite. La membrane de la vacuole parasitophore se transforme en paroi kystique primaire. Le kyste devient infestant environ 75 jours après l'infestation de l'hôte intermédiaire.

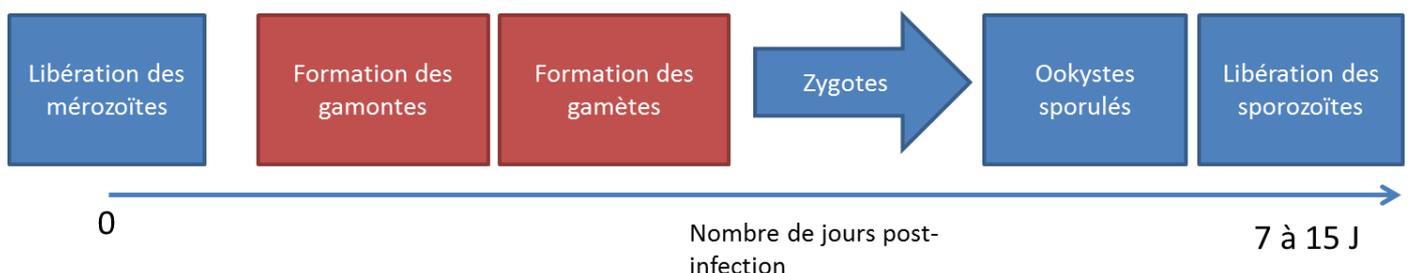
Les kystes immatures ne contiennent que des mérocytes et ne sont pas pathogènes pour l'hôte définitif. Les kystes matures peuvent contenir des milliers de bradyzoïtes. La présence de kystes immatures avec des mérozoïtes suggère une infestation récente. La présence de kystes matures indique seulement une infestation ancienne. On ne peut pas dater cette infestation. Ils prennent souvent une forme allongée, fusiforme et sont appelés tubes de Miescher. Le parasite s'adapte rapidement au myocyte et, en général, seulement de très faibles altérations sont observées dans les myocytes infestés.

Les lieux d'élection des kystes sont : l'œsophage, le diaphragme, les muscles squelettiques, la langue, le cœur... L'œsophage et le myocarde semblent être le site où l'occurrence des kystes est la plus grande pour *S. cruzi* (Latif et al., 1999; Aldemir, Güçlü, 2004; Domenis et al., 2011; Moré et al., 2011). L'œsophage et les muscles squelettiques semblent être les lieux d'élection pour les autres espèces de sarcosporidies (Huong, 1999). *S. hirsuta* n'est pas retrouvé dans le myocarde (Lindsay, Blagburn, Braund 1995).

La connaissance précise du cycle chez l'hôte intermédiaire repose en particulier sur les études menées chez la souris avec *S. muris* (Lindsay, Blagburn, Braund, 1995).

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

L'hôte définitif se contamine en ingérant les muscles de proies, contenant des kystes à l'intérieur desquels sont présents les bradyzoïtes. Le cycle ne se poursuit que si le kyste est ingéré par un hôte définitif approprié.



**Figure 4 : Schéma des étapes du cycle chez l'hôte définitif**

Les bradyzoïtes émergent et pénètrent dans les cellules intestinales, notamment les cellules caliciformes. Ils donnent alors des gamontes mâles (micro gamète) et femelles (macro gamète). Chaque gamonte produit un grand nombre de gamètes. Il en résulte des zygotes qui forment une paroi autour d'eux et se transforment en ookystes. La gamétogenèse et la fertilisation sont terminées en 24h. Les ookystes sporulent *in situ* dans les cellules intestinales, au niveau de la lamina propria. Les ookystes sporulés sont la dernière étape réalisée dans l'hôte définitif. Comme la paroi des ookystes est fine, elle se rompt facilement et les sporocystes

peuvent être libérés directement dans la lumière de l'intestin et évacués dans les fèces environ 7 à 14 jours après l'ingestion des kystes. On peut aussi retrouver des ookystes intacts dans les fèces. Pour la majorité des espèces de sarcosporidies, la période pré-patente est de 7 à 14 jours après l'ingestion des kystes.

## B. Morphologie des différents stades

### 1. Ookystes

L'ookyste correspond à l'œuf encapsulé. Il y a 2 sporocystes dans chaque ookyste.

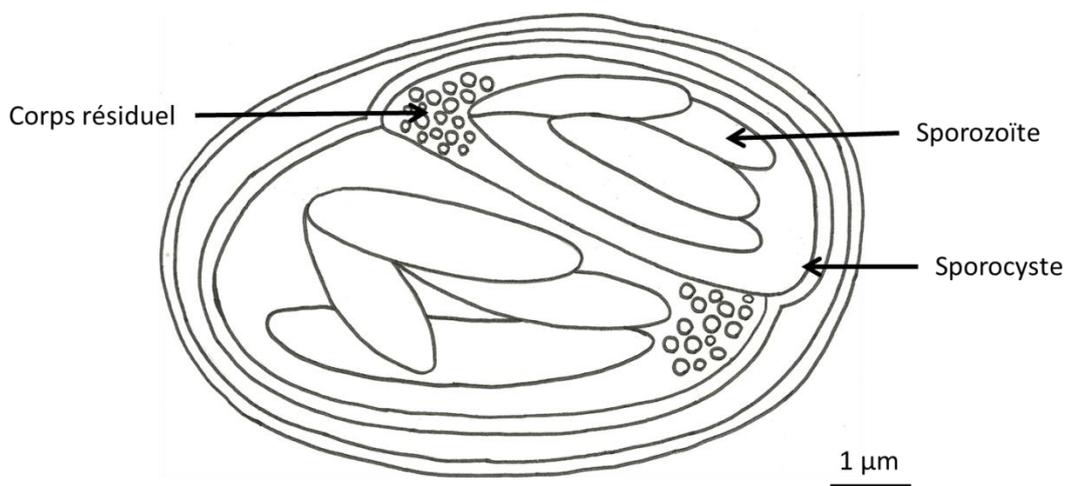
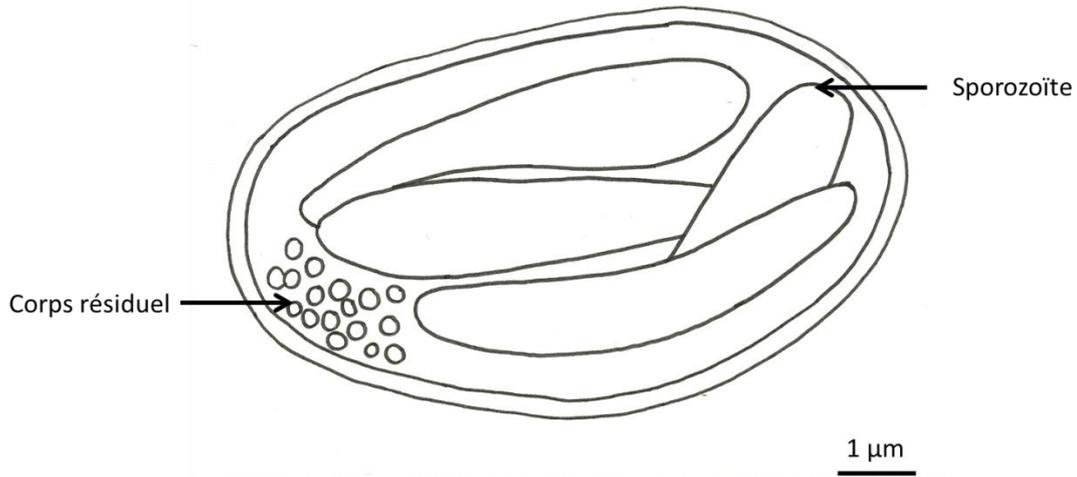


Figure 5 : Schéma d'un ookyste

### 2. Sporocystes

Les sporocystes contiennent les formes de multiplication asexuée. Il y a quatre sporozoïtes dans chaque sporocyste. Les sporocystes sont directement infectants pour l'hôte intermédiaire.

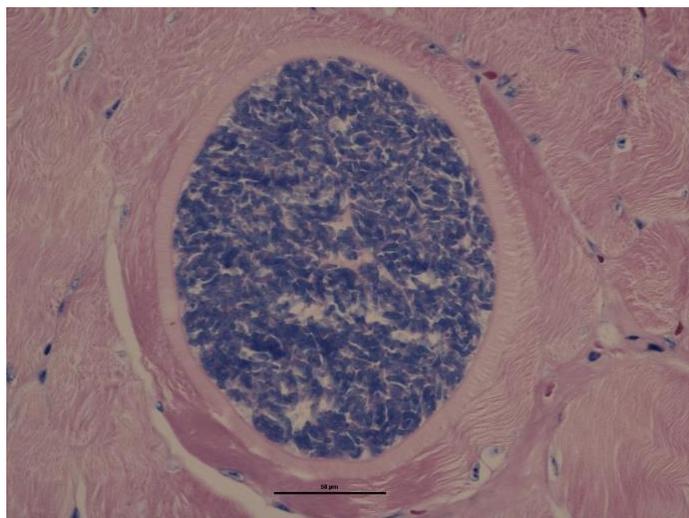


**Figure 6 : Schéma d'un sporocyste**

Les sporocystes sont la forme de résistance du parasite. Ils possèdent une paroi résistante et sont de petite taille. Ils peuvent ainsi résister plusieurs mois dans l'environnement. Cependant, les fluctuations de température et d'humidité jouent sur leur viabilité. Les meilleures conditions de survie pour les sporocystes de *S. cruzi* sont une température basse (4°C) et une humidité relative élevée (100%) où ils survivent plus de 240 jours. Ils résistent à des températures négatives, jusqu'à -20°C pendant 48h. Ils peuvent aussi survivre plus de 180 jours à une température élevée (37°C) et en milieu sec (18% d'humidité). Les conditions les plus délétères pour eux sont les fluctuations de températures (Savini, Robertson, Dunsmore, 1996). Tous les sporocystes résistent également aux antiseptiques, appliqués aux concentrations habituelles. Seul l'ammoniac à 10% exerce un effet létal (Euzéby 1997). Les effets des autres agents physiques, biologiques et chimiques sur la viabilité des sporocystes n'ont pas été étudiés, il serait intéressant d'approfondir les connaissances sur ces points.

Pour déterminer la viabilité des sporocystes, on peut utiliser différentes techniques : l'excystation, les tests de coloration, par exemple au bleu de méthylène ou au bleu de trypan, et l'infestation artificielle d'animaux. La méthode de coloration avec des colorants fluorescents est la meilleure technique pour apprécier la viabilité des sporocystes (Savini, Robertson, Dunsmore, 1996). On utilise une solution de diacétate de fluorescéine et une solution d'iodure de propidium. Les sporocystes sont colorés avec ces solutions. Ils sont ensuite observés au microscope à fluorescence à différentes longueurs d'ondes. Selon la fluorescence émise, on peut distinguer les sporocystes viables des non-viables. Cette technique est rapide, peu coûteuse et simple.

### 3. Kyste



© G. Bénard

Photo 1 : Kyste sarcosporidien observé au microscope optique

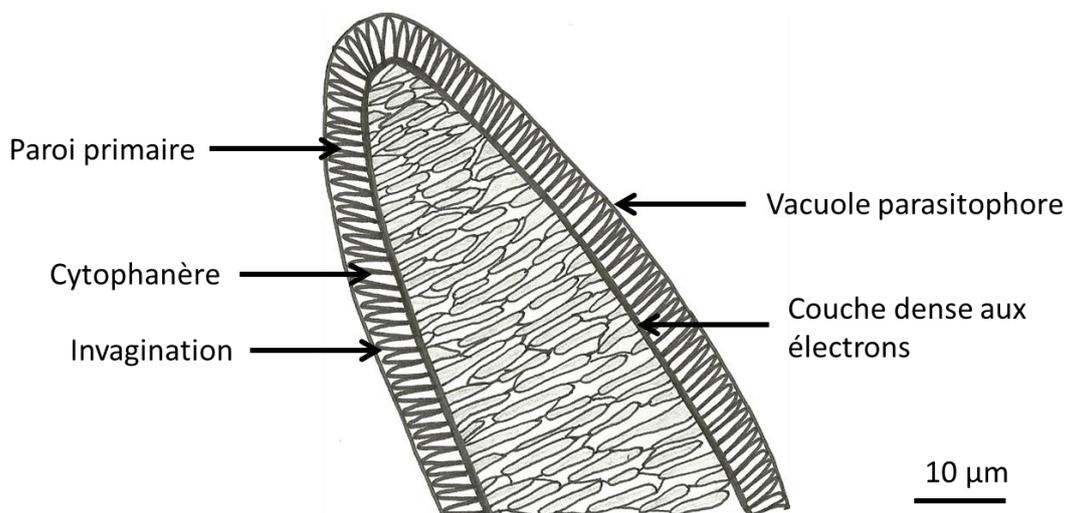


Figure 7 : Schéma d'un kyste sarcosporidien

Les dimensions du kyste ainsi que l'aspect de la paroi varient selon l'espèce de sarcosporidies impliquée et selon l'âge du kyste. La longueur du kyste peut atteindre jusqu'à 2650 µm, la largeur jusqu'à 160 µm et l'épaisseur de la paroi jusqu'à 8,8 µm (Fayer, 2004). La paroi des kystes peut être fine et simple, formée uniquement de la vacuole parasitophore ou peut se complexifier avec des cytophanères contenant des microtubules, des corps denses aux électrons ou des granules. La structure de cette paroi change au cours du temps. La couche dense aux électrons est à l'origine de la formation de cloisons qui compartimentent le kyste (Lindsay, Blagburn, Braund 1995).

La structure des kystes varie aussi en fonction de leur localisation. Ils sont ainsi plus petits dans le cœur en relation avec la structure des fibres myocardiques (Vercruysse, Franssen, Van Goubergen 1989).

Le kyste est une forme de résistance du parasite. La longévité des sarcocystes varie de un à trois mois pour les espèces parasites de l'homme. Ils survivent encore 15 jours à la mort de leur hôte. Ils résistent à la réfrigération à -2°C mais ils sont tués par la congélation à -5°C (48 heures) et à -20°C (24 heures). La chaleur exerce une action destructrice à la température de 70°C à 75 °C, maintenue pendant 20 à 25 minutes (Euzéby, 1997). Pour les espèces de sarcosporidies ayant comme hôtes définitifs des animaux, aucune donnée précise n'est référencée dans la littérature mais on peut penser que les informations répertoriées pour les espèces parasites de l'homme doivent être transposables aux espèces parasites des animaux.

### **III. Epidémiologie descriptive**

#### **A. Prévalence de *Sarcocystis* spp.**

La prévalence de la sarcosporidiose chez les bovins semble variable à travers le monde atteignant 100% dans certains pays. En Iran, la prévalence chez les bovins s'élève à 100% (Nourollahi Fard, Asghari, Nouri, 2009), comme au Maroc (Fassi-fehri et al., 1978), contre 99,7% en Argentine (Moré et al., 2010), 97,8% en Iraq (Latif et al., 1999), 97% en Belgique (Vercruysse et al., 1989), 96% dans le sud de l'Italie, en Sicile (Bucca et al., 2011), 92% dans la province de Konya en Turquie (Aldemir, Güçlü, 2004), 80,23% en Inde (Mohanti et al., 1995), 69,3% au Sri Lanka (Kalubowila et al., 2004), 52 % en Australie (Savini et al., 1992).

En outre, une enquête réalisée au Japon (Ono, Ohsumi, 1999) compare la prévalence de la sarcosporidiose dans les muscles de bovins japonais avec ceux importés d'Amérique et d'Australie : 36,7% des bovins importés d'Amérique et 29,5% des bovins importés d'Australie contre seulement 6,31% des bovins élevés au Japon.

En France, de 80 à 100% des bovins sont parasités par des kystes sarcosporidiens (Euzéby, 1998).

#### **B. Prévalence par espèce de *Sarcocystis***

La prévalence de *S. cruzi* semble être la plus élevée, notamment dans certaines régions du globe : 52% en Allemagne (Moré et al., 2014), plus de 70% chez les bovins adultes en Argentine (Moré et al., 2009; Moré et al., 2011) ou chez

les jeunes bovins en Italie du sud (Bucca et al., 2011), 74.2% en Italie (Domenis et al., 2011), plus de 90% au Japon (Ono, Ohsumi, 1999), 96% dans le Colorado (Gajadhar, Marquardt, 1992), 97% en Belgique (Vercruysse, Franssen, Van Goubergen, 1989).

La prévalence de *S. hirsuta* et *S. hominis* est quant à elle très variable selon les pays et les régions : 56 % en Belgique (Vercruysse, Franssen, Van Goubergen, 1989).

L'infestation des bovins par *S. hominis* serait de 42% à 60% en France (Euzéby, 1997 ; Euzéby, 1998), de 42.7% en Italie (Domenis et al., 2011), de 6.2% en Allemagne (Moré et al., 2014). L'infestation des bovins par *S. hirsuta* serait de 6.6% en Allemagne (Moré et al., 2014), de 1.8% en Italie (Domenis et al., 2011). L'infestation des bovins par *S. sinensis* serait de 37% en Allemagne (Moré et al., 2014).

*Sarcocystis* spp. est donc un des parasites du bétail le plus répandu à travers le monde. Cependant, la variabilité de la prévalence de l'infestation des bovins par les sarcosporidies en fonction de l'origine géographique laisse supposer qu'il existe des facteurs de risque d'infestation. En effet, la prévalence doit varier selon les modes d'élevages, la présence de chien, chat ou faune sauvage sur l'exploitation, le climat.... Ces paramètres seront étudiés dans la thèse de Véronique Léonard pour essayer d'identifier les facteurs de risques liés à la sarcosporidiose (Léonard, 2014).

## **IV. Etude clinique**

### **A. Symptômes chez l'hôte intermédiaire : le bovin**

#### **1. Sarcosporidiose aiguë**

Généralement, l'infestation est inapparente. Mais des signes cliniques peuvent survenir 3 à 4 semaines après l'infestation (Dubey, Lindsay, 2006) : fièvre (sans doute due à l'action de l'interleukine 1 sur les centres thermorégulateurs), anorexie, anémie normocytaire normochrome non régénérative, faiblesse musculaire. C'est le cas de la maladie de Dalmeny, observée au Canada en 1961 (Corner, Mitchell, Meads, Taylor, 1963). Une diminution des performances peut être observée : baisse de la production laitière, diminution du poids, ce qui ressemble à une infestation en phase aiguë (Jensen et al., 1986; Gajadhar, Marquardt, 1992; Vangeel et al., 2012).

On peut parfois observer des avortements (Dubey, Bergeron, 1982), des mort-nés ou des morts fœtales (Tenter, 1995). Ils se traduisent par des lésions nécrotiques et inflammatoires sur le placenta et des lésions myocardiques, pulmonaires et encéphalomyélitiques sur le fœtus, qui, parfois, est en voie d'autolyse. L'examen histologique révèle une infiltration lymphoplasmocytaire

périvasculaire, une lipidose centrolobulaire, des zones de gliose focalisée (granulomes méningoencéphalitiques), une encéphalomalacie et une glomérulonéphrite. On retrouve des mérozoïtes de *Sarcocystis* dans les cellules endothéliales des artères, artérioles et capillaires du placenta et des organes du fœtus. Le mécanisme à l'origine des avortements induits par la sarcosporidiose est encore inconnu car on n'arrive pas à reproduire l'avortement par inoculation expérimentale et on ne retrouve pas forcément d'avortements lors d'épidémie de sarcosporidiose. De plus, le diagnostic de certitude est difficile car *Sarcocystis* n'est que rarement retrouvé dans le fœtus et les annexes fœtales (Uggla, Buxton, 1990 ; Euzéby 1998).

La sévérité des symptômes dépend:

- de la quantité de sporocystes ingérée
- du statut immunitaire de l'hôte
- du statut physiologique de l'hôte (gestation, lactation)
- de l'espèce de sarcosporidie ingérée : *S. cruzi* est plus pathogène que les autres (Dubey, Lindsay, 2006).

Les symptômes sont souvent plus marqués lors de la phase de production des mérozoïtes c'est à dire lors des multiplications tachy-endopolygéniques (Uggla, Buxton, 1990). C'est durant cette phase qu'il y a le plus d'antigènes exposés au système immunitaire de l'hôte et la réponse maximale en anticorps a lieu lors des dernières étapes de mérogonie. Cette immunité humorale est d'autant plus solide et durable que la dose de parasites qui l'a conférée était plus élevée (Savini, Robertson, Dunsmore 1997a ; Euzéby 1998).

Lors de la mort des animaux atteints de sarcosporidiose aiguë, on observe macroscopiquement à l'autopsie : des lésions hémorragiques allant des pétéchies aux ecchymoses et une lymphadénite, particulièrement des nœuds lymphatiques mésentériques. Au niveau microscopique, on trouve des lésions de vascularite et des hémorragies dues aux lésions endothéliales provoquées par les tachyzoïtes ainsi qu'une nécrose des myocytes associée à la pénétration des mérozoïtes dans les myocytes. On peut trouver également des formes prolifératives du parasite dans les cellules endothéliales des vaisseaux de la majorité des organes. Les kystes peuvent dégénérer, il sont alors encerclés par des granulocytes neutrophiles et éosinophiles voire occasionnellement des cellules géantes mais il est très fréquent de retrouver des kystes sans réaction inflammatoire périphérique (Radostis et al., 2008; Lindsay, Blagburn, Braund, 1995 ; Euzéby, 1998).

Les animaux ayant survécu à une sarcosporidiose aiguë acquièrent en général une immunité qui les protège contre la réinfestation par une espèce homologue (immunité de prémunition) mais pas contre celle par une espèce hétérologue (Uggla, Buxton, 1990). En effet, il n'y a pas d'immunité croisée entre les

différentes espèces de *Sarcocystis* et dans la grande majorité des cas (96%) on retrouve des coinfections entre les différentes espèces de *Sarcocystis* (Pena, Ogassawara, Sinhorini, 2001). On peut créer et entretenir l'immunité par des infestations pauciparasitaires régulières (Euzéby, 1998). La présence de kystes sarcosporidiens n'est pas nécessaire pour le maintien de l'immunité protectrice (Lindsay, Blagburn, Braund, 1995).

## **2. Sarcosporidiose musculaire chronique**

A partir du stade kystique, la maladie devient chronique et ne se manifeste que par une symptomatologie très fruste, variable avec les masses musculaires parasitées : difficulté de préhension et de mastication, myosites diverses à caractère pseudorhumatismal, accidents cardiaques avec blocage auriculoventriculaire, si l'infection intéresse les fibres de Purkinje. Mais le plus souvent, à ce stade, l'infection est latente, cryptosymptomatique (Euzéby, 1998).

En ce qui concerne l'immunité en phase chronique de l'infestation, bien que les plasmocytes, élaborateurs d'anticorps se déposent autour des parasites, une composante cellulaire est plus importante : infiltration lymphocytaire et macrophagique, cytotoxicité des lymphocytes T, entraînant la lyse des parasites et du tissu qui les renferme, suivie de phagocytose par les macrophages. Cette immunité cellulaire vise à détruire les kystes et est à l'origine de la formation de granulomes inflammatoires caractéristiques de la myosite éosinophilique (Euzéby, 1998).

Ainsi, en général, la sarcosporidiose musculaire chronique est une découverte d'abattoir, à cause des lésions de myosite éosinophilique sur les carcasses. En 1992, aux États-Unis, 5% des carcasses étaient rejetées pour cause de myosite éosinophilique (Gajadhar, Marquardt, 1992). Elle n'est pas détectable sur les animaux vivants qui apparaissent comme cliniquement sains (Jensen et al., 1986). Elle n'est pas due à une espèce de sarcosporidie en particulier et différentes espèces peuvent être retrouvées au sein de lésions de myosite éosinophilique (Vangeel et al., 2013). En revanche, *S. hominis* serait retrouvé plus fréquemment dans les lésions de myosite éosinophilique (Bertin, 2013).



© G. Bénard

**Photo 2 : Carcasse présentant des lésions de myosite éosinophilique**



© G. Bénard

**Photo 3 : Détail de lésions de myosite éosinophilique**

Lors de sarcosporidiose musculaire chronique, on peut observer deux types de lésions macroscopiques provoquées par la dégénérescence des kystes

sarcosporidiens. La plupart du temps les lésions se présentent sous la forme de points ou de lignes orientées dans le sens des fibres musculaires vertes ou gris-vert de 2 à 10 mm de long et de 2 à 8 mm de diamètre. Ces lésions peuvent être parfois coalescentes et mesurer jusqu'à 2 à 3 cm. Dans 7% des cas on peut observer des lésions locales, larges (de 5 à 15 cm de diamètre), globulaires, fermes, jaune pâle à vertes et bien délimitées par le tissu conjonctif du muscle (le périnysium ou l'épinysium). Ce type de lésion est observé chez les jeunes animaux (Kimura, 2011 ; Jensen et al., 1986).

Les lieux d'élection des lésions sont : l'œsophage, le diaphragme, les muscles squelettiques et le cœur (Vangeel et al., 2012).

La prévalence des sarcosporidies dans les muscles des bovins adultes semble être de 100% alors que la prévalence de la myosite éosinophilique est beaucoup plus faible (de l'ordre de 0,003% en France). Généralement, la présence de kystes sarcosporidiens n'est pas visible macroscopiquement et leur détection doit être faite par observation des tissus musculaires au microscope.

## **B. Symptômes chez l'hôte définitif**

Les symptômes chez les hôtes définitifs sont caractérisés par une coccidiose sarcocystique. La coccidiose sarcocystique, déterminée par le parasitisme des gamétocytes, n'est pas génératrice d'immunité, car, contrairement aux schizontes, les formes sexuées des *Sarcocystis* sont peu immunogènes et la schizogonie n'existe pas chez les hôtes définitifs (Euzéby, 1998).

### **1. Chez les animaux : chien et chat**

Les périodes pré-patente et patente ne sont pas connues avec précision car très peu d'études sont menées sur les hôtes définitifs, mis à part l'homme. Chez le chien, la période pré-patente serait de 7 à 33 jours, et chez le chat d'environ une à deux semaines (Fayer, 1977, Latif et al., 1999). Pour les 2 espèces, la période patente n'a pas été déterminée avec précision, elle serait d'1 semaine à plusieurs mois.

Chez le chien et le chat, l'infestation est la plupart du temps inapparente (Bowman, Hendrix, Lindsay, Barr, 2002). On peut cependant observer, dans certains cas, chez le chien, une diarrhée profuse hémorragique. En effet, la gamétogonie s'effectuant dans la lamina propria, il peut y avoir un arrachement de la muqueuse lors de l'éjection des ookystes.

A noter que la viande de bœuf présentant des lésions de myosite éosinophilique n'est pas plus pathogène que celle de bovins infestés apparemment sains. Au contraire, on trouve plus de parasites infestants dans les muscles des carcasses non saisies pour myosite éosinophilique que dans les muscles des carcasses saisies pour myosite éosinophilique (Gajadhar, Marquardt 1992). En outre, une étude a montré que des chats qui ont ingéré de la viande présentant une myosite éosinophilique n'ont pas excrété de sporocystes contrairement à ceux qui ont ingéré de la viande sans myosite éosinophilique (Jensen et al., 1986).

## **2. Chez l'homme : importance en santé publique**

L'homme se contamine en mangeant de la viande de bovins, d'ovins ou de porcins crue ou insuffisamment cuite (Latif et al., 1999). Ce mode de contamination est responsable de petites anadémies.

La sarcosporidiose intestinale humaine n'est pas inhabituelle : l'incidence mondiale est estimée entre 6 et 10%, en Europe la prévalence varie de 1,6 à 10,4% selon les études, et, en France, elle varie de 4 à 32 %. En revanche, ces études ne font pas la distinction entre *Sarcocystis hominis* et *Sarcocystis suihominis* (<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/sarcocystosis.pdf>). Des individus très jeunes peuvent être atteints : on a signalé l'infestation de bébés âgés de 9 mois (Euzéby, 1998; Velásquez et al., 2008, Taylor et al., 2010).

Au vu de la prévalence élevée de la sarcosporidiose à travers le monde, on peut penser que cette zoonose est extrêmement fréquente. Ceci est à nuancer avec le fait que nous mangeons plutôt les morceaux de viande moins cuits où le parasite a moins de chance de se localiser (muscles squelettiques). Par exemple, en Argentine, la prévalence du parasite dans le filet (psoas majeur) n'est que de 73,1% alors qu'elle est de 99,5% dans le myocarde (Moré et al., 2011).

Le diagnostic différentiel de la sarcosporidiose intestinale humaine se fait avec les coccidioses à *Isospora belli*, *Cyclospora* spp. et avec l'infestation à *Cryptosporidium* spp. (Euzéby 1997).

### **a) Stade parasitaire**

Chez l'homme, la période pré-patente est de 18 à 39 jours et la période patente est de 2 à 179 jours (Pena, Ogassawara, Sinhorin, 2001).

L'infestation se traduit par une atteinte intestinale non-spécifique et est la plupart du temps asymptomatique. Cependant, des signes cliniques peuvent apparaître lors de la formation des gamètes dans la lamina propria, les symptômes sont alors : nausées, douleurs abdominales, diarrhée aqueuse, vomissements. Ils

sont transitoires et rétrocedent sans traitement 4 semaines après l'ingestion des kystes sarcosporidiens. Ils s'accompagnent de l'émission de sporocystes dans les selles. (Fayer, 2004).

La gravité des symptômes est liée à la quantité de viande contaminée ingérée et à l'état immunitaire de la personne infestée (Fayer, 2004). Les cas les plus graves peuvent aller jusqu'à l'inflammation ou à l'hémorragie et la nécrose de l'intestin grêle (Xiang et al., 2009). Chez les individus immunodéprimés, la sarcosporidiose peut engendrer des troubles systémiques et peut conduire à la mort (Velásquez et al., 2008).

De plus, les sarcosporidies ne sont pas génératrices d'immunité car chez leurs hôtes définitifs, elles n'ont pas de cycles schizogoniques, qui sont des éléments immunogènes, d'où une possibilité de réinfestation (Euzéby 1997).

### **b) Stade toxinique**

L'infestation se traduit chez l'homme par des troubles gastroentéritiques : nausées, douleurs abdominales, diarrhée, vomissements. Les signes cliniques apparaissent dans les 3-4h après le repas contaminant et durent 24-48 h. Ces symptômes sont dus à la libération d'une toxine thermolabile (détruite à 50°C) : la sarcocystine. Cette toxine commence à être synthétisée dans les mérozoïtes présents dans les pseudo-kystes (« schizontes ») et s'accumule dans les kystes présents dans les muscles de l'hôte intermédiaire, le bovin. Inoculée au lapin, par voie veineuse ou intramusculaire, elle entraîne rapidement la mort. Dans les conditions naturelles, elle détermine des modifications de certaines hormones intervenant dans les processus métaboliques : élévation du taux de somatostatine, diminution du taux de l'IGF-1, facteur de croissance analogue de l'insuline. Les symptômes liés à cette toxine ne s'accompagnent pas de l'émission fécale d'éléments parasitaires (Euzéby 1997, 1998).

*S. sinensis* peut entraîner les mêmes symptômes chez l'homme, bien que l'homme ne soit pas l'hôte définitif du parasite (Chen et al., 2011).

## **v. Diagnostic**

### **A. Diagnostic clinique**

Il est très difficile, aussi bien dans la forme aiguë que dans la forme chronique de l'infection, qui ne se traduit pas toujours par des symptômes ou qui, lorsqu'ils se manifestent sont très frustes et non spécifiques. Du point de vue clinique, on ne peut avoir que des éléments de suspicion (Euzéby 1998).

## **B. Diagnostic biochimique**

Il est possible de s'appuyer sur la mesure du taux sérique de la lactate-déshydrogénase et de la sorbitol-déshydrogénase. Ces examens ne font qu'étayer l'hypothèse clinique et ne confirment en aucun cas le diagnostic (Euzéby 1998).

## **C. Diagnostic hématologique**

On peut rechercher les mérozoïtes, libres ou inclus dans les monocytes. Cette recherche n'est concluante qu'en cas de positivité. De plus, la formule leucocytaire met en évidence une lymphocytose qui n'est en aucun cas pathognomonique de la sarcosporidiose (Euzéby 1998).

## **D. Diagnostic microscopique chez l'hôte intermédiaire**

Pour l'observation de kystes sarcosporidiens au sein des tissus, il existe différentes méthodes : loupe binoculaire ou stéréomicroscope (Dahlgren et al., 2007), microscope optique, microscope électronique à transmission. Ces techniques sont rapides et peu coûteuses, sauf pour la microscopie électronique, et elles peuvent être utilisées à partir de biopsie ou à partir de nécropsie et sont pratiquées uniquement sur des échantillons individuels.

Les kystes sont majoritairement trouvés dans les fibres musculaires striées de type 1 et 2 mais peuvent aussi être trouvés dans les fibres musculaires lisses et les fibres de Purkinje. Une localisation dans les neurones a été mise en évidence pour d'autres espèces de *Sarcocystis* que celles infestant les bovins mais il n'y a pas de référence dans la littérature sur une possible localisation neuronale des kystes sarcosporidiens chez les bovins. La prévalence des kystes sarcosporidiens est majoritaire dans l'œsophage, le cœur, le diaphragme et la langue contrairement aux muscles striés squelettiques qui sont moins affectés (Lindsay, Blagburn, Braund, 1995 ; Euzéby, 1998)

On recherchera donc les kystes dans ces zones d'élection préférentielle pour effectuer un diagnostic.

### **1. La microscopie optique**

Autrefois, différentes méthodes étaient utilisées pour observer les kystes sarcosporidiens en microscopie optique :

- Trichinoscopie (Gut 1982; Latif et al., 1999; Pérez-Creo et al., 2013): quelques grammes de muscles sont fragmentés en morceaux de quelques millimètres puis écrasés fermement entre deux lames de verre, avant d'observer la lame au microscope. On peut colorer la lame avec de la thiamine pour faciliter la visualisation des kystes (Pérez-Creo et al., 2013).
- Technique de "squeezing" (Latif et al., 1999; Nourollahi Fard, Asghari, Nouri, 2009): quelques grammes de muscles sont hachés à l'aide d'un broyeur puis le mélange est pressé pour extraire les liquides contenus. Une goutte de liquide, ainsi récupérée, est placée sur une lame de verre, recouverte d'une lamelle et observée au microscope.
- Digestion enzymatique (Gut 1982; Savini, Dunsmore, Robertson, Seneviratna 1992; Latif et al., 1999; Aldemir, Güçlü, 2004; Nourollahi Fard, Asghari, Nouri, 2009): quelques grammes de muscle sont placés dans une solution de pepsine et de HCl pendant 30 min à 40 °C ou dans une solution de trypsine pendant 20 min à 25°C puis le mélange est filtré. Les sédiments sont alors observés au microscope. Cela permet de mettre en évidence les kystes.

Ces techniques sont simples et rapides. La digestion enzymatique est la technique la plus efficace des trois présentées (Vercruyse, Fransen, Van Goubergen, 1989; Latif et al., 1999) même si les résultats dépendent de la taille du prélèvement de muscle, de son niveau d'infestation et de la teneur en graisse. De plus, les kystes peuvent rester piégés dans les tissus non totalement digérés ou être retenus lors de la filtration utilisée dans la technique de digestion (Gajadhar, Marquardt, 1992).

Maintenant, l'histologie est la technique la plus utilisée.

Pour observer les kystes au microscope optique, il faut fixer les tissus dans une solution tamponnée de formol, puis les inclure dans la paraffine, et réaliser des coupes de 4 µm qui seront colorées avec une coloration au May Grunwald Giemsa (technique de Lillie et Pasternak) ou à l'hématoxyline-éosine (Ely, Fox, 1989; Huong, 1999; Ono, Ohsumi, 1999; Dahlgren, Gjerde, Skirnisson, Gudmundsdottir, 2007; Pérez-Creo et al., 2013). On peut également réaliser des coupes à congélation (Pena, Ogassawara, Sinhorin, 2001; Domenis et al., 2011; Bucca et al., 2011; Morsy et al., 2011), en congelant rapidement à -20°C un cube de muscle de 1 cm de côté et en réalisant des coupes de 5 µm. Ces coupes sont ensuite fixées dans l'alcool, colorées à l'hématoxyline-éosine, au Giemsa (Morsy et al., 2011) ou au bleu de toluidine dans du tétraborate de sodium (Domenis et al., 2011). L'utilisation de matériel congelé ne compromet pas l'intégrité des kystes (Domenis et al., 2011).

L'observation au microscope optique suffit pour étudier la structure des kystes mais ne permet pas l'identification de l'espèce de sarcosporidies (Pena, Ogassawara, Sinhorin, 2001).

Les kystes de *S. cruzi* mesurent moins de 200 à 700  $\mu\text{m}$  de longueur sur 40 à 120  $\mu\text{m}$  de largeur et ont une paroi fine d'environ 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (Pena, Ogassawara, Sinhorin, 2001), elle apparaît lisse au microscope optique. Ces kystes peuvent être confondus avec les kystes de *Toxoplasma gondii* et *Hammondia hammondi* qui ont une paroi fine mais pas de septa ni de paroi secondaire (Lindsay, Blagburn, Braund, 1995).

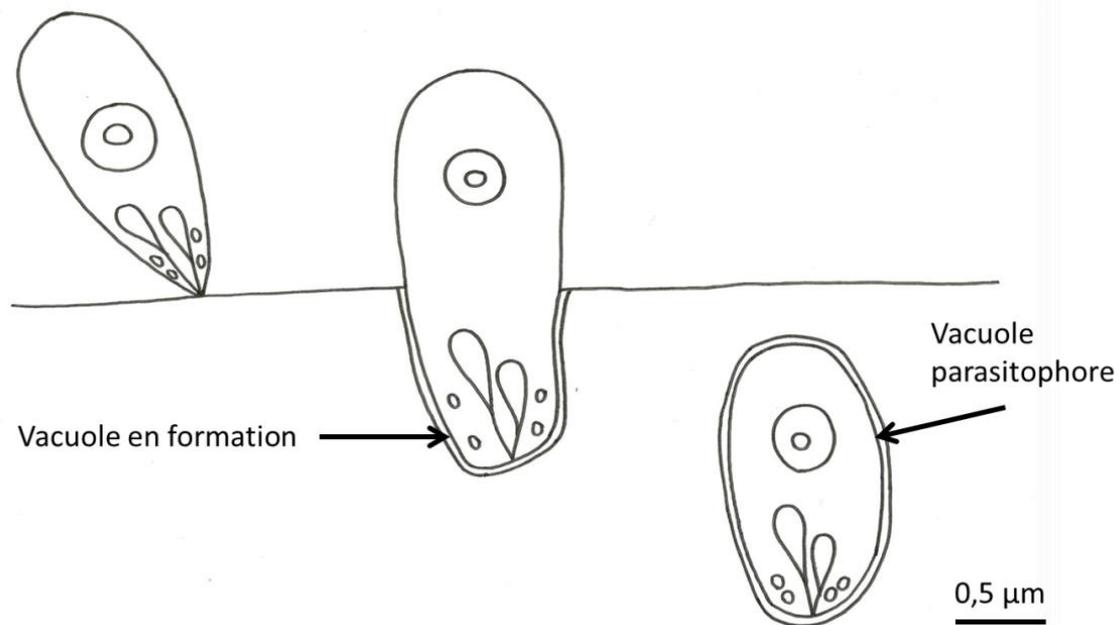
Les kystes de *S. hirsuta* atteignent 1900  $\mu\text{m}$  de longueur sur 160  $\mu\text{m}$  de largeur, ceux de *S. hominis* mesurent de 700 à 2650  $\mu\text{m}$  de long sur 50 à 150  $\mu\text{m}$  de large (Pena, Ogassawara, Sinhorin, 2001), ceux de *S. sinensis* mesurent en moyenne 1250  $\mu\text{m}$  de long et 100 $\mu\text{m}$  de large (Chen et al., 2011). Ils ont une paroi épaisse et au microscope optique, elle apparaît comme étant striée radialement. La paroi de *S. hominis* a une épaisseur de 8,5  $\mu\text{m}$ , celle de *S. sinensis* de 5,8  $\mu\text{m}$  (Chen et al., 2011), celle de *S. hirsuta*, de 5,4  $\mu\text{m}$  (Levine, 1977). Ces kystes sont difficiles à différencier en microscopie optique.

## 2. La microscopie électronique

L'observation des prélèvements au microscope électronique à transmission permet d'apprécier les détails du contenu des kystes. Les kystes doivent être fixés avec du glutaraldéhyde (Pena, Ogassawara, Sinhorin, 2001; Jehle et al., 2009; Moré et al., 2011; Chen et al., 2011; Xiang et al., 2011) ou une solution de glutaraldéhyde 1% et formaldéhyde 4% (Dubey, Fayer, Speer, 1988) et pris en masse dans l'araldite (Pena, Ogassawara, Sinhorin, 2001; Jehle et al., 2009) ou dans la résine époxy (Pérez-Creo et al., 2013). Puis, des sections très fines sont réalisées et fixées avec de l'acétate d'uranyle et/ou du citrate de plomb (Pena, Ogassawara, Sinhorin, 2001; Jehle et al., 2011; Chen et al., 2011; Xiang et al., 2011; Domenis et al., 2011)

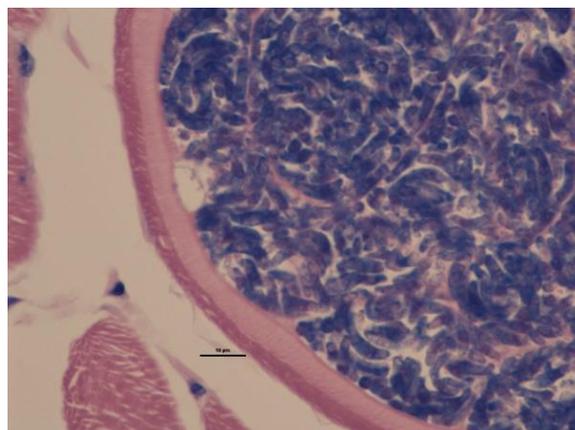
La microscopie électronique à transmission permet de distinguer les espèces en se fondant sur des critères morphologiques : l'aspect de la paroi du kyste. Mais l'apparence des kystes varie selon la localisation et le stade de développement, mais également selon la méthode de fixation (Fayer, 2004). Cette technique est donc très longue et ne peut pas être appliquée sur un grand nombre d'échantillons. De plus, elle a entraîné de nombreuses confusions taxonomiques (Xiang et al., 2011). Comme seules de faibles portions de muscles peuvent être examinées, cela peut entraîner également des faux négatifs. La sensibilité est faible et a pour conséquences une sous-estimation de la prévalence (Moré et al., 2011).

a) **Caractéristiques morphologiques de la paroi des kystes**



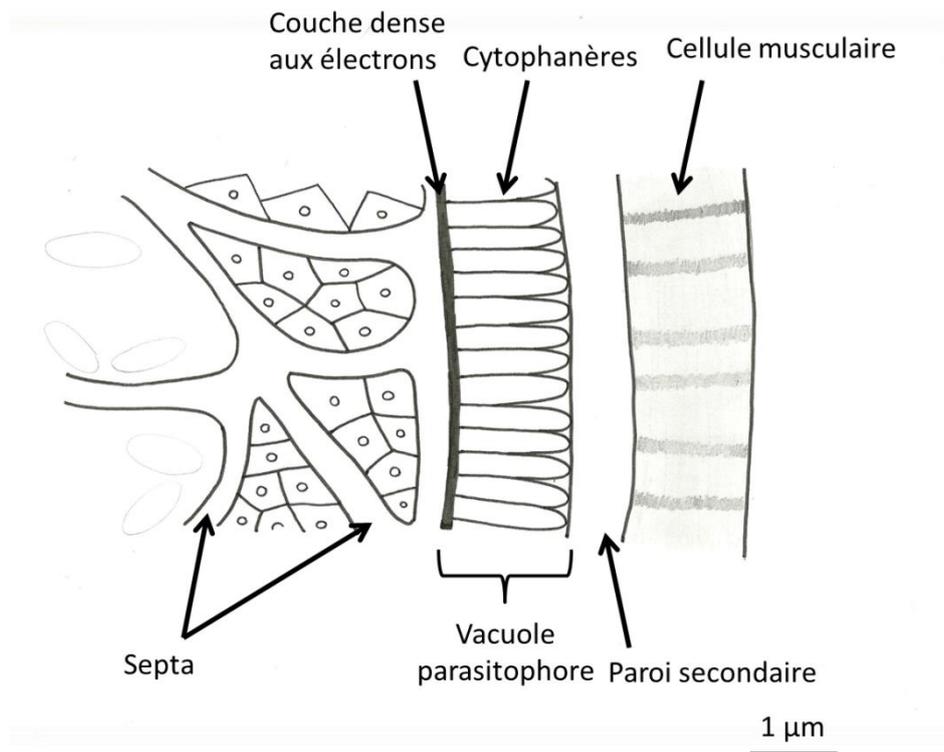
**Figure 8 : Schéma de la pénétration du bradyzoïte dans la cellule hôte**

Les kystes sarcosporidiens sont contenus dans une vacuole parasitophore dans le cytoplasme de la cellule hôte (Chen et al., 2011). Sous la membrane de la vacuole parasitophore se trouve une couche de substance fondamentale, dense aux électrons (Dubey, Fayer, Speer, 1988). On trouve également une paroi secondaire d'origine adventitielle (Euzéby 1997). Pour *S. hirsuta*, la paroi secondaire mesure de 0,7 à 1 µm d'épaisseur (Bowman, Hendrix, Lindsay, Barr, 2002) et pour *S. hominis*, 1,5 µm d'épaisseur (Domenis et al., 2011). L'ensemble de ces deux structures, vacuole parasitophore et couche dense aux électrons, forme la paroi kystique primaire, celle-ci change avec l'âge du kyste sarcosporidien (Lindsay, Blagburn, Braund, 1995). Les septa issus de cette couche de substance fondamentale séparent le kyste en différents compartiments remplis de bradyzoïtes et de mérozoïtes.



© G. Bénard

**Photo 4 : Paroi kystique observée au microscope optique (échelle : 10 µm)**



**Figure 9 : Schéma de la paroi kystique (détails)**

La vacuole parasitophore porte, sur sa face externe, des formations digitiformes, appelées "cytophanères", dont la disposition est propre à chaque espèce de sarcosporidies (Euzéby, 1997). La paroi des kystes de *S. cruzi* présente des formations "ressemblant à des cheveux" au microscope électronique à transmission. On constate que la paroi des kystes de *S. hirsuta* présente des villosités en forme de « doigts de gant » d'une longueur de 0,6-1,2 µm et d'une largeur de 0,3-0,4 µm (Bowman, Hendrix, Lindsay, Barr 2002) donnant l'aspect d'une bordure ciliée. La paroi a une épaisseur de 5 µm (Pena, Ogassawara, Sinhörin, 2001). On constate également que la paroi des kystes de *S. hominis* présente des formations arrangées en « palissade » couvrant la surface du kyste, d'une longueur d'environ 6,8 µm et d'une largeur d'environ 1 µm (Domenis et al., 2011).

La paroi des kystes de *S. sinensis* porterait des formations en forme de « doigts de gant » mais aux extrémités plus rectangulaires d'une longueur d'environ 3,3 µm et aurait une épaisseur de 5,8 µm (Chen et al., 2011). De plus, on retrouve des structures ressemblant à des vésicules à la base des cytophanères. Enfin, la couche dense aux électrons est plus fine chez *S. sinensis* (environ 0,5 µm) que chez *S. hominis* (> 1µm).

Espèces de sarcosporidies	Taille de la paroi kystique	Épaisseur de la couche dense aux électrons	Épaisseur de la paroi primaire	Taille des villosités	Épaisseur de la paroi secondaire
<i>S. cruzi</i>	<7 µm	< 1 µm	<1 µm	<2,5x0,3 µm	-
<i>S. hirsuta</i>	<10 µm	-	<5 µm	<1,2x0,4 µm	<1 µm
<i>S. hominis</i>	<10 µm	<2.3 µm	<8 µm	<9,4x2,4 µm	1.5 µm
<i>S. sinensis</i>	< 6 µm	<0.7 µm	<5,8µm	<5x1,4 µm	-

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des tailles de la paroi des kystes sarcosporidiens et des différents éléments composant cette paroi d'après Levine, 1977, Dubey et al., 1988, Xiang et al., 2011 et Chen et al., 2011. La paroi primaire correspond à la vacuole parasitophore

### b) Contenu des kystes

Sous la couche de substance fondamentale, se trouvent des cellules globuleuses, les métrocytes. Ils sont dépourvus de complexe apical (sauf pour les formes très jeunes qui peuvent avoir conservé des vestiges de conoïde, provenant des mérozoïtes). Ils seront à l'origine des bradyzoïtes par division successive. Les bradyzoïtes possèdent un complexe apical composé de conoïdes, de rhoptries et de micronèmes (Levine 1977; Wouda, Snoep, Dubey 2006, Euzéby 1998).

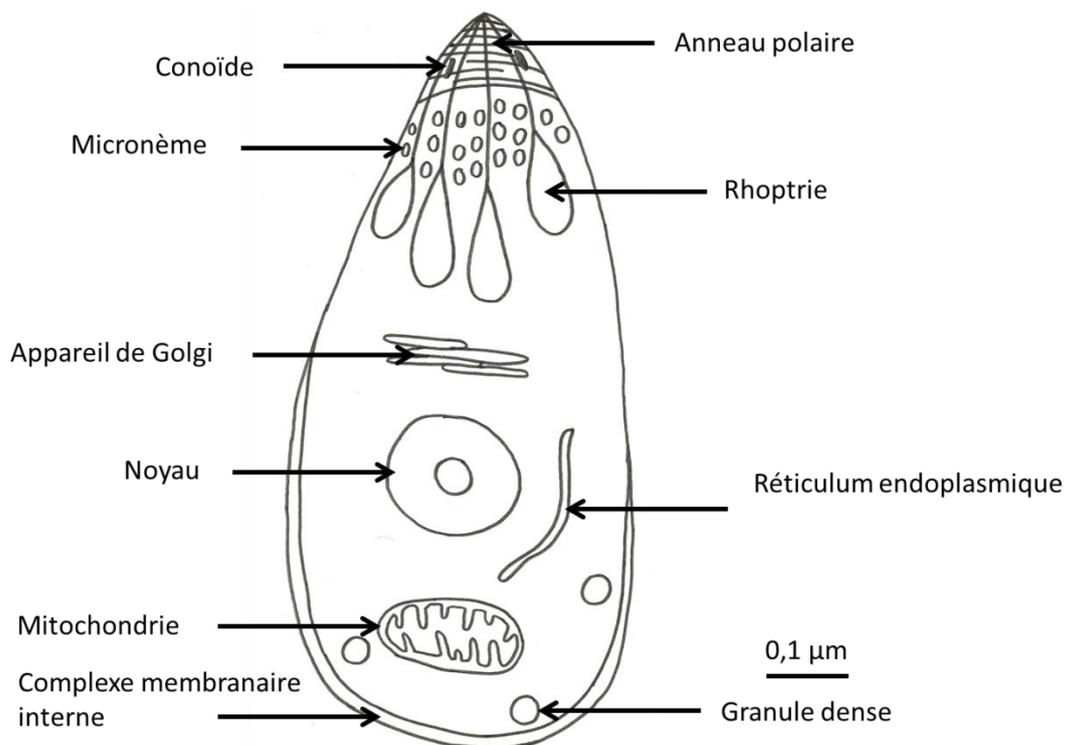


Figure 10 : Schéma d'un bradyzoïte

Les rhoptries sont des organites spécialisés dans l'activité sécrétoire. Ils sont en forme de bâtonnet élargi à l'extrémité, connectés par de fins filaments au pôle apical de la cellule. Ils élaborent des enzymes protéolytiques jouant un rôle dans la pénétration du parasite dans la cellule. Les rhoptries sont caractéristiques des bradyzoïtes immatures (Gajadhar, Marquardt, 1992). Les protéines des rhoptries sont impliquées dans le dialogue moléculaire entre le parasite et la cellule hôte, elles servent de récepteurs à certaines protéines des micronèmes. (Cowper, Matthews, Tomley, 2012).

Les micronèmes sont des organites ayant une activité sécrétoire, ils interviennent dans la pénétration et la vacuolisation. Ils se situent en général au niveau du complexe apical, dans le tiers supérieur du bradyzoïte (Bowman, Hendrix, Lindsay, Barr, 2002) et adoptent une forme en bâtonnet, entourée d'une membrane. Les protéines des micronèmes sont impliquées dans l'adhésion cellulaire entre le parasite et la cellule hôte, elles jouent le rôle de protéines d'adhésion de l'hôte à la surface du parasite. Les protéines des micronèmes présentent une grande homologie avec les protéines d'adhésion des eucaryotes supérieurs, comme le domaine du facteur de Von Willebrand de type A, facteur de coagulation intervenant dans l'hémostase primaire (Cowper, Matthews, Tomley, 2012).

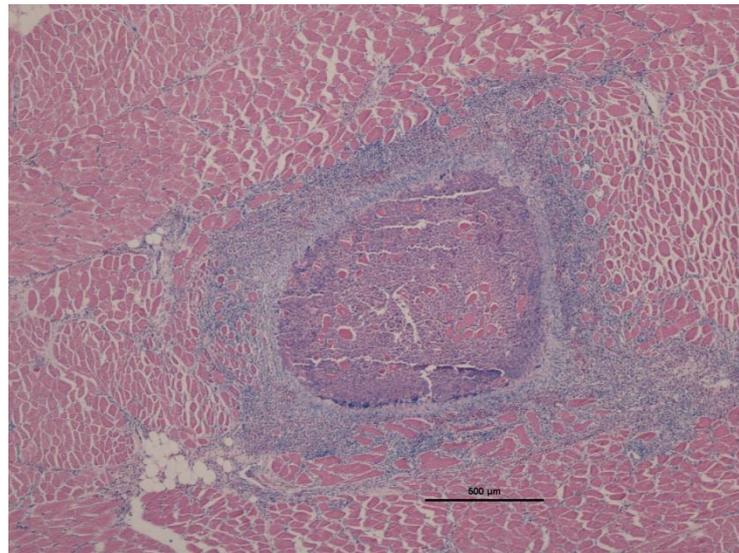
### **c) Aspect microscopique de la myosite éosinophilique**

On peut clairement établir le lien entre la myosite éosinophilique et la présence de sarcocystes dans 77,6% des cas : on retrouve alors dans les granulomes un (le plus souvent) ou plusieurs sarcocystes morts. En revanche, il faut réaliser 10 à 30 coupes histologiques pour pouvoir les détecter, ce qui est assez fastidieux. Dans les stades précoces du granulome, on retrouve la paroi du kyste ouverte mais sans altération de l'intérieur du kyste ni des microvillosités constitutives de la paroi ; à ce stade on peut reconnaître en microscopie le type de sarcosporidie c'est-à-dire à paroi épaisse ou fine voire l'espèce de sarcocyste impliquée si on utilise la microscopie électronique. Puis il y a dégradation progressive des bradyzoïtes, la paroi se fragmente, les microvillosités deviennent discontinues et l'intérieur du kyste est infiltré par des éosinophiles. Au stade ultime, le kyste n'est plus visible.

#### **(1) Selon le stade**

A l'examen histologique, on observe, lors des stades précoces, du tissu nécrotique dans lequel des fragments de myocytes sont présents, de nombreux granulocytes éosinophiles et quelques macrophages sont également présents à la périphérie. La paroi des kystes sarcosporidiens est ouverte mais normale, les

"cytophanères", présentes à la surface du kyste, sont visibles et mesurables, les septa sont bien distincts.



© G. Bénard

**Photo 5 : Granulome éosinophilique observé au microscope optique (échelle : 500 µm).**

Lors des stades intermédiaires, on remarque que les fragments de myocytes ont perdu leurs noyaux et leurs striations. La plupart des granulocytes éosinophiles sont dégénérés et certaines zones de tissus sont minéralisées. La paroi des kystes peut alors être intacte, fragmentée ou disloquée. Les cytophanères sont discontinus et ne sont plus mesurables. Les kystes ouverts et les myocytes nécrotiques sont infiltrés de granulocytes éosinophiles et de quelques macrophages.

Dans les derniers stades, les tissus ont complètement dégénéré, en leur centre, on trouve des fragments de sarcoplasme, des globules blancs en voie de lyse. Les kystes sarcosporidiens ne sont plus visibles. La paroi du granulome est alors constituée de cellules géantes multi-nucléées, de lymphocytes et de tissu fibreux (Jensen et al., 1986).

## (2) Selon le type de lésions

Dans le cas des lésions en forme de points ou de traînées, de couleur verte ou gris-vert, de quelques millimètres de long et de quelques millimètres de diamètre, l'examen histologique révèle des granulomes inflammatoires qui varient de taille et de forme au cours du temps et peuvent occuper toute la longueur de la fibre musculaire. Ils sont tout d'abord formés d'un centre nécrotique caractérisé par une nécrose segmentaire des myocytes et une dégénérescence hyaline. Ce centre nécrotique est entouré par des granulocytes éosinophiles qui libèrent leurs granules et de quelques macrophages. Le noyau de la cellule musculaire est pycnotique et il y a chromatolyse. Les fragments de myocyte sont phagocytés par des cellules géantes multinucléées. Les éosinophiles infiltrés dégénèrent. Certaines zones se

minéralisent, rendant les cellules non identifiables. En périphérie, le granulome est constitué de granulocytes éosinophiles additionnels et de cellules épithélioïdes disposées en palissade, orientées vers le centre du granulome. On observe une zone de transition entre le granulome et le muscle sain présentant des lymphocytes, des granulocytes éosinophiles, quelques macrophages, des mastocytes dégranulés et des érythrocytes dans un stroma de fibroblastes et de néo-capillaires. L'évolution ultime du granulome se traduit par une dégénérescence sévère des tissus avec au centre des fragments de sarcoplasme, des leucocytes morts et des granules de cellules désintégrées. La paroi du granulome est constituée de cellules géantes multinucléées, de lymphocytes et de tissus fibreux. Les espaces périgranulomateux et intergranulomateux sont caractérisés par des cicatrices fibreuses avec des cellules géantes et des agrégats de lymphocytes et de granulocytes éosinophiles dégénérés. Les fibres musculaires périphériques subissent des changements allant jusqu'à l'atrophie. Ces changements diminuent proportionnellement à la distance avec la lésion.

Dans les formes suppurées, des granulocytes neutrophiles partent en rayons à partir des kystes sarcosporidiens dégénérés. On trouve également des kystes intacts dans les fibres musculaires adjacentes sans réaction inflammatoire. Comme les sarcocystes sont difficilement trouvés dans les lésions inflammatoires, le diagnostic repose sur de nombreux prélèvements, y compris dans le tissu non inflammatoire.

Dans le cas des lésions locales, larges de quelques centimètres de diamètre, les lésions microscopiques se traduisent, en phase aiguë ou en phase subaiguë, par un exsudat accompagné majoritairement d'éosinophiles mais aussi d'érythrocytes, de granulocytes neutrophiles, de macrophages et de plasmocytes concentrés dans le périmysium. Les myocytes commencent à s'atrophier ou se nécroser, se fragmenter et se vacuoliser. Des fibroblastes et des capillaires commencent à remplacer les fibres musculaires. En phase chronique, l'exsudat se résorbe et une fibrose extensive remplace les fibres musculaires. On n'observe dans ce cas-là aucun granulome et aucun kyste sarcosporidien ouvert, mais parfois des kystes intacts témoins de l'infestation (Jensen, 1986).

## **E. Diagnostic sérologique chez l'hôte intermédiaire**

Les méthodes immunologiques permettent de détecter l'infestation mais ne permettent pas de différencier les espèces de sarcosporidies impliquées. En effet, il existe de nombreuses réactions croisées entre les différentes espèces mais également avec *T. gondii* (Tenter, 1995). Ces tests réalisables du vivant de l'animal utilisent du sérum. qu'il s'agisse d'échantillons individuels ou de mélange. De plus, les méthodes immunologiques ne permettent pas de détecter la sarcosporidiose dans sa phase aiguë ou après un avortement induit par la sarcosporidiose car les

niveaux d'anticorps sont trop faibles (Tenter, 1995). La réponse IgM est transitoire et ne dure que quelques mois. La réponse IgG apparaît 30 jours après l'infestation et atteint son pic au bout de 3 mois (Uggla, Buxton, 1990).

### **1. L'IHAT (Indirect Hemmagglutination Antibody Test)**

L'hémagglutination indirecte (Lunde, Fayer, 1977) est réalisée avec des érythrocytes de mouton "sensibilisés", c'est-à-dire ayant été mis en contact avec des antigènes de *Sarcocystis spp.*, et du sérum de bovin dans des puits de plaques de micro-titration.

Le test utilise des antigènes issus des bradyzoïtes et des mérozoïtes. Ils sont libérés des kystes par une technique de digestion utilisant une solution à base de pepsine et de HCl à 37°C sous agitation magnétique. Puis, la solution de mérozoïtes et de bradyzoïtes est centrifugée à 10000 g pendant 30 min. Le surnageant est récupéré et forme la solution d'antigènes. La solution d'antigène est mise au contact du sérum de bovin à tester. Le test est lu après incubation pendant 1h à 37°C. Les érythrocytes de mouton non "sensibilisés" sont utilisés comme témoins de contrôle négatifs.

La présence d'anticorps contre *Toxoplasma gondii* n'entraîne pas de faux positifs (Lunde, Fayer 1977).

### **2. L'AGID (Agar Gel ImmunoDiffusion)**

L'immunodiffusion sur gel (Lunde, Fayer, 1977) se réalise sur une gélose percée de puits. Une solution d'antigènes non-dilués est placée dans le puits central, du sérum non-dilué est placé dans les puits en périphérie. La solution d'antigène est issue du surnageant d'une solution de mérozoïtes et de bradyzoïtes centrifugés à 10000 g pendant 30 min. Le test est lu après incubation à 4°C pendant 3 à 4 jours.

Ce test est moins sensible que l'hémagglutination indirecte (Lunde, Fayer, 1977).

### **3. L'IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test)**

Le test par immunofluorescence indirecte (Moré et al., 2007; Moré et al., 2010; Moré et al., 2011) s'effectue avec du sérum et des anticorps IgG anti-bovin conjugués avec de l'isothiocyanate de fluorescéine. Le test utilise des techniques de fixation et la microscopie à fluorescence.

Les antigènes utilisés sont issus des bradyzoïtes contenus dans les kystes et récupérés par une technique de digestion avec de la pepsine et du HCl. Deux techniques sont possibles. Soit, ils sont homogénéisés avec un homogénéiseur de tissu et soumis à une sonication, puis les antigènes sont récupérés et adsorbés sur des disques de cellulose. Soit, les bradyzoïtes sont fixés directement dans des puits sur des lames pour IFAT (Moré et al., 2007). La fluorescence est mesurée à 540 nm sous une lumière de 475 nm avec un fluoromètre (Ely, Fox 1989). Du sérum de fœtus de bovin est utilisé comme témoin de contrôle négatif (Moré et al., 2007).

Il n'y a pas de réaction croisée avec *T. gondii* (Moré et al., 2007). Cette technique est la plus utilisée (Ely, Fox 1989; Latif et al., 1999; Moré et al., 2007; Moré et al., 2010; Moré et al., 2011).

#### **4. L'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)**

La méthode immuno-enzymatique ELISA est réalisée avec du sérum, des anticorps IgG anti-bovin (Metwally, Abd Ellah, AL-Hosary, Omar, 2013) ou anti-caprin (Kalubowila, Udagama-Randeniya, Perera, Rajapakse, 2004) conjugués à une peroxydase et un substrat à base de TMB ou tétraméthylbenzidine.

Les antigènes utilisés pour ce test proviennent de mérozoïtes ou de bradyzoïtes. Une solution de mérozoïtes ou de bradyzoïtes est centrifugée à 15000 g pendant 30 min, le surnageant est récupéré et forme la solution d'antigènes (Kalubowila, Udagama-Randeniya, Perera, Rajapakse, 2004). Cette solution d'antigènes, diluée dans un tampon, est utilisée pour recouvrir la surface des puits d'une plaque de micro-titration. Les plaques sont incubées une nuit à 4°C. Puis, chaque puits est rempli avec du sérum de lapin et un tampon et la plaque est incubée pendant 1h30 à 37°C. Ensuite, la plaque est lavée et on ajoute le sérum à tester et on incube de nouveau dans les mêmes conditions. Puis, après un deuxième lavage de la plaque on ajoute les anticorps anti-bovin ou anti-caprin et on met de nouveau en incubation (1h30 à 37°C). Enfin, on lave la plaque et on ajoute le tétraméthylbenzidine et le test est lu après 10 min. La densité optique est mesurée à 405 nm (Savini, Robertson, Dunsmore, 1997a; Kalubowila, Udagama-Randeniya, Perera, Rajapakse, 2004) ou 450 nm (Metwally, Abd Ellah, AL-Hosary, Omar, 2013). Du sérum de fœtus de bovin peut être utilisé comme témoin de contrôle négatif additionnel (Kalubowila, Udagama-Randeniya, Perera, Rajapakse 2004).

Les antigènes issus des bradyzoïtes sont plus adaptés à la détection des formes chroniques de l'infestation. Les antigènes issus des mérozoïtes sont plus adaptés à la détection des phases aiguës de l'infestation (Kalubowila, Udagama-Randeniya, Perera, Rajapakse 2004). La spécificité et la sensibilité sont supérieures lorsqu'on utilise les antigènes de mérozoïtes : respectivement 97% et 98 % (contre 84% et 95% avec des antigènes de bradyzoïtes). En effet, avec les mérozoïtes comme base des antigènes, l'ELISA détecte des titres en anticorps plus élevés et

plus précocement (Savini, Robertson, Dunsmore, 1997b). Les IgM ne peuvent pas être utilisées car le pic d'IgM dure peu de temps (Savini, Robertson, Dunsmore, 1997a).

## **F. Diagnostic moléculaire chez l'hôte intermédiaire**

On peut distinguer les différentes espèces de sarcosporidies grâce au séquençage du génome, à la PCR, etc.... L'utilisation de la PCR permet d'augmenter la sensibilité et la précision de la détection des kystes sarcosporidiens dans les muscles (Nourollahi Fard, Asghari, Nouri, 2009). La présence de *S. hominis* dans la viande pourrait entraîner le retrait de celle-ci de la chaîne alimentaire à cause de son potentiel zoonotique. L'identification des espèces de sarcosporidies par des moyens sûrs et précis est donc un véritable besoin. Les techniques utilisant la PCR sont relativement peu coûteuses et rapides. Ces techniques peuvent être utilisées du vivant de l'animal à partir de biopsie ou à partir de nécropsie. Elles sont réalisées sur des échantillons individuels.

L'ADN ribosomique 18S de la petite sous-unité ribosomique a été utilisé dans de nombreuses études (Yang et al., 2001; Yang et al., 2002; Kia et al., 2011; Dahlgren et al., 2007; Dahlgren, Gjerde, 2007; Jehle et al., 2009). Le ribosome est constitué de deux sous-unités, une grande et une petite. La grande sous-unité comporte l'ARNr 5S, l'ARNr 28S, l'ARNr 5.8S et des protéines ribosomiques. La petite sous-unité comporte l'ARNr 18S et des protéines ribosomiques. L'ARNr 18S est impliqué dans la lecture de l'ARN messager. C'est lui qui vérifie que l'interaction entre le codon situé dans le ribosome et l'anticodon de l'ARNt est correcte. L'ARNr 18S de la petite sous-unité ribosomique fait partie des molécules évoluant le plus lentement au sein des êtres vivants (Tenter, 1995). Il possède de nombreuses régions hypervariables et de nombreuses régions répétées ce qui permet la caractérisation des différentes espèces et l'identification de chacune d'entre elles. Chez les eucaryotes, il y a jusqu'à 100 copies identiques du gène de l'ADNr pour un génome haploïde, réparties sur différents chromosomes (Fischer, Odening, 1998). De plus, il présente une faible homologie interspécifique par rapport à l'homologie intra-spécifique (Yang et al., 2001). D'autres gènes pourraient servir de base à de futures études : le gène de l'ARN ribosomique 28S ou le gène de l'ARN ribosomique 5.8S (Yang et al., 2002; Li et al., 2002) qui sont présents dans la grande sous-unité ribosomique.

Une autre étude se base sur le gène de la sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase ou Cox1 (Gjerde, 2013). Les séquences obtenues donnent des arbres phylogénétiques comparables à ceux fondés sur la sous-unité de l'ARN 18S. Mais les séquences sont plus faciles à aligner et cela semble plus facile de distinguer des espèces proches. Le gène Cox 1 semble être un gène plus intéressant que celui de l'ARN 18S pour distinguer les espèces.

## 1. La PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne est une technique d'amplification *in vitro* d'un segment particulier d'ADN à partir d'un mélange de séquences. La PCR est basée sur la répétition de cycles qui amplifie le nombre de séquences cibles. Chaque cycle est constitué de 3 étapes : dénaturation de l'ADN, hybridation des amorces et élongation.

Comme source d'ADN, on peut choisir : un morceau de muscle (Jehle et al., 2009; Moré et al., 2011; Kia et al., 2011), des kystes sarcosporidiens isolés de muscles frais (Dahlgren et al., 2007; Yang et al., 2001; Xiang et al., 2011), une solution de bradyzoïtes purifiée (Güçlü, Aldemir, Guler, 2004)... L'ADN génomique est isolé, par digestion des bradyzoïtes et des mérozoïtes avec la protéinase K et la trypsine. L'ADN est extrait grâce à une méthode utilisant du phénol-chloroforme (Yang et al., 2001; Li et al., 2002; Güçlü, Aldemir, Guler, 2004; Jehle et al., 2009) et une précipitation à l'éthanol ou grâce à des kits commerciaux (Domenis et al., 2011; Moré et al., 2011; Moré et al., 2013). La quantité d'ADN isolée peut être mesurée par un spectrophotomètre (Carletti et al., 2013). Pour éliminer l'ARN restant, on peut ajouter une ARNase (Güçlü, Aldemir, Guler, 2004).

Pour la PCR classique, une séquence d'environ 700 pb (Moré et al., 2011) à 900 pb (Yang et al., 2002) de l'ADN ribosomique 18S est amplifiée. Le choix des amorces est essentiel. Il faut utiliser des amorces spécifiques de chacune des espèces de sarcosporidies ciblées par la PCR. Il faut également choisir un témoin positif : muscle cardiaque contenant *S. cruzi* (Moré et al., 2011) et un témoin négatif : réactifs sans ADN de sarcosporidies à amplifier (Carletti et al., 2013)... Ensuite, le mélange pour la PCR est réalisé : solution d'ADN, amorces, Taq polymérase, KCl, Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub>, dATP, dCTP, dGTP, dTTP... et placé dans le thermocycleur pour la procédure d'amplification. Les produits d'amplification sont purifiés grâce à des kits commerciaux, séparés sur gel d'agarose et colorés avec du bromure d'éthidium (Dahlgren, Gjerde 2007; Kia et al., 2011; Yang et al., 2002) ou du SYBR green (Moré et al., 2011) ou alors séparés sur gel de polyacrylamide et colorés avec du nitrate d'argent (Moré et al., 2007). Puis, ils sont visualisés au transilluminateur à UV ou en lumière bleu s'ils ont été colorés au SYBR.

La sensibilité de la PCR peut être augmentée en réalisant une PCR nichée. La sensibilité et la spécificité peuvent être augmentées en réalisant une PCR en temps réel, car l'amplification et la détection des produits de PCR se fait au fur et à mesure.

## 2. La PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

La technique de la PCR-RFLP se base sur le polymorphisme des longueurs des fragments de restriction.

L'utilisation de la PCR-RFLP et de différentes endonucléases, comme EcoR1, Taq1, Dra1, Hinf1, Alu1, Pst1, Bcl1, ACC1, Mbo2, Ssp1, Rsa1 et Mbo1 (Yang et al., 2002), ou Fok1, Dra1, Bsl1 et Ssp1 (Jehle et al., 2009), ou Bcl1 et Rsa1 (Moré et al., 2011), sur les produits de l'amplification du gène de l'ADN ribosomique 18S, a permis de déterminer le nombre de sites de restriction et la taille des fragments de restriction pour de nombreuses espèces de sarcosporidies.

Chaque produit de la PCR est purifié par un kit commercial (Li et al., 2002) et incubé avec chacune des enzymes de restrictions séparément. Les réactions sont stoppées par l'ajout d'un tampon de chargement et on réalise une électrophorèse sur gel d'agarose. Puis, les produits de l'électrophorèse sont colorés avec du bromure d'éthidium et visualisés au transilluminateur à UV. Cela a permis d'observer les différents motifs électromorphes selon les endonucléases utilisées et donc de déterminer le motif correspondant à une espèce donnée selon l'endonucléase utilisée.

La PCR-RFLP ne permet pas de distinguer *S. hominis* et *S. sinensis*. En effet, il n'y a que 10 bases de différences entre les 2 séquences du gène de l'ARN ribosomique 18S des espèces (Jehle et al., 2009).

### **3. La PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA)**

La PCR-RAPD ou amplification aléatoire d'ADN polymorphe (Güçlü, Aldemir, Guler 2004) est une technique qui consiste à réaliser une amplification PCR avec des amorces d'environ 10 pb choisies aléatoirement. Cette technique a l'avantage d'être rapide, elle demande peu de mise au point car elle ne nécessite pas de connaître la séquence qui doit être amplifiée. On réalise une électrophorèse sur gel d'agarose. Puis, les produits de l'électrophorèse sont colorés avec du bromure d'éthidium et visualisés au transilluminateur à UV. Grâce au nombre et à la longueur des produits d'amplification, on peut déterminer selon l'amorce utilisée s'il y a une espèce de sarcosporidie présente et l'identifier.

C'est l'une des seules techniques moléculaires à ne pas cibler uniquement l'ADN ribosomique 18S et à utiliser tout l'ADN génomique. Cette technique est ancienne et n'est plus beaucoup utilisée.

### **4. LA PCR multiplex en temps réel**

La PCR multiplex en temps réel (Moré et al., 2013) consiste à réaliser une amplification PCR avec des combinaisons d'amorces, permettant l'amplification de l'ADN de plusieurs espèces de sarcosporidies. Cette PCR multiplex a pour cible le gène de l'ADN ribosomique 18S, une séquence d'environ 900 pb (Moré et al., 2013) de celui-ci est amplifiée. Comme elle est en temps réel, elle est quantitative. La

réalisation d'une PCR multiplex en temps réel comprend toutes les étapes d'une PCR "classique" mis à part les étapes de révélation et de visualisation des produits de la PCR.

Cette technique permet de réduire les coûts et le temps de réalisation (les cycles sont plus courts et l'identification de plusieurs espèces est simultanée), tout en permettant d'identifier les différentes espèces de sarcosporidies avec une sensibilité et une bonne spécificité. Cependant, l'élaboration d'une telle technique est très longue. Il faut tester chaque sonde séparément, puis les tester groupées, et optimiser la concentration de chacune d'elles pour obtenir les résultats les plus précis possibles.

## 5. Le séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN ribosomique 18S a permis l'identification précise de chaque espèce de sarcosporidie et des analyses phylogénétiques des différentes espèces de sarcosporidies (Dahlgren, Gjerde, 2007).

Les produits des PCR sont purifiés par un kit commercial (Fischer, Odening, 1998; Dahlgren, Gjerde, 2007) et séquencés avec des kits commerciaux et des séquenceurs automatiques. Le séquençage est réalisé selon la méthode de Sanger (Fischer, Odening, 1998).

La méthode de séquençage de Sanger ou méthode par terminaison de chaîne utilise des didésoxyribonucléotides. On réalise une PCR particulière. On place, dans le mélange réactionnel, les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et une faible concentration de l'un des quatre didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP). Ces didésoxyribonucléotides agissent comme des terminateurs de chaîne, dès qu'ils sont incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation. Pour le séquençage complet d'un même fragment d'ADN, on répète cette réaction quatre fois en parallèle, avec les quatre didésoxyribonucléotides différents. La détection des fragments ainsi synthétisés se fait en incorporant un traceur fluorescent dans l'ADN synthétisé. Les séquences obtenues sont ensuite alignées et on les compare en se basant sur l'analyse des divergences et des similarités : matrice de distance, puis on crée un arbre phylogénétique en se basant sur les critères d'évolution minimum : chercher l'arbre le plus court parmi les arbres des distances (Xiang et al., 2011).

Les analyses phylogénétiques ont permis de prouver que les *S. cruzi* présents chez les bovins, les zébus et les bisons étaient de la même espèce (Fischer, Odening, 1998). Le séquençage de l'ADN a également permis de mettre en évidence une courte séquence de nucléotides typique des espèces de sarcosporidies ayant pour hôte définitif le chien (Dahlgren, Gjerde, 2007).

Cependant, le séquençage du génome est une technique très coûteuse et irréalisable en routine. De plus, très peu d'espèces de sarcosporidies ont eu leur

gène de l'ARN ribosomique 18S séquencé et il reste encore beaucoup d'analyse phylogénétique à faire.

Enfin, les espèces ayant récemment divergé ou les espèces très proches sont difficiles à distinguer avec cette méthode. C'est pour cette raison que de nouvelles études basées sur d'autres gènes comme le gène de la sous-unité de la cytochrome c oxydase se développe (Gjerde, 2013).

## **G. Diagnostic de troupeau chez les hôtes intermédiaires**

Pour déterminer si un élevage est infesté par *Sarcocystis*, on peut utiliser les techniques d'histologie ou d'ELISA. On considère qu'un troupeau est négatif si au moins 5 animaux du même troupeau ont été testés négatifs, on considère un troupeau comme positif quand au moins un animal a été testé positif. Le choix des cinq animaux négatifs est basé sur les tables de Canon et Roe (1982) qui donnent le nombre d'animaux à échantillonner pour être sûr à 95% que la maladie testée est absente malgré la taille variable des troupeaux. On obtient une sensibilité et une spécificité des tests histologiques et ELISA équivalentes. L'avantage des tests ELISA est qu'ils peuvent être réalisés du vivant de l'animal. Ils pourraient donc être utilisés dans des programmes de surveillance de la sarcosporidiose (Savini, Robertson, Dunsmore 1997b).

## **H. Diagnostic macroscopique chez l'hôte intermédiaire de la sarcosporidiose chronique : la myosite éosinophilique**

C'est le diagnostic classique de la sarcosporidiose. Il est réalisé par inspection visuelle lors de l'inspection des viandes à l'abattoir. La technique d'inspection visuelle à l'abattoir dépend de l'expérience de l'opérateur et de l'endroit où les incisions musculaires sont réalisées sur la carcasse.

De plus, l'inspection des carcasses ne permet ni de détecter les kystes microscopiques ni de différencier les espèces de sarcosporidies. En effet, la myosite éosinophilique n'est pas associée à une espèce de sarcosporidie en particulier et différentes espèces de sarcosporidies peuvent être présentes dans les lésions de myosite éosinophilique (Vangeel et al., 2013).

La myosite éosinophilique est un processus inflammatoire subaigu à chronique touchant les muscles striés. On distingue trois présentations possibles de la myosite éosinophilique selon son extension : la polymyosite éosinophilique, la périmyosite éosinophilique et la myosite focale. Les lieux d'élection des lésions sont : l'œsophage, le diaphragme, les muscles squelettiques, le cœur (Vangeel et al., 2012).

La dégénérescence des kystes sarcosporidiens provoque, dans le cas le plus fréquent, macroscopiquement, des lésions en forme de points ou de traînées de couleur verte ou gris-vert de 2 à 10 mm de long et de 2 à 8 mm de diamètre. Plus rarement, des lésions locales, larges (de 5 à 15 cm de diamètre), globulaires, fermes, jaune pâle à vertes et bien délimitées par le périnysium ou l'épinysium (Kimura, 2011 ; Jensen et al., 1986).

Aucune bactérie ni virus pathogènes et aucune carence ne provoquent de telles lésions (Jensen et al., 1986). En revanche, il est prouvé que d'autres parasites musculaires provoquent de telles lésions : *Trichinella spiralis* (Ely, Fox 1989) ou encore la migration de trématodes ou d'échinocoques (Javadi, Doustar, 2011).

En outre, il existerait des espèces de *Sarcocystis* géantes, visibles à l'œil nu : c'est le cas de *S. fusiformis* et *S. buffalonis* infestant les buffles d'eau ou *S. gigantea* infestant les ovins (Huong, 1999). *S. hirsuta* pourrait dans des cas très rares se présenter sous forme macroscopique lorsqu'un kyste mature contiendrait des milliers de bradyzoïtes (Lindsay, Blagburn, Braund 1995).

A noter que lors d'infestation aiguë par *Sarcocystis*, le diagnostic nécropsique n'est pas conclusif car les lésions de myosite éosinophilique n'ont pas eu le temps de se mettre en place et les symptômes ne sont pas spécifiques (Dubey, Fayer, Speer 1988).

Techniques	+	-
<b>Microscopie</b>	Peu coûteux Réalisable sur animal vivant	Long Risque de faux négatif, faible sensibilité Identification d'espèce possible uniquement au MET
<b>Techniques Immunologiques</b>	Peu coûteux, rapide Réalisable sur animal vivant	Réactions croisées avec <i>T. gondii</i> Identification d'espèce impossible
<b>Techniques Moléculaires</b>	Rapide Réalisable sur animal vivant Identification d'espèce possible	Coûteux, nécessite du matériel et de la technique
<b>Examen visuel</b>	Peu coûteux, rapide	Uniquement sur carcasse Ne détecte que les lésions de myosite éosinophilique Kystes microscopiques non détectés Identification d'espèce impossible

**Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différentes méthodes diagnostiques de la sarcosporidiose chez l'hôte intermédiaire**

## **I. Diagnostic de la sarcosporidiose chez l'hôte définitif au stade parasitaire**

### **1. La coproscopie**

Pour déterminer les hôtes définitifs de certaines espèces de sarcosporidies, des essais cliniques ont été menés. (Levine, 1977; Pena, Ogassawara, Sinhorin, 2001; Xiang et al., 2011; Chen et al., 2011; Morsy et al., 2011). Des chiens, des chats ou des volontaires humains ont reçu une quantité donnée de muscles contenant des kystes. Un suivi clinique a été réalisé et des prélèvements de selles ont été analysés grâce à des techniques de flottation, pour rechercher l'émission de sporocystes et d'ookystes. Les techniques de flottation utilisent des solutions de haute densité contenant du chlorure de sodium, du chlorure de césium, du sulfate de zinc ou du saccharose (Fayer, 2004), comme la technique de flottation au sucre (Gajadhar, Marquardt, 1992; Pena, Ogassawara, Sinhorin, 2001). Ces méthodes sont très longues et très coûteuses. De plus, leur sensibilité est faible (Tenter, 1995).

Les sporocystes de *S. cruzi* mesurent environ 14 à 17  $\mu\text{m}$  de long sur 9 à 13  $\mu\text{m}$  de large, ceux de *S. hirsuta* 11 à 14  $\mu\text{m}$  de long sur 7 à 9  $\mu\text{m}$  de large et ceux de *S. hominis* 13 à 18  $\mu\text{m}$  de long sur 8 à 11  $\mu\text{m}$  de large (Levine, 1977).

## **2. L'histologie**

On peut réaliser un raclage de la muqueuse intestinale (Xiang et al., 2009) ou prélever des biopsies avec analyses histologiques de portions d'intestin (Latif et al., 1999) pour rechercher les microgamètes, macrogamètes, les sporocystes et les ookystes. Ces méthodes sont très invasives.

A l'examen histologique, on peut aussi identifier des remaniements de la muqueuse intestinale avec une diminution de la longueur des villosités, une hypertrophie des cryptes et une augmentation de la cellularité caractérisée par une infiltration massive de granulocytes éosinophiles ainsi que quelques granulocytes neutrophiles et plasmocytes (Velásquez et al., 2008).

## **3. La PCR**

Cependant, il est très difficile de différencier, en microscopie, les sporocystes ou les ookystes selon des critères morphologiques. Ils ont la même taille et la même forme (Tenter, 1995). Une méthode de PCR-RFLP a été développée pour identifier les sporocystes avec précision (Xiang et al., 2011). L'ADN est extrait des ookystes par la méthode phénol-chloroforme. Le gène ADN ribosomique 18S est amplifié par une PCR nichée, cette technique permet d'obtenir suffisamment de produits d'amplification malgré la faible taille des échantillons et la présence d'inhibiteurs de la PCR dans les fèces. Les produits de la PCR sont purifiés puis incubés séparément avec différentes enzymes de restriction : Dra1, Mbo1, Rsa1, Ssp1. Les motifs électromorphes obtenus pour les sporocystes excrétés sont identiques à ceux obtenus pour l'ADN issu de kystes et permettent ainsi l'identification de l'espèce de sarcosporidie.

## **vi. Moyens de lutte**

### **A. Prophylaxie médicale**

Il n'existe pas de méthode de dépistage ante-mortem de routine. Le diagnostic n'étant pas souvent établi, la seule thérapeutique instituée est souvent une thérapeutique symptomatique et palliative.

De plus, il n'existe pas de traitement pour la sarcosporidiose. Les anticoccidiens comme l'amprolium (dérivé du picolinium, anti-vitamine B1, la vitamine B1 étant un facteur de croissance des coccidies), le toltrazuril (dérivé triazinonique), l'halofuginone (dérivé des quinazolidones), l'oxytétracycline (Euzéby, 1997 ; Euzéby, 1998), les sulfamides ou la pyriméthamine (antipaludéen) pourraient être utilisés (Dubey, Lindsay, 2006). Ce traitement ne serait envisageable qu'en cas de sarcosporidiose aiguë chez le bovin (Euzéby, 1998).

Chez l'hôte définitif, il doit être renouvelé toutes les semaines pendant trois mois, pour prévenir les rechutes qui pourraient survenir du fait de l'absence de réaction immunitaire. Chez l'homme, dans le cas d'un patient immunodéprimé, le triméthoprime-sulfaméthoxazole et l'albendazole avaient fait régresser provisoirement les symptômes de sarcosporidiose systémique (Velásquez et al., 2008, Euzéby, 1998).

En pratique, il n'existe pas de vaccin pour prévenir la maladie chez l'homme ou chez les animaux. En revanche, une administration aux bovins de 100 000 à 200 000 sporocystes de *S. cruzi* protège les animaux contre une infestation d'épreuve qui, à la dose de 500 000 sporocystes, tue les animaux témoins en 3 à 8 mois (Euzéby, 1998).

## **B. Prophylaxie sanitaire**

Elle doit se faire en interrompant le cycle parasitaire.

### **1. Chez l'hôte intermédiaire**

Tout d'abord, il faudrait contrôler la contamination des ruminants par les sporocystes en évitant la contamination de l'eau et de la nourriture par les fèces d'hôtes définitifs contaminés.

### **2. Chez l'hôte définitif**

Il faudrait contrôler la transmission des ookystes de *S. cruzi* et *S. hirsuta* respectivement par les canidés et félidés :

- contrôler les mouvements des animaux domestiques, particulièrement les chiens qui contribuent plus que les autres hôtes définitifs à la perpétuation du cycle parasitaire (Gajadhar, Marquardt, 1992)

- éliminer les animaux errants et la faune sauvage de l'environnement immédiat des bovins
- interdire de nourrir les chiens et chats avec les viscères et la viande crue et les éloigner de tout produit d'origine bovine (animaux trouvés morts, placentas).

Il faudrait aussi contrôler la transmission des ookystes de *S. hominis* par l'homme :

- privilégier le système de "tout à l'égout" dans l'élevage
- éviter toute défécation humaine près de l'eau ou de la nourriture pour bétail
- éviter l'épandage de fosses septiques ou de lisiers non traitées sur des pâtures. Le traitement des boues d'épuration et des lisiers consistent en un conditionnement pour permettre la stabilisation des boues et une hygiénisation par compostage ou adjonction de chaux, de nitrites, et enfin une déshydratation.

De plus, il n'y a pas d'analyse spécifique de la viande à l'abattoir pour rechercher les kystes sarcosporidiens. Des kystes sarcosporidiens ont été retrouvés dans des steaks hachés aux États-Unis (Prayson, McMahon, Prayson, 2008). Au vu de la prévalence du parasite et des coûts diagnostiques, il est inenvisageable d'assainir la viande et de la retirer de la consommation lors d'infestation. Il faudrait donc informer le consommateur des comportements à risques. Les habitudes alimentaires consistant à manger de la viande crue ou insuffisamment cuite dans les pays européens augmentent le risque de sarcosporidiose chez l'homme. La congélation à -5°C pendant 48h ou à -20°C pendant 24h et la cuisson à cœur, à 70-75° pendant 20 à 25 min, tuent le parasite et n'offrent ainsi aucun risque de contamination. La cuisson dans les fours à micro-ondes, pendant laquelle la durée d'exposition à une telle température n'est pas suffisante, n'a pas de pouvoir stérilisateur. L'irradiation (0,3 à 0,6 kGy) exerce un effet létal sur les kystes sarcosporidiens (Euzéby, 1997 ; Euzéby, 1998).

Lors de la saisie d'une carcasse à l'abattoir pour myosite éosinophilique, il faudrait mener une enquête sur l'exploitation dont l'animal est issu pour mettre en évidence tous les facteurs de risque et les gérer comme expliqué ci-dessus (Do et al., 2008). En revanche, il apparaît que les carcasses sans myosite éosinophilique contribuent davantage à perpétuer le cycle parasitaire que celles présentant de la myosite éosinophilique (Gajadhar, Marquardt, 1992) pour la simple raison qu'elles ne sont pas détectées lors du contrôle des viandes.

## **vii. Importance économique**

### **A. Sarcosporidiose clinique ou sub-clinique**

La sarcosporidiose peut être responsable d'une maladie aiguë fatale entraînant une perte économique évidente pour l'éleveur.

Par ailleurs, on peut observer des signes cliniques (fièvre, anorexie, anémie...) pouvant altérer les performances des bovins. Les pertes économiques objectivables sont alors des avortements, une baisse de la production laitière et une diminution de GMQ de 25%. Une explication possible concernant cette baisse de GMQ est la destruction musculaire chez les animaux infestés par *Sarcocystis* à partir du 60<sup>ème</sup> jour post-infestation : l'augmentation de l'activité enzymatique de la lactate-déshydrogénase, de la sorbitol-déshydrogénase, de l'aspartate amino-transférase, de la créatinine phosphokinase et de l'aldolase dans le plasma des animaux infestés et la diminution de cette activité dans les muscles vient étayer cette hypothèse. Ces pertes peuvent être réduites par nursing des animaux : traitement symptomatique, alimentation appétente, abreuvement suffisant... L'occurrence, la distribution et l'importance économique qui en découlent dans chaque système et dans chaque catégorie de production restent encore à étudier (Moré et al., 2011; Dubey, Bergeron, 1982; Dauschies et al., 2000 ; Euzéby, 1998).

### **B. Saisies à l'abattoir pour « lésions évoquant la sarcosporidiose »**

#### **1. Nature de la saisie**

Lors de l'abattage de l'animal, la sarcosporidiose peut entraîner un déclassement de la carcasse et donc des pertes économiques pour l'éleveur.

Macroscopiquement, les kystes sont indétectables dans la majorité des cas. Certaines formes macroscopiques de kystes de *S. hirsuta* ont été rapportées mais cela reste anecdotique (Hamidinejat, Razi Jalali, Nabari, 2010). La présence d'une infestation par *Sarcocystis* spp. ne modifie pas la qualité organoleptique de la viande (Dauschies et al., 2000).

Les inspecteurs à l'abattoir ne remarquent que les kystes coalescents ou en voie de dégénérescence lors de l'inspection post-mortem. Le terme de myosite éosinophilique est utilisé pour décrire les lésions. Il n'existe cependant pas de test spécifique à l'abattoir pour détecter la myosite éosinophilique. Les viandes atteintes de myosite éosinophilique sont déclarées impropres à la consommation humaine et saisies.

## **2. Définitions réglementaires concernant la saisie pour sarcosporidiose**

Le règlement (CE) n°854/2004 du Parlement Européen et du conseil du 29 avril 2004 précise dans son annexe I section II chapitre V l'ensemble des motifs permettant de déclarer une viande impropre à la consommation humaine. Deux types de motifs de saisie lors de sarcosporidiose sont alors possibles :

- Saisie pour « infestation parasitaire »
- Saisie pour « anomalie organoleptique » concernant dans le cas de sarcosporidiose la couleur de la viande.

## **3. Suivi réglementaire des saisies pour sarcosporidiose au sein de l'Union Européenne**

En 2003, l'EFSA a mis en place un programme de contrôle des zoonoses dans l'UE., *S. hominis* n'était pas inclus dans la liste A des agents zoonotiques à gérer mais pouvait être inclus dans la liste « autres zoonoses » dont la stratégie de gestion dépend de la situation épidémiologique du pays.

Le règlement CE n° 854/2004 englobe *S. hominis* dans le terme générique de « maladies zoonotiques » qui doivent être surveillées à l'abattoir. Cependant, comme la sarcosporidiose n'est pas une maladie à déclarer dans les Etats membres, peu d'informations sont reçues à son propos. Par exemple, entre 2004 et 2006 seuls la Belgique et le Luxembourg ont fait l'effort de centraliser les cas de *S. hominis*.

Dans un rapport de l'EFSA datant de 2006, il est noté que les parasites comme *Sarcocystis* sont moins fréquemment rapportés et causent moins d'épidémies que les bactéries et les virus. Néanmoins, l'impact de ces agents zoonotiques sur les personnes vulnérables et immunodéprimées peut être considérable (maladie sévère pouvant aller jusqu'à la mort, coût de gestion élevé). Il est donc rapporté qu'il est nécessaire de mettre en place une stratégie de collecte de données, d'enregistrement et de gestion (EFSA 2006a; EFSA 2006b; EFSA 2007a; EFSA 2007b).

Un rapport de l'EFSA de 2007 mettait en avant le fait que la situation européenne par rapport à l'incidence de *Sarcocystis* sur la population animale et les conséquences en santé humaine de la sarcosporidiose n'étaient pas claires (EFSA 2007a; EFSA 2007b)

Le dernier compte-rendu de l'EFSA par rapport à *Sarcocystis* est paru en 2010. Il visait à clarifier la situation dans les Etats membres de l'Union Européenne et à harmoniser la gestion et la déclaration des cas d'infestation à *Sarcocystis* chez les

bovins et dans les denrées alimentaires d'origine bovine. Cette étude proposait d'étudier l'importance du parasite en santé humaine donc ne concernait qu'une espèce chez le bovin : *S. hominis*. En raison d'un manque de données dans les différents états membres, l'impact de *Sarcocystis* sur la santé humaine n'est pas encore clair. La principale limite à la connaissance de l'impact réel de *Sarcocystis* en santé publique est l'absence de méthode de détection appropriée. En effet, il n'existe pas de méthode de détection spécifique, seule l'inspection visuelle permet de détecter les lésions macroscopiques engendrées par le parasite sans possibilité de distinguer espèces zoonotiques et non-zoonotiques. La diagnose d'espèce nécessiterait une observation au microscope électronique, ce qui n'est pas envisageable en routine. De plus, peu d'études et de publications réalisées par les Etats membres de l'Union Européenne sont disponibles sur le sujet.

La conclusion de ce dernier compte-rendu est que sans prouver l'existence d'un impact réel en santé humaine, il n'y a pas lieu de mettre en place un schéma harmonisé pour gérer *Sarcocystis* dans l'Union Européenne. La clarification de l'importance de *S. hominis* en santé humaine est essentielle pour mettre en place une gestion adaptée et unifiée dans l'Union Européenne.

En France, les informations concernant la sarcosporidiose sont transmises à l'EFSA par le Ministère de l'Agriculture. Ces informations sont le reflet de l'inspection en routine dans les abattoirs mais il n'y a pas de réelle centralisation des données.

Pour les espèces non-zoonotiques l'EFSA considère qu'il n'y a pas besoin d'un enregistrement au niveau européen. L'enregistrement doit se faire au niveau de l'abattoir et au niveau national (Taylor et al., 2010).

En définitive, on ne peut pas estimer la perte économique liée à la sarcosporidiose dans l'Union Européenne. Aux Etats-Unis, elle a été estimée à 95 millions de dollars par an (Dauguschies et al., 2000).

#### **4. Gestion de la sarcosporidiose en Midi-Pyrénées**

Depuis 1974, des fonds d'assainissement sont apparus progressivement dans les différentes régions françaises (Basse-Normandie, Pays de Loire, Aquitaine et Midi-Pyrénées) pour indemniser les éleveurs. Ces fonds assurent l'indemnisation partielle des pertes financières liées à la saisie de la carcasse en échange d'une cotisation par animal abattu. La cotisation au fonds d'assainissement n'est pas obligatoire pour l'éleveur, il peut la refuser par lettre.

Le FAR : fonds d'assainissement régional de Midi-Pyrénées a été créé en octobre 2011 à l'initiative de l'Interprofession régionale Bétail et Viande de Midi-Pyrénées, InterSud. Il demande une cotisation de 1,5 € et rembourse au moins 50% de la valeur de son préjudice en cas de myosite éosinophilique. 30% sont d'abord remboursés au constat du préjudice ; puis, à la fin de l'année, InterSud, complètera

cette indemnisation en fonction des fonds restant à la clôture de l'exercice. Les autres motifs sanitaires couverts par le FAR Midi-Pyrénées sont la cysticercose, le schwannome, la dégénérescence musculaire au sens de la fibrolipomatose (exclusion des dégénérescences de type cicatriciel ou traumatique), l'ictère, la mélanose et le processus tumoral (sauf cas d'abattage d'urgence ou de leucose ou de tumeurs suspectées du vivant de l'animal ou associées à d'autres motifs non couverts par le FAR).

Le dispositif concerne tout bovin de plus de 12 mois, ayant fait l'objet de ce prélèvement de solidarité, qui est abattu en Midi-Pyrénées par un abatteur conventionné de la région ou qui est commercialisé hors région par un opérateur conventionné de Midi-Pyrénées (groupement de producteurs, négociant, boucher-abatteur). Si une saisie sanitaire est effectuée, l'abatteur, le négociant, l'OP ou organisation de producteurs, le boucher-abatteur ou l'éleveur doit avertir InterSud dans les 2 jours. Un dossier est créé et le motif de saisie est vérifié. InterSud lance alors l'instruction du dossier complet comprenant la fiche de déclaration du sinistre, le certificat de saisie, le bon d'achat et d'enlèvement, le ticket de pesée et le bordereau de règlement.

En 2012, le montant de la perte due à la saisie de la viande pour les sept motifs pris en charge par le FAR s'élevait à 156 661€ pour un total de 48 912 kg de viande saisie. La principale perte économique est engendrée par la myosite éosinophilique, elle représente 52% du montant total. De plus, dans 83% des cas de myosite éosinophilique la carcasse est saisie en totalité.

## Partie B : Etude expérimentale

---

But de l'étude :

- Connaître la prévalence de l'infestation chez les bovins
- Identifier les espèces en cause pour orienter la prophylaxie.

### I. Méthode histologique

#### A. Matériel et méthode

Des œsophages de bovins (n=462) ont été récoltés par sondage dans les abattoirs de Montauban (82), Auch (32), Saint-Gaudens (31), Sainte-Geneviève (12) et Castres (81). Les œsophages sont les organes les plus adaptés pour détecter l'infection due aux sarcosporidies (Savini, Dunsmore, Robertson, Seneviratna, 1992). Les abattoirs de Montauban, Auch et Saint-Gaudens ont une activité d'abattage régionale, alors que les abattoirs de Sainte-Geneviève et Castres abattent des animaux provenant des régions voisines. Des données sur la race, l'âge, le mode de production, l'exploitation d'origine... ont été récoltés à l'abattoir.

3 prélèvements sur l'œsophage distal vers le cardia ont été réalisés. Ils ont été fixés dans une solution tamponnée de formol puis, inclus en paraffine. Les méthodes histologiques conventionnelles ont été employées et des sections de 4 µm d'épaisseur sur 3cm de longueur pour chacune des coupes ont été réalisées et colorées au May Grunwald Giemsa pour l'observation histologique.

Le reste des échantillons a été conservé à -20°C.

Puis, le nombre de kystes présents sur chaque lame a été compté et les kystes classés selon l'épaisseur de leur paroi.

#### B. Résultats

A l'observation histologique au microscope optique, en se fondant sur des critères morphologiques, 2 types de kystes ont été observés : des kystes à paroi épaisse et des kystes à paroi fine. Certains kystes présentaient des cloisons, d'autres n'avaient pas de cloisons visibles. Cependant, aucune distinction d'espèce n'a été possible.

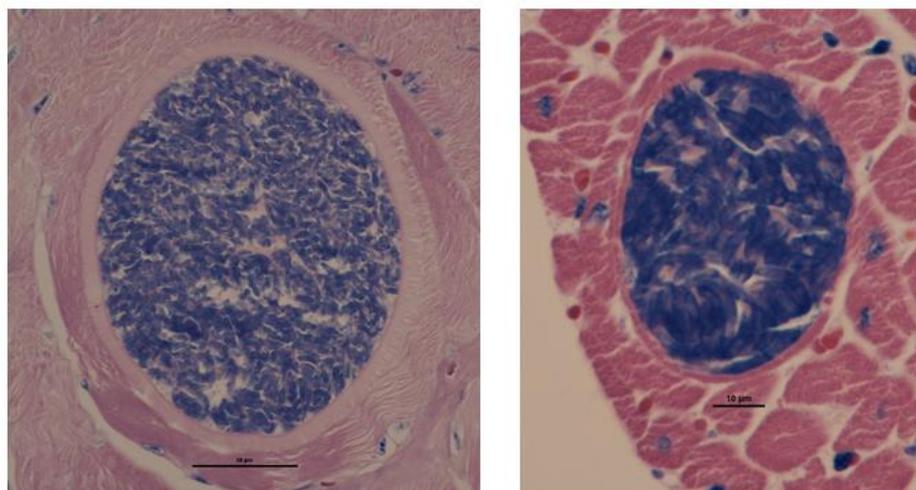


Photo 6 : A gauche, kyste à paroi épaisse = *S. hirsuta* ou *S. hominis* (échelle : 50 µm).  
 Photo 7 : A droite, kyste à paroi fine = *S. cruzi* (échelle : 10 µm).

Prévalence de la sarcosporidiose : 68% (315/462)

Abattoir	Nombre d'animaux	Nombre d'animaux avec des kystes	Prévalence de la sarcosporidiose (%)
Montauban	39	32	82
Auch	81	49	60
Saint-Gaudens	44	32	73
Sainte-Geneviève	86	68	79
Castres	212	135	64

Tableau 4 : Résultats de l'analyse microscopique des coupes histologiques classés par abattoir de prélèvement.

Prévalence des kystes à paroi épaisse : 33% (152/462)

Prévalence des kystes à paroi fine : 57% (262/462)

Abattoir	Nombre d'animaux	Nombre d'animaux avec des kystes à paroi épaisse	Nombre d'animaux avec des kystes à paroi fine	Prévalence des kystes à paroi épaisse (%)	Prévalence des kystes à paroi fine (%)
Montauban	39	16	22	41	56
Auch	81	18	40	22	49
Saint-Gaudens	44	20	24	44	53
Sainte-Geneviève	86	40	56	46	65
Castres	212	58	121	27	57

Tableau 5 : Résultats de l'analyse microscopique des coupes histologiques classés type de paroi des kystes et par abattoir de prélèvement.

Prévalence de la co-infestation : 21% (99/462)

Abattoir	Nombre d'animaux	Nombre d'animaux avec des kystes à paroi épaisse et à paroi fine	Prévalence de la co-infestation (%)
Montauban	39	6	15
Auch	81	9	11
Saint-Gaudens	44	12	25
Sainte-Geneviève	86	28	32
Castres	212	44	20

**Tableau 6 : Résultats de l'analyse microscopique des coupes histologiques présentant à la fois des kystes à paroi fine et des kystes à paroi épaisse classés par abattoir de prélèvement.**

Abattoir	Nombre d'animaux	Nombre d'animaux avec 0 à 10 kystes à paroi fine	Nombre d'animaux avec 10 à 20 kystes à paroi fine	Nombre d'animaux avec > 20 kystes à paroi fine
Montauban	39	21	1	0
Auch	81	38	1	1
Saint-Gaudens	44	24	0	0
Sainte-Geneviève	86	51	5	0
Castres	212	111	6	4

**Tableau 7 : Résultats de l'analyse microscopique des coupes histologiques classés selon le nombre de kystes à paroi fine observés sur l'échantillon et par abattoir de prélèvement**

Abattoir	Nombre d'animaux	Nombre d'animaux avec 0 à 10 kystes à paroi épaisse	Nombre d'animaux avec 10 à 20 kystes à paroi épaisse	Nombre d'animaux avec > 20 kystes à paroi épaisse
Montauban	39	14	2	0
Auch	81	18	0	0
Saint-Gaudens	44	20	0	0
Sainte-Geneviève	86	40	0	0
Castres	212	57	1	0

**Tableau 8 : Résultats de l'analyse microscopique des coupes histologiques classés selon le nombre de kystes à paroi épaisse observés sur l'échantillon et par abattoir de prélèvement**

Pour les tableaux 6 et 7, les animaux ayant entre 0 et 10 kystes par lame sont définis comme peu positifs. Les animaux ayant entre 10 et 20 kystes par lame sont

définis comme moyennement positifs. Les animaux ayant plus de 20 kystes par lame sont définis comme très positifs.

## C. Discussion

L'œsophage a été choisi comme site d'échantillonnage car selon Gut 1982 ou Domenis, 2011, il est avec le diaphragme l'un des meilleurs sites d'échantillonnage pour la surveillance à l'abattoir. En effet, *S. cruzi* se localise préférentiellement dans l'œsophage, *S. hirsuta* est rare et confiné à l'œsophage et *S. hominis* a un tropisme pour l'œsophage et le diaphragme.

La microscopie optique a été choisie pour détecter les kystes car cette méthode associée aux techniques histologiques classiques permettrait de mettre facilement en évidence les kystes. Cependant, cette technique a des limites. Les coupes ne sont pas forcément représentatives de l'échantillon d'œsophage et on ne peut pas distinguer les différentes espèces de sarcosporidies ayant des kystes à paroi épaisse.

Avec les résultats histologiques, on constate que la prévalence des kystes de sarcosporidie est très élevée : 68%. Cela est en accord avec les données chiffrées de la littérature : 100% en Iran (Nourollahi Fard, Asghari, Nouri, 2009), ou au Maroc (Fassi-fehri et al., 1978), 99,7% en Argentine (Moré et al., 2010), 97,8% en Iraq (Latif et al., 1999), 97% en Belgique (Vercruysse et al., 1989), 96% en Italie (Bucca et al., 2011), 92% en Turquie (Aldemir, Güçlü, 2004), 80,23% en Inde (Mohanti et al., 1995), 69,3% au Sri Lanka (Kalubowila et al., 2004), 52 % en Australie (Savini et al., 1992).

De plus, la prévalence des kystes à paroi fine est supérieure à celle des kystes à paroi épaisse, 57% contre 32%. Cela semble en accord avec le fait que *S. cruzi*, seule espèce de sarcosporidie présente chez les bovins dont les kystes ont une paroi fine, est prédominante par rapport aux autres espèces. Cela est en accord avec les données chiffrées de la littérature : 52% en Allemagne 70% en Argentine (Moré et al., 2009; Moré et al., 2011) ou en Italie (Bucca et al., 2011), 74.2% en Italie (Domenis et al., 2011), plus de 90% au Japon (Ono, Ohsumi, 1999), 96% dans le Colorado (Gajadhar, Marquardt, 1992), 97% en Belgique (Vercruysse, Franssen, Van Goubergen, 1989).

Cependant, des kystes de toxoplasme peuvent également être présents au sein de leurs muscles. La paroi de ces kystes est fine. Cela peut être une source de confusion. Selon Fassi-Fehri et al., 1978, on peut distinguer les kystes sarcosporidiens des kystes de toxoplasmes par :

- La taille, celle des kystes de *Toxoplasma* est d'environ 65 µm.
- La forme, les kystes de *Toxoplasma* ont une forme globuleuse.

Mais à l'histologie, malgré ces critères, la confusion est toujours possible.

La prévalence des kystes à paroi épaisse est plus faible : 32%. Dans la littérature, on trouve des données comparables : 56 % en Belgique (Vercruyse, Fransen, Van Goubergen, 1989), 44.5% en Italie (Domenis et al., 2011), de 49.8% en Allemagne (Moré et al., 2014).

De plus, aucune distinction d'espèce au sein des kystes à paroi épaisse n'a pu être réalisée. La prévalence de *S. hirsuta*, *S. hominis* et *S. sinensis* n'a donc pas pu être déterminée uniquement par examen au microscope optique.

La co-infestation est de 21%. Dans la littérature, on trouve des données très variables : 96% au Brésil (Pena, Ogassawara, Sinhorin, 2001), 57% en Italie (Domenis et al., 2011).

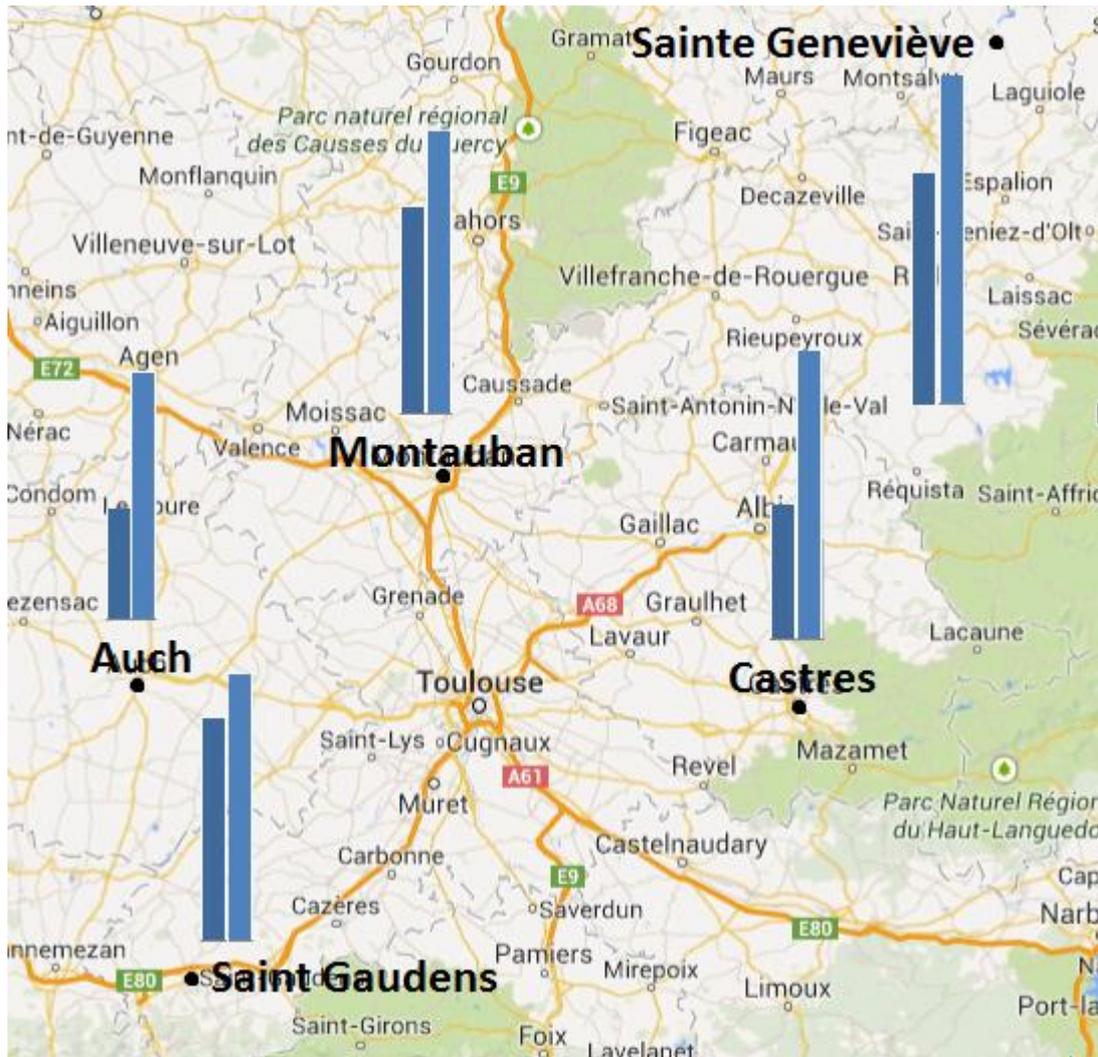
La prévalence de la sarcosporidiose est comparable entre les différents abattoirs. Elle est la plus forte à Montauban et la plus faible à Auch.

Les prévalences pour chaque espèce sont comparables entre les différents abattoirs. La prévalence des kystes à paroi épaisse est la plus forte à Sainte-Geneviève et la plus faible à Auch. La prévalence des kystes à paroi fine est la plus forte à Sainte-Geneviève et la plus faible à Auch.

Les taux de co-infestation par abattoir sont comparables entre les différents abattoirs. Le taux de co-infestation est le plus fort à Sainte-Geneviève et le plus faible à Auch.

Les variations dans les résultats par abattoir peuvent être dus au lieu d'origine des animaux en lien avec le climat de la région ou à la race, l'âge... des animaux.

On constate également que la majorité des animaux sont faiblement positifs, c'est-à-dire que les échantillons analysés présentent entre 1 et 10 kystes. Toutefois, lorsque des kystes à paroi fine sont présents ils le sont en plus grand nombre que lorsque des kystes à paroi épaisse sont présents. Donc, les kystes à paroi fine sont prédominants et lorsqu'ils sont présents, ils le sont en plus grand nombre que ceux à paroi épaisse. Les kystes à paroi épaisse lorsqu'ils sont présents le sont en plus faible nombre. Il y a donc un risque de sous-estimer la prévalence des kystes à paroi épaisse à l'histologie.



**Figure 11 : Carte des prévalences par abattoirs (Google maps)**

Bleu foncé : prévalence des kystes à paroi épaisse, bleu clair : prévalence des kystes à paroi fine

En conclusion, ces premiers résultats nous donnent une première orientation pour la prophylaxie. Si *S. cruzi* est majoritaire, il faudrait cibler la prophylaxie sur le chien pour rompre le cycle parasitaire. Des essais cliniques devraient être menés pour tester l'efficacité de certains anticoccidiens, comme par exemple le Procox® (Emodepside et Toltrazuril), sur les sporocystes et les ookystes.

Cependant, comme les différentes espèces de sarcosporidies n'ont pas pu être identifiées avec la méthode histologique, nous avons décidé d'utiliser la méthode moléculaire pour pouvoir les identifier avec précision

## II. Méthode moléculaire

### PCR multiplex en temps réel

#### A. Matériel et méthode

Sur les 402 œsophages de bovins récoltés par sondage dans les abattoirs de Montauban (82), Auch (32), Saint-Gaudens (31), Sainte-Geneviève (12) et Castres (81) 103 ont été utilisés pour les PCR *Sarcocystis* spp. et 288 pour la PCR *Toxoplasma gondii*.

#### 1. Préparation des échantillons

100 g de la partie musculaire de chaque œsophage ont été découpés et broyés avec un broyeur ménager, ( Mini hachoir Kenwood CH250). Puis, ils ont été placés dans une solution pepsique pendant 30 minutes à 37°C. Le digestat a été filtré sur gaze puis placé dans une ampoule à décanter pendant 30 minutes. 10 mL de culot ont été récupérés et congelés.



© G. Bénard

Photo 8 : Mélange de la solution de digestion et du broyat à l'étuve



© G. Bénard

Photo 9 : Système de filtration et ampoules à décanter

## 2. Extraction de l'ADN

Différents kits commerciaux d'extraction peuvent être utilisés pour cette étape : QIAmp DNA Mini Kit (Dahlgren, Gjerde, 2007), GenElute Mammalian Genomic DNA kit (Domenis et al., 2011), DNeasy blood and tissue (Kia et al, 2011), Wizard genomic DNA purification (Moré et al., 2011), NucleoSpin Tissue kit (Moré et al., 2013). Nous avons retenu le kit NucléoSpin Tissue.

180  $\mu$ L de tampon T1 et 25  $\mu$ L de protéinase K sont ajoutés dans chaque échantillon de 200 $\mu$ L de culot de la solution de digestion. Puis, les échantillons sont incubés une nuit à 56°C sur un bloc chauffant.



**Photo 10 : Incubation des échantillons sur le bloc chauffant**

Le lendemain, 200  $\mu$ L de tampon B3 sont ajoutés dans chaque échantillon et les tubes sont agités. Ensuite, on incube 10 min sur le bloc chauffant à 70°C. 210  $\mu$ L d'éthanol sont ajoutés dans chaque échantillon. Après agitation des tubes on transfère la totalité de chaque échantillon sur colonne. On centrifuge 1 min à 11000g.



**Photo 11 : Echantillons dans la centrifugeuse**

Les tubes collecteurs sont changés. 500 µL de tampon BW sont ajoutés dans chaque tube. On centrifuge de nouveau 1 min à 11000g. Les tubes collecteurs sont changés. 600 µL de tampon B5 sont ajoutés dans chaque tube. On centrifuge 1 min à 11000g. Les tubes collecteurs sont changés une troisième fois. On centrifuge 1 min à 11000g. On transfère la colonne sur un microtube, on ajoute 100µL de tampon BE. On incube 1 min à température ambiante après centrifugation à 11000g pendant 1 min, les échantillons sont congelés.

### 3. Choix des amorces et des sondes

La technique retenue pour l'identification génétique des espèces de *Sarcocystis* sp. est la PCR en temps réel utilisant de technologie « Taqman » ou « hydrolyse de sondes ». Des amorces non marquées s'hybrident de part et d'autre du segment d'intérêt par les extrémités 5' et 3'. Dans le même temps, une sonde spécifique du fragment à amplifier s'hybride entre les deux amorces. Cette sonde est marquée à son extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter) et à son extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) fluorescent ou non, par exemple TAMRA, qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. Cette sonde est courte, environ une vingtaine de bases. Si cette sonde s'hybride sur le fragment cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase au cours de la synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire (phase d'élongation). Le quencher est alors séparé du reporter. Ce dernier émet un signal détecté par la tête de lecture du thermocycleur en temps réel. Ce signal est proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'élongation. La spécificité de la réaction provient de la spécificité des amorces aux extrémités et de la sonde. Ceci réduit de façon significative l'émission non spécifique de fluorescence (bruit de fond) due à des mésappariements ou des dimères d'amorce. Une limite importante de cette technique est sa très grande spécificité qui diminue en contrepartie sa sensibilité (et donc augmente le risque de faux négatifs) et la présence de mutation dans la zone cible. Il n'y a pas alors hybridation et aucune fluorescence n'est émise. Un intérêt majeur de cette technique est le multiplexage. Il est possible de rechercher simultanément plusieurs séquences cibles (dans le cas de cette étude, plusieurs espèces de *Sarcocystis* sp.) dans le même tube d'amplification en combinant plusieurs sondes marquées avec des fluorochromes ayant des spectres d'émission différents (multiplexage).

Pour *S. cruzi* et *S. hirsuta*, les amorces et les sondes de la BovSarcoMultiplex ont été choisies (Moré et al., 2013) : SarcoRTF, amorce sens appariée à toutes les espèces; SarcoRTR, amorce anti-sens appariée à toutes les espèces ; ShirsutaRTR, amorce anti-sens appariée à *S. hirsuta*; Shirsuta-Probe, sonde spécifique de *S. hirsuta*; Scruzi-Probe, sonde spécifique de *S. cruzi*.

Pour *S. hominis*, les amorces et les sondes ont été dessinées à partir des séquences disponibles sur GenBank du 18S (numéros d'accèsion : KF954731, JX679471, JX679470, AF176944, AF176945) en utilisant les réglages par défaut du logiciel en ligne GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>). Les amorces retenues sont :

- sens ShomF (5') : CAT GGC CGT TCT TAG TTG GT
- anti-sens ShomR (3') : TGC GTT AGA CAC GCA AAG TC
- amorce marquée ShomP (5') spécifique de *S. hominis* : Cy5-CAA CAA (+C)GA AGT GCG TTC YTG ATC CT-BHQ2

La taille de l'amplicon attendue est de 144 paires de bases.

Pour *S. sinensis*, les amorces et les sondes ont été créées à partir des séquences disponibles sur GenBank de Cox1 (KC209696, KC209695, KC209694, KC209693, KC209692, KC209691, KC209690). Les nouvelles sondes et l'amorce ont été définies suivant la même méthode que précédemment :

- amorce sens SsinF (5') : CAA TGT GCT GTT CAC ACT GC
- amorce anti-sens SsinR (3') : TCC AAC GTA GAT GGG TAC GA
- sonde SsinP spécifique de *S. sinensis* : Hex-CCC GCA TTG TTC TCC GGC TT-BHQ1

La taille du fragment attendue est de 102 paires de bases.

Pour *T. gondii*, les amorces et les sondes choisies sont celles de Gutierrez et al. (2010). Il y a une amorce sens RE.Few et une amorce anti-sens RE.RV ainsi qu'une sonde RE spécifique de *T. gondii*.

#### 4. Amplification de l'ADN

Après l'extraction de l'ADN, le mélange pour la PCR a été réalisé :

- 2.5 µL de solution d'ADN
- 17.5 µL de mix = 10 µL de IQ Supermix (dNTPs, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 unités/mL Taq polymérase dans un tampon) dilué avec de l'eau distillée, 600 nM de SarcoRTF (0,6 µL), 400 nM de SarcoRTR (0,6 µL), 300 nM de ShirsutaRTR (1,2 µL), 200 nM de Shirsuta-Probe (0.8 µL), 100 nM de Scruzi-Probe (0.8 µL).

Ou

- 2.5 µL de solution d'ADN
- 17,5 µL de mix = 10 µL de IQ Supermix (dNTPs, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 unités/mL Taq polymérase dans un tampon) dilué avec de l'eau distillée, 250 nM de ShomF (1 µL), 250 nM de ShomR (1 µL), 100 nM de ShomP (2 µL).

Ou

- 2.5 µL de solution d'ADN
- 17,5 µL de mix = 10 µL de IQ Supermix (dNTPs, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 unités/mL Taq polymérase dans un tampon) dilué avec de l'eau distillée, 250 nM de SsinF (1 µL), 250 nM de SsinR (1 µL), 100 nM de SsinP (2 µL).

Ou

- 2.5 µL de solution d'ADN
- 17,5 µL de mix = 10 µL de IQ Supermix (dNTPs, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 unités/mL Taq polymérase dans un tampon) dilué avec de l'eau distillée, 500 nM de RE.Few (0.8 µL), 500 nM de RE.Rv (0.8 µL), 125 nM de RE (1 µL).

Les échantillons sont placés dans la plaque en triplicata. Puis, la plaque a été placée dans le thermocycleur Agilent Mx3005P pour la procédure d'amplification et les données ont été collectées par le logiciel MxPro Mx3005P v4.10 (Stratagene). Pour les sondes *Sarcocystis* sp, la dénaturation a été faite à 95°C pendant 4 min. Puis, 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 40 secondes à 62°C, ont été réalisés. Pour la sonde *Toxoplasma*, la dénaturation a été faite à 95°C pendant 3 minutes, Puis, 40 cycles, de 15 secondes à 95°C et 1 min à 60°C.

Le témoin positif était de l'ADN extrait de bradyzoïtes de kystes sarcosporidiens pour *S. hominis* ou de l'ADN extrait de toxoplasmes pour *T. gondii*. Le témoin négatif était de l'eau ultrafiltrée stérile.

## B. Résultats

Prévalence de *S. cruzi* : 53% (55/103)

Prévalence de *S. hirsuta* : 0% (0/103)

Prévalence de *S. hominis* : 68% (70/103)

Prévalence de *S. sinensis* : 72% (74/103)



Prévalence des kystes à paroi épaisse : 84% (86/103)

Prévalence de *T. gondii* : 0% (0/288)

Prévalence de la co-infestation *S. cruzi/S. hominis* : 24% (26/103)

Prévalence de la co-infestation *S. cruzi/S. sinensis* : 30% (31/103)

Prévalence de la co-infestation *S. hominis/S. sinensis* : 55% (57/103)

<i>S. cruzi</i>		Histologie	
		+	-
PCR	+	33	22
	-	26	22

Tableau 9 : Comparaison des résultats histologiques et moléculaires pour les kystes à paroi fine : *S. cruzi*

Kystes à paroi épaisse		Histologie	
		+	-
PCR	+	44	41
	-	1	17

Tableau 9 : Comparaison des résultats histologiques et moléculaires pour les kystes à paroi épaisse

## C. Discussion

La technique de digestion enzymatique a été déterminée selon différents protocoles de la littérature : protocole officiel pour la mise en évidence des trichines (règlement CE 2075/2005), thèse de Marie Bertin (2013)... Les quantités de pepsine et d'acide chlorhydrique ont été adaptées en observant les restes de digestat au microscope pour évaluer le degré de digestion des fibres musculaires. De plus, cette technique manuelle est très chronophage. Elle nécessite également beaucoup d'espace et de matériel. Enfin, étant donné que seuls 20g d'œsophage sont prélevés à partir de 100g broyés, il existe un biais d'échantillonnage. Si l'œsophage est peu infesté, l'échantillon n'est pas forcément représentatif.

Pour l'extraction de l'ADN, nous avons eu des difficultés à obtenir des quantités d'ADN suffisantes pour effectuer une PCR. La quantité d'ADN extraite était évaluée en mesurant la densité optique avec le MultiskanGo de Thermo. Nous avons dû changer de kit d'extraction pour obtenir des quantités d'ADN utilisable pour des PCR.

La PCR en temps réel a été choisie pour différencier les espèces de sarcosporidies entre elles et pour les différencier des toxoplasmes car cette méthode permet d'identifier facilement les différentes espèces sans autre manipulation comme

par exemple une électrophorèse sur gel. C'est une technique délicate qui a nécessité beaucoup de temps pour sa mise au point.

La PCR multiplex en temps réel mise au point par Moré a été utilisée car elle permet de mettre en évidence les 4 espèces de sarcosporidies des bovins avec une seule PCR. Cependant, les sondes pour les espèces *S. hominis* et *S. sinensis* issues de la BovSarcoMultiplex de Moré n'ont pas donné de résultats avec des échantillons témoins positifs. Ainsi de nouvelles amorces et sondes ont été créées pour ces deux espèces à partir des séquences disponibles dans GenBank. Cet échec peut être dû à des variabilités intra-spécifiques entre les séquences du gène de l'ARN 18S des espèces argentines et françaises de *S. hominis* et *S. sinensis*. Comme les sondes avaient de nombreux acides nucléiques bloqués, elles ne s'appariaient pas aux séquences légèrement différentes. De plus, comme les sondes réagissaient entre elles, il a fallu faire deux PCR différentes pour *S. sinensis* et *S. hominis*.

L'utilisation d'un témoin négatif à chaque étape (extraction, amplification...) nous a permis de vérifier l'éventuelle contamination des échantillons.

Avec les résultats des PCR, on constate que la prévalence de *S. cruzi* est la moins élevée. La prévalence de *S. cruzi* obtenue par la méthode moléculaire est très proche de la prévalence des kystes à paroi fine obtenue par la méthode histologique, 57% et 53%. Moré trouvait une prévalence de 82% pour *S. cruzi*.

A l'inverse, la prévalence des kystes à paroi épaisse est très élevée par rapport à la prévalence des kystes à paroi épaisse trouvée grâce à l'histologie : 84% (86/103) contre 32%. Cela est en accord avec ce qui a été observé précédemment, les kystes à paroi épaisse lorsqu'ils sont présents, le sont en plus faible nombre et donc il y a un risque de non détection à l'histologie. Les prévalences de *S. hominis* et *S. sinensis* individuellement sont nettement supérieures en PCR : 68% et 72%. Dans la littérature, la prévalence de *S. hominis* est nettement inférieure ; elle est de 42 % à 60% en France (Euzéby, 1997 ; Euzéby, 1998), de 42.7% en Italie (Domenis et al., 2011), de 6.2% en Allemagne (Moré et al., 2014) et la prévalence de *S. sinensis* est également inférieure et est de 37% en Allemagne (Moré et al., 2014).

La prévalence de *S. hirsuta* est nulle. Cela est en corrélation avec la bibliographie où cette espèce est définie comme rare. Mais dans la littérature, la prévalence de *S. hirsuta* n'est pas nulle ; elle est de 6.6% en Allemagne (Moré et al., 2014), de 1.8% en Italie (Domenis et al., 2011).

La co-infestation est de de 24% pour *S. cruzi/S. hominis*, 30% pour *S. cruzi/S. sinensis*, 55% pour *S. hominis/S. sinensis*. Dans la littérature, on trouve des taux variables : 8.9% toutes espèces confondues en Argentine (Moré et al., 2013), 28% toutes espèces confondues en Allemagne (Moré et al., 2014)

On constate également qu'il n'y a pas de toxoplasmes dans l'œsophage. Cela permet de déterminer que la prévalence des kystes à paroi fine obtenue à partir des

résultats de l'histologie est égale à la prévalence de *S. cruzi*. En effet, s'il n'y a pas de toxoplasmes, il n'y a pas de confusion possible entre les kystes. Il n'y a pas de données dans la littérature sur la prévalence des toxoplasmes dans l'œsophage. Il y a très peu d'étude sur la recherche d'ADN de *T. gondii* chez les bovins. Moré en 2008 avait trouvé 10% (2/20) de prévalence dans le myocarde de bovins.

En prenant comme méthode de référence l'histologie et en utilisant la formule sensibilité =  $VP/(VP + FN)$  et spécificité =  $VN/(VN + FP)$ , les sensibilités et les spécificités de chaque PCR ont été calculées. La sensibilité est la probabilité d'obtenir un test positif quand l'animal est infesté et la spécificité est la probabilité d'obtenir un test négatif quand l'animal est indemne. La sensibilité de la PCR *S. cruzi* est de 56% et la spécificité est de 50%. Ces valeurs sont très moyennes. La sensibilité de la PCR pour les kystes à paroi épaisse est de 51% et la spécificité est de 94%. Moré avec sa PCR multiplex trouve des sensibilités et des spécificités différentes. Pour *S. cruzi*, la sensibilité était de 91.5% et la sensibilité était de 41.7%. Pour les kystes à paroi épaisse, la sensibilité était de 36.3% et la spécificité était de 95.9% (Moré et al., 2013).

La valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN) sont déterminées sur le même principe avec les formules suivantes :  $VPP = VP/(VP+FP)$  et  $VPN = VN/(VN+FN)$ . La VPP est la probabilité que l'individu soit infesté quand le test est positif et la VPN est la probabilité qu'un animal soit indemne quand le test est négatif. La VPP de la PCR *S. cruzi* est de 60% et la VPN est de 46%. La VPP de la PCR pour les kystes à paroi épaisse est de 98% et la VPN est de 29%.

Cette méthode PCR pourrait être améliorée. En effet, si les 4 sondes pouvaient fonctionner en même temps cela serait moins chronophage. Il faudrait adapter les concentrations des différentes sondes pour faire une véritable PCR multiplex.

Pour identifier avec certitude des espèces identifiées par PCR, une partie des produits d'amplification de chaque PCR a été envoyée à un laboratoire pour faire séquencer les séquences amplifiées et ainsi les identifier correctement en les comparant aux séquences présentes dans GenBank.

### III. Séquençage du gène de l'ARN 18S

#### A. Matériel et méthode

Les produits d'amplification des PCR *S. hominis* (n=9) et *S. sinensis* (n=6) issus des extractions des digestats des œsophages de bovins récoltés par sondage dans les abattoirs de Montauban (82), Auch (32), Saint-Gaudens (31), Sainte-Geneviève (12) et Castres (81) ont été utilisés.

##### 1. Purification des échantillons

Les produits PCR ont été purifiés avec le Kit QiAquick PCR purification

Cinq volumes de tampon PB ont été ajoutés à 1 volume de produits PCR. Si la couleur devenait orange ou violette, 10 µL d'acétate de sodium 3 M (pH 5) était ajouté. La couleur devait devenir jaune indiquant que le pH était inférieur à 7,5. Le pH doit être inférieur à 7,5 car l'adsorption de l'ADN sur la membrane est alors plus efficace.

Puis, le mélange était transféré sur une colonne et centrifugé 30-60s à 17900 g (13000 rpm). Après chaque centrifugation, le tube collecteur était changé.

Ensuite, 750 µL de tampon PE étaient ajoutés et le mélange était centrifugé 30-60s à 17900g (13000 rpm). Le tube collecteur était à nouveau changé. Puis, le tube était centrifugé une seconde fois 1 min à 17900 g (13000 rpm)

Enfin, la colonne était placée sur un microtube collecteur de 1.5 mL. 50 µL de tampon EB étaient ajoutés et le mélange était centrifugé pendant 1 min à 17900 g (13000 rpm).

##### 2. Séquençage

Les produits d'amplification ont été envoyés à Génotoul Purpan pour faire séquençer le gène de l'ARN 18S ou le gène de Cox1 selon la méthode de Sanger, utilisant des didésoxyribonucléotides des marqueurs fluorescents.

Le couple d'amorces utilisé pour la PCR et correspondant à l'espèce a été utilisé pour amplifier le gène de l'ARN 18S ou de Cox 1 de chaque produit de PCR. Les produits d'amplification ont été amplifiés à nouveau avec les amorces et un peu de didésoxyribonucléotides. Les produits d'amplification ont ensuite été placés dans le séquenceur capillaire.

Les séquences ADN obtenues ont été nettoyées et analysées avec le logiciel BioEdit ver 7.1.3. Elles ont été alignées avec les séquences disponibles pour le 18S

concernant *T. gondii* (outgroup : L24381); *S. hominis* (KF954731, JX679471, JX679470, AF176945, AF176944, AF176943, AF176942), *S. hominis*-like (JF327857), *S. sinensis* (KF954728, KF954729, KF954730, JX679466, JX679469, KC209742, KC209743, KC209744, AF176928, AF176929, AF176930, AF176931, AF266955, AF266954), *S. cruzi* (JX679468, JX JX679467), *S. hirsuta* (JX855283).

Un arbre de distance suivant la méthode de Neighbor-Joining a été construit et la robustesse des branches a été évaluée par la méthode de bootstrap re-échantillonnage avec 500 répétitions avec le logiciel Mega 6.06.

Les séquences Cox1 ont été de trop mauvaise qualité pour pouvoir être analysées.

## **B. Résultats**

Parmi les 9 échantillons qui ont été envoyés au séquençage, seulement cinq (A01, C01, D01, H10, H11) ont pu être correctement identifiés. La longueur du fragment 18 S retenue après nettoyage est de 128 paires de bases (pb). L'identification a été possible pour 5 échantillons sur les 9 envoyés. La figure 12 présente les sites de variations spécifiques variables observés entre *S. hominis* et *S. sinensis* en incluant quatre des cinq séquences qui ont été rattachées à l'une de ces deux espèces : trois pour *S. hominis* (A01, D01, H10) et une pour *S. sinensis* (H11). La cinquième séquence n'est pas présentée dans la figure 12 mais apparaît dans l'arbre de la figure 13. Elle s'est avérée être *S. cruzi*.

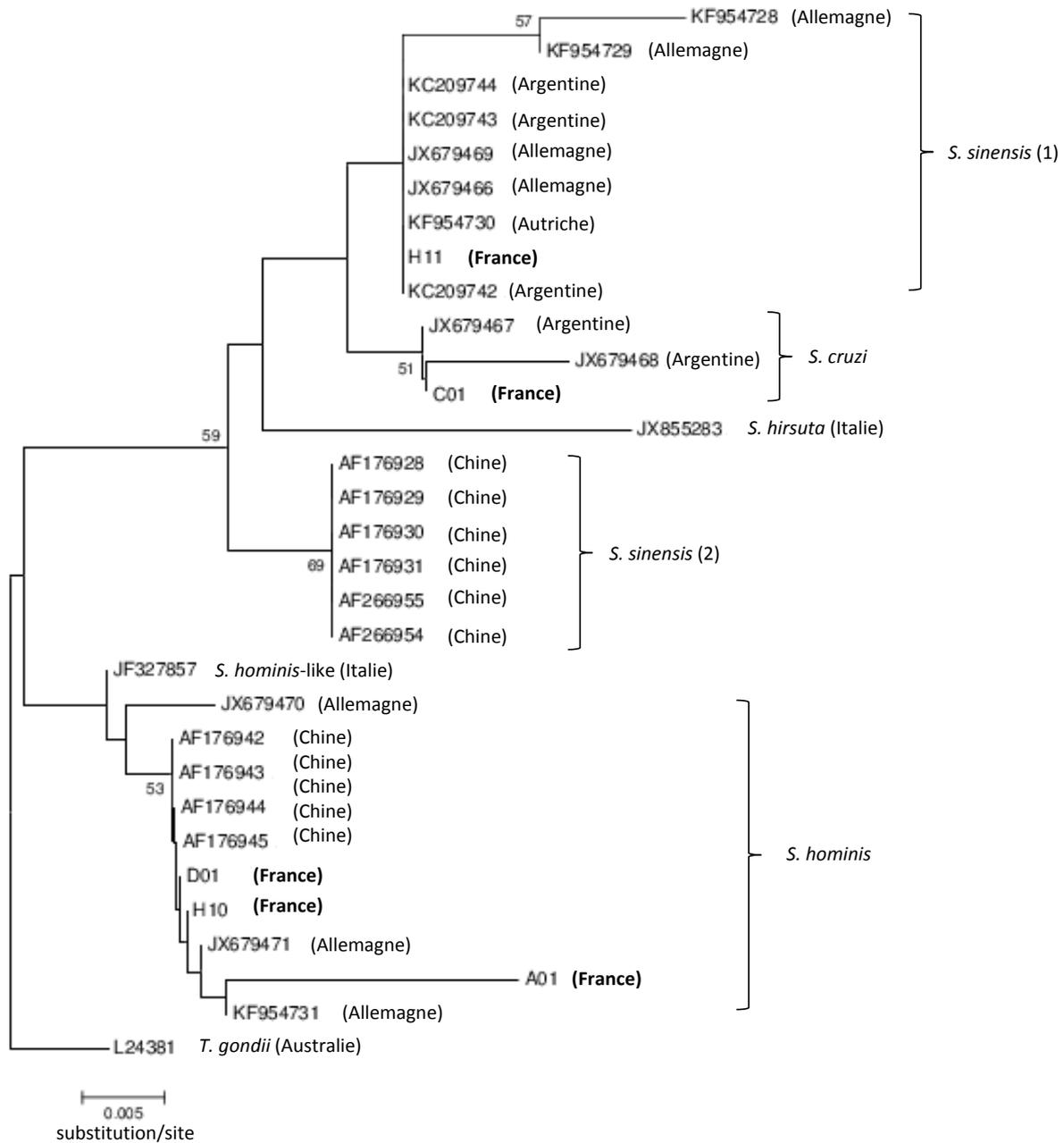
Onze sites sont variables et il s'agit soit de sites de variation intraspécifiques (3 sites pour *S. hominis* : 4, 21, 65, 3 sites pour *S. sinensis* : 54, 65, 71), interspécifiques (4 sites 70, 76, 77, 81) et une délétion de 3 paires de bases (80, 81, 82) concernant 9 séquences de *S. hominis* parmi les 10 analysées (figure 12).

Espèce	Identifiant	Position
		0 2 6 6 7 7 7 7 8 8 8
		4 1 4 5 0 1 6 7 0 1 2
<i>S. hominis</i>	KF954731	G T A A G C C G G T T
	JX679471	. . . . . - - -
	JX679470	. . . G . . . - - -
	AF176942	. . . . . - - -
	AF176943	. . . . . - - -
	AF176944	. . . . . - - -
	AF176945	. . . . . - - -
	A01	A C . . . . . - - -
	D01	. . . . . - - -
	H10	. . . . . - - -
<i>S. sinensis</i>	KF954728	. . G . A T T A . . .
	KF954729	. . G . A . T A . . .
	KF954730	. . . . A . T A . . .
	JX679466	. . . . A . T A . . .
	JX679469	. . . . A . T A . . .
	KC209742	. . . . A . T A . . .
	KC209743	. . . . A . T A . . .
	KC209744	. . . . A . T A . . .
	H11	. . . . A . T A . . .
	AF176928	. . . G A . T A . A .
	AF176929	. . . G A . T A . A .
	AF176930	. . . G A . T A . A .
	AF176931	. . . G A . T A . A .
	AF266955	. . . G A . T A . A .
	AF266954	. . . G A . T A . A .
		* * *

**Figure 12 : Alignement du domaine partiel 18S pour les espèces *S. hominis* et *S. sinensis*. Les bases identiques sont présentées par un point (.) et les gaps par le signe moins (-). Seuls les sites variables avec leur position donnée au-dessus sont présentés. L'étoile (\*) indique les sites polymorphes interspécifiques.**

La figure 13 est l'arbre de distance construit à partir de la séquence partielle du 18S de 128 paires de bases pour *S. hominis*, *S. sinensis*, *S. cruzi*, *S. hirsuta* et *S. hominis-like*. On note que la séquence C01 est comprise dans le groupe *S. cruzi*. Toutes les séquences *S. hominis* forment un seul clade quelle que soit leur origine géographique (Chine (Yang et al., 2001), Allemagne (Moré et al., 2014) ou France). *Sarcocystis hominis-like* (Domenis et al., 2011) provenant d'un bovin italien se rapproche bien du groupe *S. hominis*. En revanche, deux clades suivant l'origine géographique se distinguent nettement pour *S. sinensis*. Toutes les séquences provenant de Chine forment un clade unique distinct des séquences allemandes, autrichiennes, argentines et françaises. Les séquences *S. cruzi* et *S. hirsuta* s'intercalent entre ces deux groupes dans leur propre clade spécifique. Il s'agit d'un artefact dû probablement à la faible longueur de la séquence utilisée ici. Un arbre de neighbor-joining non présenté ici de 1232 paires de bases pour *S. sinensis*, *S. cruzi*, *S. hominis*, *S. hirsuta* et enraciné sur *T. gondii* a une topologie différente : *S. cruzi* et *S. hirsuta* appartiennent alors à deux clades bien distincts de *S. sinensis*. Toutefois,

on retrouve à nouveau deux groupes de *S. sinensis* suivant leur origine géographique.



**Figure 13 : Arbre de Neighbor-Joining enraciné du domaine partiel 18S présentant les positions respectives de quatre espèces de *Sarcocystis* sp. (*S. hominis*, *S. hominis-like*, *S. cruzi*, *S. hirsuta*, *S. sinensis*). L'origine géographique (pays) est donnée à gauche de chacune des séquences provenant du GenBank ou original à notre étude. *T. gondii* (L24381) est le groupe externe d'enracinement. Les nombres à gauche des nœuds sont les valeurs de bootstrap (500 répétitions,  $\geq 50\%$ ).**

## C. Discussion

Le séquençage a été choisi car cette méthode permettait d'identifier les espèces de sarcosporidies présentes dans les œsophages avec précision.

Les séquences obtenues avec les produits d'amplification de la PCR *S. hominis* ont été difficiles à analyser. En effet, un effet de dimérisation et un signal parasite (restes d'amorces ou de sondes...) restaient présents malgré la purification. Ces problèmes de séquençage (outre la dimérisation des amorces mais également des doubles pics dans le chromatogramme) ont également été reportés par Moré et al. (2014). Les séquences obtenues avec les produits d'amplification de la PCR *S. sinensis* ont été difficiles à analyser et ont donc été exclues de cette étude. Des améliorations doivent donc être apportées et la PCR classique pourra être d'un secours important pour améliorer les identifications même si cette solution est plus longue. De plus, pour les séquences se basant sur le gène Cox 1, il n'existe qu'une référence pour *S. sinensis* et aucune pour *S. hominis*.

Les produits d'amplification de la PCR *S. hominis* ont donné des séquences correspondant à *S. hominis* et *S. sinensis*. Cela signifie que les amorces et la sonde ne sont pas assez discriminantes. Il y a une confusion entre *S. hominis* et *S. sinensis*. Donc les prévalences obtenues par PCR surestiment le taux réel d'infestation. Une séquence de *S. cruzi* a même été amplifiée. Les problèmes rencontrés (proximité très importantes des espèces, difficultés de designer des sondes spécifiques ayant les qualités requises, co-infection de plusieurs espèces de *Sarcocystis* sp. dans un même hôte) ici sont ceux rapportés par d'autres auteurs et n'ont pour l'instant pu être dépassés.

Les deux groupes bien distincts de *S. sinensis* sont rapportés ici pour la première fois. On observe que l'Europe et l'Argentine forment un groupe distinct de la Chine qui pourrait être expliqué par des échanges de bovins entre l'Europe et l'Argentine (Nouveau-Monde) historiques ou actuels bien plus importants qu'avec la Chine. Une autre hypothèse expliquant l'observation de ces deux clades différentes est le fait que l'espèce-hôte n'est pas la même. En effet, il s'agit de deux espèces effectivement différentes car les six exemplaires de Chine proviennent du Buffle d'Asie (*Bubalus bubalis*) alors que tous les autres *S. sinensis* ont été prélevés sur *Bos taurus*.

## Conclusion

---

Ce travail a permis de connaître la prévalence de la sarcosporidiose chez les bovins en région Midi-Pyrénées : celle des différents types de sarcosporidie : kyste à paroi épaisse ou à paroi fine mais également celle des différentes espèces : *S. cruzi*, *S. hirsuta*, *S. hominis* et *S. sinensis*.

*Sarcocystis sinensis* a pour la première fois été mise en évidence en France. Mais, sa prévalence devra être précisée, notamment pour savoir si elle est supérieure à celle de *S. hominis*.

Les moyens diagnostiques se sont considérablement développés ces dernières années, avec l'apparition de nouvelles techniques telle que la PCR multiplex en temps réel (Moré et al., 2013; Moré et al., 2014). Cependant, il n'existe pour le moment aucun test diagnostique de routine. De plus, il existe encore des problèmes de confusions entre les espèces avec la PCR multiplex qui ont été mis en évidence par le séquençage. Avec le faible nombre de séquences génétiques disponibles pour les différents gènes de l'ARN 18S et de Cox 1, créer de nouvelles sondes n'est pas envisageable. Un recours à la PCR classique pourrait permettre de dépasser ses problèmes mais présenterait un temps de réalisation plus long.

À l'heure actuelle, l'enjeu majeur reste donc de déterminer plus précisément la prévalence de chaque espèce de sarcosporidies chez les bovins abattus en Midi-Pyrénées. Notamment, maintenant que *S. sinensis* a été mis en évidence en France. Une étude avec plus d'échantillons pourraient être envisagée, une fois que les problèmes d'identification et de confusion entre les espèces auront été résolus.

Mais l'enjeu est aussi d'identifier l'hôte définitif de *S. sinensis* pour améliorer la lutte contre la maladie. Car ce n'est que grâce à cela qu'une prophylaxie et des moyens de lutte raisonnée pourront être mis en place. Pour cela, il faudrait réaliser des campagnes de coproscopies sur les carnivores et/ou omnivores pouvant être présents sur les exploitations ou avoir accès à de la viande crue de bovin (blaireau, renard, martre...)

Enfin, il reste encore à comprendre le lien entre la sarcosporidiose et la myosite éosinophilique pour pouvoir peut être dans l'avenir comprendre l'origine de la maladie, son processus de développement... En effet, seul un faible pourcentage de bovins développe une myosite éosinophilique alors que la majorité est porteur sain. Il faudrait donc rechercher une composante génétique comme une prédisposition raciale ou familiale ou une composante allergique.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

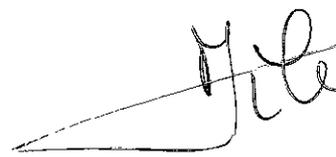
**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, **BÉNARD Geneviève**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directrice de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **FLANDRIN Camille** intitulée « *Etude de la prévalence de la sarcosporidiose chez les bovins abattus en région Midi-Pyrénées.* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 23 octobre 2014  
Professeure Geneviève **BÉNARD**  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain **MILON**



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Gérard **CAMPISTRON**



Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Professeur Bertrand **MONTHUBERT**  
Par délégation, la Vice-Présidente du CEVU  
Madame Régine **ANDRÉ OBRECHT**



Melle **FLANDRIN Camille**  
a été admis(e) sur concours en : 2009  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2013  
a validé son année d'approfondissement le : 17/07/2014  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

## Bibliographie

---

### Articles de périodique :

Aldemir O, Güçlü F (2004) Diagnosis of *Sarcocystis* species in cattle In Konya region. Kafkas üniversitesi veteriner fakültesi dergisi, 10(2), 147-149.

Bucca M, Brianti E, Giuffrida A, Ziino G, Cicciari 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.

Carletti T, Martin M, Romero S, Morrison DA, Marcoppido, G, Florin-Christensen M, Schnittger L (2013) Molecular identification of *Sarcocystis aucheniae* as the macrocyst-forming parasite of llamas. Veterinary Parasitology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.09.007>.

Chen X, Zuo Y, Rosenthal B, He Y, Cui L, Yang Z (2011) *Sarcocystis sinensis* is an ultrastructurally distinct parasite of water buffalo that can cause foodborn illness but cannot complete its life-cycle in human beings. Veterinary Parasitology, 178, 35-39.

Corner AH, Mitchell D, Meads EB, Taylor PA (1963) Dalmeny Disease. An Infection of Cattle Presumed to be Caused by an Unidentified Protozoon. The Canadian Veterinary Journal, 4(10), 252-64.

Cowper B, Matthews S, Tomley F (2012) The molecular basis for the distinct host and tissue tropisms of coccidian parasites. Molecular & Biochemical Parasitology, 186, 1-10.

Dahlgren S, Gjerde B (2007) Genetic characterisation of six *Sarcocystis* species from reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Norway based on the small subunit rRNA gene. Veterinary Parasitology, 146, 204-213.

Dahlgren S, Gjerde B, Skirnisson K, Gudmundsdottir B (2007) Morphological and molecular identification of three species of *Sarcocystis* in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Iceland. Veterinary Parasitology, 149, 191-198.

Dauguschies A., Hintz J., Henning M., Rommel M. (2000) Growth performance, meat quality and activities of glycolytic enzymes in the blood and muscle tissue of calves infected with *Sarcocystis cruzi*. Veterinary Parasitology. 88(1-2), 7-16.

Do S, Jeong D-H, Chung J-Y, Park J-K, Yang H-J Yuan D-W, Jeong K-S (2008) Eosinophilic myositis in a slaughtered Korean native cattle. Journal of veterinary science, 9(4), 425-427.

Domenis L, Peletto S, Sacchi L, Clementi E, Genchi M, Felisari L, Felisari C, Mo P, Modesto P, Zuccon F, Campanella C, Maurella C, Guidetti C, Acutis PL (2011) Detection of a morphogenetically novel *Sarcocystis hominis*-like in the context of a

prevalence study in semi intensively bred in cattle in Italy. *Parasitology research*, 109(6), 1677-1687.

Dubey J, Bergeron J (1982) *Sarcocystis* as a Cause of Placentitis and Abortion in Cattle. *Veterinary Pathology*, 19, 315-319.

Dubey J, Fayer R, Speer A (1988) Experimental *Sarcocystis hominis* infection in Cattle: Lesions and Ultrastructure of Sarcocysts. *The journal of parasitology*, 74(5), 875-879.

Dubey J, Lindsay D (2006) Neosporosis, Toxoplasmosis and Sarcocystosis in ruminants. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 22, 645-671.

Ely R, Fox C (1989) Elevated IgG antibody to *Sarcocystis cruzi* associated with eosinophilic myositis in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1, 53-56.

Euzéby J (1997) Les sarcocystoses zoonotiques : des coccidioses à *Sarcocystis* à la myosite éosinophilique sarcocystique. *Bulletin de la société de pathologie exotique*, 90, 200-204.

Fassi-fehri N., Cabaret J., Amaqdouf A., Dardar R. (1978) La sarcosporidiose des ruminants au Maroc : Etude épidémiologique par deux techniques histologiques. *Annales de Recherche Vétérinaire*, 9(3), 409-417.

Fayer R (1977) Production of *Sarcocystis cruzi* Sporocysts by Dogs Fed Experimentally Infected and Naturally Infected Beef. *The Journal of Parasitology*, 63(6), 1072-1075.

Fayer R (2004) *Sarcocystis* spp. in Human Infections. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 894-902.

Fisher S, Odening K (1998) Characterization of bovine *Sarcocystis* species by analysis of their 18S ribosomal DNA sequences. *The Journal of parasitology*, 84(1), 50-54.

Gajadhar A, Marquardt W (1992) Ultrastructural and transmission evidence of *Sarcocystis cruzi* associated with eosinophilic myositis in cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 56, 41-46.

Gjerde B. (2013) Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. *International Journal for Parasitology*, 43(7), 579–591.

Güçlü F, Aldemir O, Güler L (2004) Differential identification of cattle *Sarcocystis* spp. by random amplified Polymorphic DNA - Polymerase chain reaction (RAPD-PCR). *Revue Médecine Vétérinaire*, 155, 440-444.

- Gut J. (1982) Effectiveness of methods used for the detection of sarcosporidiosis in farm animals. *Folia Parasitologia*, 29, 289-295.
- Hamidinejat H, Hossein Razi Jalali M, Nabavy L (2010) Survey on *Sarcocystis* infection in slaughtered cattle in South-West of Iran, emphasized of evolution of muscle squash in comparison with digestion method. *Journal of animal and veterinary advances*, 9(12), 1724-1726.
- Huong L (1999) Prevalence of *Sarcocystis* spp. in water buffaloes in Vietnam. *Veterinary parasitology*, 86, 33–39.
- Javadi A, Doustar Y (2011) A case report of eosinophilic myositis in a slaughtered female cattle. *Journal of animal and veterinary advances*, 10(7), 920-921.
- Jehle C, Dinkel A, Sander A, Morent M, Romig T, Luc P, De T, Thai V, Mackenstedt U (2009) Diagnosis of *Sarcocystis* spp. in cattle (*Bos taurus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Northern Vietnam. *Veterinary Parasitology*, 166, 314–320.
- Jensen R, Alexander A, Dahlgren R, Jolley W, Marquardt W, Flack D, Bennett B, Cox M, Harris C, Hoffmann G, et al. (1986) Eosinophilic myositis and muscular sarcocystosis in the carcasses of slaughtered cattle and lambs. *American Journal of Veterinary Research*, 47(3), 587-593.
- Kalubowila D, Udagama-Randeniya P, Perera N, Rajapakse R (2004) Seroprevalence of *Sarcocystis* spp. in Cattle and Buffaloes from the Wet and Dry Zones of Sri Lanka: a Preliminary Study. *Journal of veterinary medicine*. 51, 89–93.
- Kia E, Mirhendi H, Rezaeian M, Zahabiun F, Sharbatkhori M (2011) First molecular identification of *Sarcocystis miescheriana* (Protozoa, Apicomplexa) from wild boar (*Sus Scrofa*) in Iran. *Experimental Parasitology*, 127, 724-726.
- Kimura T (2011) Eosinophilic myositis resulted from *Sarcocystis* infection in prime marbled beef of Japanese black cattle. *Veterinary World*, 4(11), 500-502.
- Latif B, Al-Delemi J, Mohammed B, Al-Bayati S, Al-Amiry A (1999) Prevalence of *Sarcocystis* spp. in meat-producing animals in Iraq. *Veterinary parasitology*, 84, 85–90.
- Levine N (1977) Nomenclature of sarcocystosis in the ox and sheep and of fecal coccidia of the dog and cat. *The journal of Parasitology*, 63(1), 36-51.
- Li Q-Q, Yang Z-Q, Zuo Y-X, Attwood S, Chen X-W, Zhang Y-P (2002) A PCR-Based RFLP Analysis of *Sarcocystis cruzi* (Protozoa: Sarcocystidae) in Yunnan Province, PR China, Reveals the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) as a Natural Intermediate Host. *Journal of Parasitology*, 88(6), 1259–1261.
- Lindsay D, Blagburn B, Braund K (1995) *Sarcocystis* spp. and Sarcocystosis. *Bacteriological Analytical Manual*, 5(3), 249-254.

- Lunde M, Fayer R (1977) Serologic Tests for Antibody to *Sarcocystis* in Cattle. The Journal of Parasitology, 63(2), 222-225.
- Metwally A, Abd Ellah M, AL-Hosary A, Omar M (2013) 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(4), 378-382.
- Mohanty B, Misra S, Panda D, Panda M (1995) Prevalence of *Sarcocystis* infection in ruminants in Orissa. Indian Veterinary Journal, 72(10), 1026-1030.
- Moré G, Basso W, Bacigalupe D, Venturini M, Venturini L (2008) Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. Parasitology research, 102(4), 671-675.
- Moré G., Bacigalupe D., Basso W., Rambeaud M., Beltrame F., Ramirez B., Venturini M.C., Venturini L. (2009) Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. Veterinary Parasitology, 160(1-2), 51-54.
- Moré G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Venturini M, Venturini (2010) Serologic profiles for *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* and productive performance in naturally infected beef calves. Parasitology research, 106, 689-693.
- Moré G, Abrahamovich P, Jurado S, Bacigalupe D, Marin JC, Rambeaud M, Venturini L, Venturini MC (2011) Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. Veterinary parasitology, 177, 162-165.
- Moré G, Schares S, Maksinov A, Conraths F, Venturini M, Schares G (2013) Development of a multiplex real time PCR to differentiate *Sarcocystis* spp. affecting cattle. Veterinary Parasitology, 197(1-2), 85-94.
- Moré G., Pantchev A., Skuballa J., Langenmayer M., Maksimov P., Conraths F., Venturini M., Schares G. (2014) *Sarcocystis sinensis* is the most prevalent thick-walled *Sarcocystis* species in beef on sale for consumers in Germany. Parasitology research. DOI 10.1007/s00436-014-3877-x.
- Morsy K, Saleha A, Al-Ghamdib A, Abdel-Ghaffaraa F, Al-Rasheidc K, Bashtara A-R, Al Quraishyc S, Mehlhornd H (2011) Prevalence pattern and biology of *Sarcocystis capracanis* infection in the Egyptian goats: A light and ultrastructural study. Veterinary Parasitology, 181, 75-82.
- Nourollahi Fard S, Asghari M, Nouri F (2009) Survey of *Sarcocystis* infection in slaughtered cattle in Kerman, Iran. Tropical Animal Health and Production, 41, 1633–1636.
- Ono M, Ohsumi T (1999) Prevalence of *Sarcocystis* spp. cysts in Japanese and imported beef (Loin: *Musculus longissimus*). Parasitology international, 48, 91-94.

- Pena HF, Ogassawara S, Sinhoin I (2001) Occurrence of cattle *sarcocystis* species in raw kibbe from arabian food establishment in the city of Sao Paulo, Brazil and experimental transmission to humans. *Journal of parasitology*, 87(6), 1459-1465.
- Pérez-Creo A, Panadero R, López C, Díaz P, Vázquez L, Díez-Baños P, Morrondo P (2013) Prevalence and identity of *Sarcocystis* spp. in roe deer (*Capreolus capreolus*) in Spain: a morphological study. *Research in Veterinary Science*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.08.003>.
- Prayson B, McMahon J, Prayson R (2008) Fast food hamburgers: what are we really eating? *Annals of Diagnostic Pathology*, 12, 406-409.
- Savini G, Dunsmore J, Robertson I, Seneviratna P (1992) The epidemiology of *Sarcocystis* spp. in cattle of Western Australia. *Epidemiology and Infection*, 108, 107-113.
- Savini G, Robertson I, Dunsmore J (1996) Viability of the sporocysts of *Sarcocystis cruzi* after exposure to different temperatures and relative humidities. *Veterinary parasitology*, 67, 153-160.
- Savini G, Robertson I, Dunsmore J (1997a) Class-specific antibody responses in cattle following experimental challenge with sporocysts or merozoites of *Sarcocystis cruzi*. *Veterinary parasitology*, 72, 121-127.
- Savini G, Robertson I, Dunsmore J (1997b) Sensitivities and specificities of two ELISA tests for detecting infection with *Sarcocystis* in cattle of Western Australia. *Preventive veterinary medicine*, 32, 35-40.
- Tenter A (1995) Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *International journal of parasitology*, 25(11), 1311-1330.
- Ugla 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 international des épizooties*, 9 (2), 441-462.
- Vangeel L, Houf K, Geldhof P, Nollet H, Vercruysse J, Ducatelle R, Chiers K (2012) Intramuscular inoculation of cattle with *Sarcocystis* antigen results in focal eosinophilic myositis. *Veterinary parasitology*, 183, 224-230.
- Vangeel L, Houf K, Geldhof P, De Preter K, Vercruysse J, Ducatelle R, Chiers K (2013) Different *Sarcocystis* spp. are present in bovine eosinophilic myositis. *Veterinary Parasitology*, 197, 543– 548.
- Velasquez JN, Di Risio C, Etchart CB, Chertcoff AV, Mendez N, Cabrera MG, Carnevale S (2008) Systemic sarcocystosis in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Human pathology*, 39(8), 1263-1267.

Vercruysse J, Franssen J, van Goubergen M (1989) The prevalence and identity of *Sarcocystis* cysts in cattle in Belgium. *Zentralbl Veterinarmed B.* , 36(2), 148-153.

Wouda W, Snoep J, Dubey J (2006) Eosinophilic Myositis due to *Sarcocystis hominis* in a Beef Cow. *Journal of Comparative Pathology*, 135, 249-253.

Xiang Z, Chen X, Yang L, He Y, Jiang R, Rosenthal B, Luan P, Attwood SW, Zuo Y, Zang Y-P, Yang Z (2009) Non-invasive methods for identifying oocysts of *Sarcocystis* spp. from definitive hosts. *Parasitology international*, 58, 293-296.

Xiang Z, He Y, Zhao H, Rosenthal B, Dumans D, Li X, Zuo Y, Feng G, Cui L, Yang Z (2011) *Sarcocystis cruzi* : Comparative studies confirm natural infections of buffaloes. *Experimental parasitology*, 127, 460-466.

Yang Z-Q, Zuo Y-X, Ding B, Chen X-W, Luo J, Zhang Y-P (2001) Identification of *Sarcocystis hominis*-like (Protozoa: Sarcocystidae) cyst in water Buffalo (*Bubalus bubalis*) Based on 18S rRNA Gene Sequences. *The journal of Parasitology*, 87(4), 934-937.

Yang Z-Q, Li Q-Q, Zuo Y-X, Chen X-W, Chen Y-J, Nie L, Wei C-G, Zen J-S, Attwood SW, Zhang X-Z, Zhang Y-P (2002) Characterization of *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. *Experimental parasitology*, 102, 212-217.

### Chapitres de monographie :

Bowman D, Hendrix C, Lindsay D, Barr S (2002) The protozoa in Feline clinical parasitology. 1ère édition. Ames, Iowa State, University Press - A blackwell science company, p. 34-37.

Euzéby J. (1998) Les parasites des viandes : Épidémiologie, physiopathologie, incidences zoonosiques. Editions médicales internationales. Tec & Doc Lavoisier, p. 20-44 .

Ortega-Mora L, Gottstein B, Conraths F, Buxton D (2007) Aetiological diagnosis in Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control. 1ère édition. Wallingford, England, CABI Publishing, p. 172-195.

Radostits O, Gay C, Hinchcliff K, Constable P (1994) Diseases caused by protozoa in Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 8ème édition. Philadelphia, Saunders Ltd. P. 1191-1194.

### Rapports :

EFSA Scientific Panels on Biological Hazards (BIOHAZ) and on Animal Health and Welfare (AHAW), 2006a. Opinion on the Review of the Community Summary

Report on Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union, 2004. The EFSA Journal, 2006, 403, pp. 1-62.

EFSA, 2006b. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial resistance and Foodborne outbreaks in the European Union in 2005. The EFSA Journal 2006, 94, pp. 3-288.

EFSA, Scientific Panels on Biological Hazards (BIOHAZ) and on Animal Health and Welfare (AHAW), 2007a. Scientific Opinion on the Review of the Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2005. The EFSA Journal (2007), 600, pp. 1-32.

EFSA, 2007b. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection - Manual for Reporting on Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Food-borne Outbreaks in the framework of Directive 2003/99/EC and on some other pathogenic microbiological agents for information derived from the reporting year 2006. The EFSA Journal (2007), 100, pp. 1-86.

Taylor M., Boes J., Boireau P., Boué F., Claes M., Cook A. JC., Dorny P., Enemark H., van der Giessen J., Hunt K. R., Howell (M), Kirjušina M., Nöckler K., Pozio E., Rossie P., Snow L., Theodoropoulos G., Vallée I., Vieira-Pinto M., Zimmer I-A, 2010. Scientific report submitted to EFSA, Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Sarcocystis in animals and foodstuffs in the European Union

### Thèse :

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.

### Ressources électroniques :

NCBI, Taxonomy Browser (page consultée le 14/04/2014), adresse URL :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=5812&lvl=3&lin=s&keep=1&srchmode=1&unlock>

CFCPH, the centre for food security and public health (page consultée le 15/05/14), adresse URL : (Mise à jour le 1 mai 2005)

<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/sarcocystosis.pdf>

# Annexe 1

---

## Protocole d'inclusion dans la paraffine

### **Matériel :**

- Automate à inclusion (Tissue-Tek II, modèle 4634) permettant la déshydratation, la délipidation et l'imprégnation des tissus
- Distributeur de paraffine
- Plaque réfrigérante
- Microtome à paraffine
- Plaque chauffante
- Matériel de coloration des coupes
- Minuteur
- Hotte
- Moule à inclusion
- Papier essuie tout
- Rasoirs jetables
- Lame et lamelles

### **Réactifs :**

- Formol 10%
- Alcool à 70% et 95% alcool absolu
- Microclearing à base de terpène : LMR® ou Claral®
- Colorants (cf. coloration de Lillie Pasternak)

### **Méthode :**

Prélever un échantillon de 2x0.5 cm d'œsophage et de 5 mm d'épaisseur. Mettre le produit en cassette. Placer la cassette dans l'automate et lancer le cycle d'inclusion

Solidifier sur une plaque réfrigérante. Démouler pour obtenir des blocs prêts à être coupés. Couper au microtome pour obtenir des coupes de 3 µm environ

Recueillir les coupes. Déposer la coupe sur une lame de verre contenant de l'eau. Placer l'ensemble sur une plaque chauffante pour l'étalement et l'adhésion de la coupe sur la lame. Laisser sécher 24h dans une étuve à 40°C.

Déparaffiner la coupe dans deux bains de LMR® ou Claral® 5 minutes chacun. Eliminer le microclearing dans 2 bains d'alcool 100 et 95°, 5 minutes chacun puis dans un bain d'alcool à 70° pendant 5 min puis dans un bain d'eau.

Réaliser la coloration (cf. coloration de Lillie Pasternak). Rincer les lames à l'acétone sous la hotte. Les placer dans deux bains successifs de LMR® pendant quelques minutes

Déposer quelques gouttes de LMR®-histologique sur la lamelle. Placer la lamelle sur la lame, face couverte de LMR® au contact de la coupe. Laisser sécher 3h à température ambiante

## Annexe 2

---

### Protocole de coloration Lillie et Pasternak

#### **Technique :**

Déparaffiner et hydrater

Coloration pendant 1h30 dans le mélange suivant, préparé extemporanément :

- Giemsa : 4 mL
- Solution tampon pH 4.2 : 17 mL
- Acétone : 40 mL
- Eau distillée : 200 mL

Déshydrater directement avec de l'acétone pure

Eclaircir par 2 bains de LMR® (ou toluène)

Monter avec une résine synthétique

## Annexe 3

---

### Protocole de digestion pepsique

#### **Réactifs pour la solution pepsique :**

- pepsine 1 :2500
- NaCl
- HCl concentré 37%
- eau distillée

#### **Matériel :**

- Flacon de 1L
- Eprouvettes graduées de 1000mL et de 100mL
- Pipettes graduées de 5mL et de 2 mL
- Scalpels stériles
- Balance
- Broyeur
- Pots stériles
- Flacons en verre de grande section (250 mL) avec bouchon
- Etuve à 37°C
- Compresses de gaze stérile
- Ampoules à décanter
- Broyeur
- Tubes Falcon 10 mL
- Tubes collecteurs 2mL

#### **Méthode :**

Prélever 100g de muscle sur un œsophage.

Préparer la solution de digestion :

- 3g de pepsine
- 5g de NaCl
- 4.7 mL de HCl concentré
- 1L d'eau distillée

#### **Broyage :**

Broyer 2 minutes à vitesse maximum

#### **Incubation :**

Mélanger 20g de broyat avec 100mL de solution pepsique. Puis incuber à 37°C pendant 30min. Placer le reste de broyat dans un pot.

Filtration :

Filtrer à travers une couche de gaze.

Décantation :

Placer dans une ampoule à décanter pendant 30 min.

Récupérer 10 mL de culot dans un tube Falcon.

Placer 1.5 mL dans un tube collecteur.

Placer les pots, les Falcons et les tubes collecteurs au congélateur.

## Annexe 4

---

### Protocole d'extraction d'ADN

#### **Matériel :**

- Kit NucléoSpin Tissue
- Micropipettes et cônes
- Tubes collecteurs 2mL
- Bain-marie sec
- Vortex
- Centrifugeuse
- Ethanol 95%

#### **Méthode :**

##### Préparation de l'échantillon :

Mettre un tube collecteur à décongeler pour chaque échantillon

##### Pré-lyse de l'échantillon :

Prélever 200µL d'échantillon après agitation du tube. Ajouter 180µL de tampon T1 et 25 µL de protéinase K dans chaque échantillon. Puis, incuber les échantillons une nuit à 56°C au bloc chauffant.

##### Lyse de l'échantillon :

Ajouter 200 µL de tampon B3 dans chaque échantillon et agiter les tubes. Incuber 10 min au bloc chauffant à 70°C.

##### Précipitation de l'ADN :

Ajouter 210 µL d'éthanol dans chaque échantillon. Agiter les tubes.

##### Fixation de l'ADN :

Transférer la totalité de chaque échantillon sur colonne. Centrifuger 1 min à 11000g. Changer les tubes collecteurs.

##### Lavage de la membrane de silice :

Ajouter 500 µL de tampon BW dans chaque tube. Centrifuger 1 min à 11000g. Changer les tubes collecteurs. Ajouter 600 µL de tampon B5 dans chaque tube. Centrifuger 1 min à 11000g. Changer les tubes collecteurs.

##### Séchage de la membrane de silice :

Centrifuger 1 min à 11000g. Transférer la colonne sur un microtube,

Elution de l'ADN :

Ajouter 100 $\mu$ L de tampon BE. Incuber 1 min à température ambiante. Centrifuger 1 min à 11000g.

Placer les tubes au congélateur

## Annexe 5

---

### Protocole de PCR multiplex en temps réel *Sarcocystis* spp.

#### **Matériel :**

- Micropipettes et cônes
- Plaque 96 puits
- Bouchons
- Réactifs PCR
- Thermocycleur

#### **Méthode :**

##### Préparation du Mix :

- 10 µL de IQ Supermix (dNTPs, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 unités/mL Taq polymérase dans un tampon) dilué avec de l'eau distillée
- 600 nM de SarcoRTF (0,6 µL), 400 nM de SarcoRTR (0,6 µL), 300 nM de ShirsutaRTR (1,2 µL), 200 nM de Shirsuta-Probe (0.8 µL), 100 nM de Scruzi-Probe (0.8 µL)
- 2.5 µL d'eau stérile

##### Préparation des échantillons :

Placer 2.5 µL d'ADN et 17.5 µL de mix dans chaque puits.

##### Amplification :

Placer la plaque dans le thermocycleur Agilent Mx3005P. Programme : 95°C pendant 4 min, puis 40 cycles, de 15 secondes à 95°C et 40 secondes à 62°C.

##### Séquences des amorces et des sondes :

SarcoRTF : TCT-GCT-GGA-AGC-AAT-CAG-TC

SarcoRTR : AGG-CAA-TAA-GCC-TGC-TTC-AA

ShirsutaRTR : GCA-ACA-ATA-AGC-CTG-CTT-CAA-A

Shirsuta : (FAM)-CCT-TCT-AAT-GAG-GGT-GTG-TAC-TTG-ATG-AA

Scruzi : (Cy3)-ACC-CAT-CTA-TAT-TGG-GAT-AAT-ACC-GTT-ACT

## Annexe 6

---

Protocole de PCR en temps réel *Sarcocystis hominis* et *Sarcocystis sinensis*.

### Matériel :

- Micropipettes et cônes
- Plaque 96 puits
- Bouchons
- Réactifs PCR
- Thermocycleur

### Méthode :

#### Préparation du Mix :

- 17,5 µL de mix = 10 µL de IQ Supermix (dNTPs, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 unités/mL Taq polymérase dans un tampon) dilué avec de l'eau distillée, 250 nM de ShomF (1 µL), 250 nM de ShomR (1 µL), 100 nM de ShomP (2 µL).

Ou

- 17,5 µL de mix = 10 µL de IQ Supermix (dNTPs, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 unités/mL Taq polymérase dans un tampon) dilué avec de l'eau distillée, 250 nM de SsinF (1 µL), 250 nM de SsinR (1 µL), 100 nM de SsinP (2 µL).

#### Préparation des échantillons :

Placer 2.5 µL d'ADN et 17.5 µL de mix dans chaque puits.

#### Amplification :

Placer la plaque dans le thermocycleur Agilent Mx3005P. Programme : 95°C pendant 4 min, puis 40 cycles, de 15 secondes à 95°C et 40 secondes à 62°C.

#### Séquences des amorces et des sondes :

ShomF : CAT-GGC-CGT-TCT-TAG-TTG-GT

ShomR : TGC-GTT-AGA-CAC-GCA-AAG-TC

ShomP : (Cy5)-CAA-CAA-6GA-AGT-GCG-TTC-YTG-ATC-CT

SsinF : CAA-TGT-GCT-GTT-CAC-ACT-GC

SsinR : TCC-AAC-GTA-GAT-GGG-TAC-GA

SsinP : (Hex)-CCC-GCA-TTG-TTC-TCC-GGC-TT

## Annexe 7

---

### Protocole de PCR en temps réel *Toxoplasma gondii*.

#### **Matériel :**

- Micropipettes et cônes
- Plaque 96 puits
- Bouchons
- Réactifs PCR
- Thermocycleur

#### **Méthode :**

##### Préparation du Mix :

- 10 µL de IQ Supermix (dNTPs, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 unités/mL Taq polymérase dans un tampon) dilué avec de l'eau distillée
- 500 nM de RE.Few (0.8 µL), 500 nM de RE.Rv (0.8 µL), 125 nM de RE (1 µL).
- 4.9 µL d'eau stérile

##### Préparation des échantillons :

Placer 2.5 µL d'ADN et 17.5 µL de mix dans chaque puits.

##### Amplification :

Placer la plaque dans le thermocycleur Agilent Mx3005P. Programme : 95°C pendant 3 min, puis 40 cycles, de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C.

Séquence des amorces et de la sonde :

REFwb : CAC-AGA-AGG-GAC-AGA-AGT

RERvc : TCG-CCT-TCA-TCT-ACA-GTC

REprobe : CTC-TCC-TCC-AAG-ACG-GCT-GG

## Annexe 8

---

### Protocole de purification des produits PCR

#### **Matériel :**

- Kit QiAquick PCR purification
- Micropipettes et cônes
- Tubes collecteurs 2mL
- Centrifugeuse
- Ethanol 95%
- Acétate de sodium 3 M

#### **Méthode :**

##### Préparation des échantillons :

Ajouter 5 volumes de tampon PB à 1 volume de produits PCR. Si la couleur est orange ou violette, ajouter 10  $\mu$ L d'acétate de sodium 3 M (pH 5). La couleur doit devenir jaune

Transférer le mélange sur une colonne et centrifuger 30-60s à 17900 g (13000 rpm).  
Changer de tube collecteur.

##### Lavage :

Ajouter 750  $\mu$ L de tampon PE puis centrifuger 30-60s à 17900g (13000 rpm).  
Changer de tube collecteur.

##### Elimination des résidus de tampon :

Centrifuger 1 min à 17900 g (13000 rpm)

Placer la colonne sur un microtube collecteur de 1.5 mL.

##### Elution :

Ajouter 50  $\mu$ L de tampon EB et centrifuger pendant 1 min à 17900 g (13000 rpm).

Toulouse 2014

NOM : FLANDRIN

PRÉNOM : Camille

TITRE : Etude de la prévalence de la sarcosporidiose chez les bovins abattus en région Midi-Pyrénées.

RÉSUMÉ : La sarcosporidiose bovine est une maladie parasitaire qui engendre de lourdes pertes économiques. La plupart des animaux atteints sont asymptomatiques. Mais une minorité présente des lésions de myosite éosinophilique responsables de saisies à l'abattoir. Ce travail présente l'étude de la prévalence en région Midi-Pyrénées de la sarcosporidiose et des différentes espèces de sarcosporidies identifiées par le type de paroi. Les échantillons ont été analysés par microscopie optique, PCR et séquençage. La prévalence des sarcosporidies à paroi épaisse et paroi fine a été déterminée par microscopie optique. La distinction entre les espèces de sarcosporidies à paroi épaisse a été réalisée par PCR. Pour la première fois, *S. sinensis* a été identifié en France. Cependant, du fait de la proximité génétique entre les différentes espèces de sarcosporidies à paroi épaisse mise en évidence grâce au séquençage, leur prévalence par espèce n'a pas pu être précisément établie.

MOTS-CLÉS : SARCOSPORIDIOSE – SARCOCYSTIS SPP. – BOVIN – ABATTOIR – HISTOLOGIE – PCR – SEQUENCAGE

---

ENGLISH TITLE : Study of the prevalence of sarcosporidiosis in the cattle slaughtered in région Midi-Pyrénées.

ABSTRACT : The bovine sarcosporidiosis is a parasitic disease which engenders heavy economic losses. Most of the affected animals are asymptomatic. But a minority presents lesions of eosinophilic myositis responsible for confiscations in the slaughterhouse. This work presents the study of prevalence in région Midi-Pyrénées of the sarcosporidiosis and the different species of sarcocystis identified by the type of wall. The samples were analysed by microscopy, PCR and sequencing. Prevalence of sarcocystis with thick wall and thin wall was determined by microscopy. The distinction between the species of sarcocystis with thick wall and thin wall was determined by PCR. For the first time, *S. sinensis* was identified in France. However, because of the genetic closeness between the various species of sarcocystis with thick wall highlighted thanks to the sequencing, prevalence by species was not exactly established.

KEYWORDS : SARCOSPORIDIOSIS – SARCOCYSTIS SPP. – CATTLE – SLAUGHTERHOUSE – HISTOLOGY – PCR – SEQUENCING