

LA BESNOITIOSE BOVINE : UTILISATION DE LA BIOPSIE CUTANEE COMME UN OUTIL DIAGNOSTIQUE DES INDIVIDUS FORTS CONTAMINATEURS ET STRATEGIE D'ASSAINISSEMENT DES TROUPEAUX A FORTE SEROPREVALENCE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

Leslie BOTTARI

Née, le 27 juin 1993 à Saint-Jean (31)

Directeur de thèse : Mr Philippe JACQUIET

JURY

PRESIDENT :

Mr Antoine BERRY

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mr Philippe JACQUIET

Mr Fabien CORBIERE

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maitre de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITES :

Mr Jean-Pierre ALZIEU

Mme Christelle GRISEZ

Docteur Vétérinaire au Laboratoire Vétérinaire Départemental d'Ariège
Docteur de l'Université Paul-Sabatier à l'École Nationale Vétérinaire
de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur par intérim : Frédéric Bousquet

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAÎTRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
- Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
- Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophtalmologie*
- M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

Remerciements

A Monsieur le Professeur Antoine Berry

Professeur de l'Université Paul Sabatier de Toulouse et Praticien Hospitalier au CHU de Toulouse
Chef du Service de Parasitologie et Mycologie

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.
Hommages respectueux

A Monsieur le Professeur Philippe Jacquet

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
Parasitologie et Maladies parasitaires

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse,
Pour votre disponibilité, votre écoute et vos bons conseils,
Pour les sorties aux quatre coins de France : l'Aveyron, l'Ardèche ou encore le Pays-Basque...,
Veuillez trouver ici, l'expression de ma profonde gratitude et mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Fabien Corbière

Maître de conférence de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie des Ruminants

Pour avoir accepté le rôle d'assesseur de cette thèse et votre aide précieuse,
Je vous présente toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Jean-Pierre Alzieu

Docteur vétérinaire au Laboratoire Vétérinaire Départemental de l'Ariège

Pour avoir accepté d'être présent en tant que membre invité,
Pour votre contribution à ce travail, je vous transmets mes plus sincères remerciements.

A Madame Christelle Grisez

Docteur de l'Université Paul Sabatier à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pour avoir accepté d'être présente en tant que membre invitée.

Merci au service de parasitologie de l'ENVT et surtout à Christelle Grisez et Françoise Prevot

Pour leur aide précieuse et leur contribution dans ce travail de thèse,
Pour leurs conseils, leur gentillesse et leur bonne humeur, un grand merci.

Un grand merci à tous les éleveurs, techniciens et vétérinaires qui se sont prêtés à cette investigation

A Christophe Lacz, Christian Boulon, Fabrice Mejean, Julie Petermann, Esthel Thierpige ainsi que **GDS France** pour sa contribution financière à l'étude « Biopsies cutanées et besnoitiose » de la **FRGDS Occitanie**.

Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et toute ma reconnaissance.

À ma famille, mes amis et toutes les belles rencontres qui m'ont permis d'en arriver jusqu'ici ...

« Le succès n'est pas final, l'échec n'est pas fatal, c'est le courage de continuer qui compte. » (W.Churchill)

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	13
PARTIE 1 : Etude bibliographique.....	14
I. Définition de la besnoitiose bovine	14
II. Historique de la maladie	14
1. Description des premiers cas cliniques.....	14
2.1 Au niveau mondial.....	15
2.2 Au niveau européen	15
2.3 En France	16
3. Etat des lieux aujourd’hui en France.....	18
III. Le parasite <i>Besnoitia besnoiti</i>	18
1. Taxinomie	18
2. Les formes du parasite.....	19
3. Les cycles biologiques	22
3.1 Les hôtes	22
3.2 Les cycles	24
3.3 Les vecteurs.....	27
IV. Epidémiologie.....	28
1. Facteurs liés à l’hôte et au troupeau.....	28
1.1. L’âge.....	28
1.2. Le sexe	29
1.3. La race.....	29
1.4. L’efficacité du système immunitaire	29
1.5. La prévalence de l’infection	29
1.6. La taille du troupeau et les modes d’élevage	30
2. Epidémiologie analytique	30
2.1. Persistance de <i>B. besnoiti</i> chez les insectes vecteurs.....	30
2.2. La notion de repas interrompu	31
2.3. Le rôle du vecteur dans la contamination intra et intercheptel	32
2.4. La saisonnalité	33
2.5. Le comportement trophique.....	33
3. Bilan	34
V. Pathogénie et signes cliniques.....	36
1. Modalités d’infection et réponse immunitaire	36
2. L’infection asymptomatique.....	38
3. Les phases cliniques de l’infection symptomatique	38
3.1. La phase fébrile.....	39
3.2. La phase d’oedèmes	40
3.3. La phase de sclérodermie	41
4. Les conséquences fonctionnelles.....	44

5.	Les lésions.....	46
6.	Evolution et pronostic.....	46
VI.	Diagnostic	47
1.	Diagnostic clinique et différentiel des différentes phases de la maladie.....	47
2.	Diagnostic de laboratoire.....	50
2.1	Mise en évidence directe du parasite.....	51
2.2	Mise en évidence des marqueurs d'infection par sérologie	55
3.	Bilan	63
VII.	Mesures de lutte	67
1.	Traitement des cas cliniques.....	67
2.	Mesures de prophylaxie	69
2.1	Prophylaxie médicale : la vaccination	69
2.2	Prophylaxie sanitaire	69
2.3	Lutte antivectorielle	76
3.	Evaluation de l'impact zooteknique et économique.....	78
4.	Les aides financières à disposition des éleveurs engagés	79
VIII.	« Vivre avec » la besnoitiose.....	80

PARTIE 2 : Étude expérimentale : Utilisation de la biopsie cutanée et de l'analyse PCR temps réel comme outil de diagnostic des individus « forts contaminateurs » dans des élevages à forte séroprévalence. 81

I.	Présentation du projet	81
1.	Contexte, objectifs et hypothèses de l'étude.....	81
2.	Les acteurs du projet.....	85
3.	Résultats de l'étude préalable (d'après Le Mével, 2017).....	86
3.1	Évaluation de la répartition de <i>B. besnoiti</i> chez des bovins infectés chroniques	86
3.2	Définition d'une zone de biopsie cutanée de choix avec la meilleure sensibilité de détection de l'ADN parasitaire en PCR temps réel.....	89
II.	Matériels et méthodes	90
1.	Les élevages de l'étude	90
2.	Les biopsies cutanées.....	93
3.	Analyse PCR temps réel (ou quantitative : qPCR)	95
4.	Analyse sérologique par la méthode ELISA.....	96
5.	Analyse sérologique par la méthode Western Blot.....	96
6.	Suivi des élevages après analyse PCR temps réel.....	97
7.	Analyses statistiques.....	97
III.	Résultats	98
1.	Situation sur l'ensemble des élevages.....	98
1.1	Répartition des bovins selon la classe de Ct en PCR temps réel.....	98
1.2	Étude de la corrélation entre le titre en anticorps (DO) et le résultat du signal PCR temps réel (Ct).....	103
1.3	Étude de l'influence de différents facteurs biologiques sur le résultat du signal PCR.....	105

2.	Situation de certains élevages selon des stratégies de gestion différentes.....	111
2.1	Une stratégie de réforme rapide des individus « forts contaminateurs »	112
2.2	Le devenir du troupeau de renouvellement dans un cheptel contraint de vivre avec la maladie.....	116
IV.	Discussion.....	118
1.	Une tendance de répartition des bovins « forts contaminateurs » dans un cheptel à forte séroprévalence.....	118
2.	Le choix de la valeur seuil pour la qualification d'un bovin « positif » à l'analyse PCR temps réel	119
3.	Une répartition hétérogène des kystes induisant des individus « faux négatifs » sur un unique prélèvement cutané.....	119
4.	Une faible corrélation entre le titre en anticorps et la richesse en ADN parasitaire dans le derme.....	120
5.	Un suivi des élevages plus ou moins rigoureux et des succès variables	121
6.	La biopsie cutanée, une technique à diffuser au plus grand nombre	122
	CONCLUSION.....	123
	BIBLIOGRAPHIE.....	127
	ANNEXES.....	134
	Protocole d'extraction d'ADN de <i>B. besnoiti</i> (ENVV).....	134
	Données brutes obtenues pour l'ensemble des élevages de l'étude A à H	135

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1 : Carte représentative des pays infectés par la besnoitiose bovine en Europe.....	16
Figure 2 : Extension de la besnoitiose bovine en France de 1990 à 2019.	17
Figure 3: Les deux formes du parasite <i>Besnoitia besnoiti</i> lors d'infection d'un bovin.....	20
Figure 4 : A : Représentation schématique d'un kyste à bradyzoïtes avec ses différentes structures. B: Vue rapprochée d'un kyste à bradyzoïtes.	21
Figure 5 : Vue microscopique d'une coupe histologique de la peau d'un bovin avec de multiples kystes à bradyzoïtes de <i>B. besnoiti</i>	22
Figure 6 : Le cycle dixène du protozoaire <i>Besnoitia besnoiti</i>	25
Figure 7 : Le cycle principal monoxène de <i>Besnoitia besnoiti</i> par transmission vectorielle mécanique.	26
Figure 8 : Les deux principaux vecteurs de <i>Besnoitia besnoiti</i> : un Tabanidé (<i>Tabanus spp.</i>) et <i>Stomoxys calcitrans</i>	27
Figure 9: Le rayon d'action des tabanidés et stomoxes lors de la complétion du repas de sang chez les bovins.....	32
Figure 10: Photo 1 : Multiples stomoxes présents sur les membres antérieurs et le ventre d'un bovin lors du repas de sang ; Photo 2 : Stomoxes se gorgeant au niveau du canon d'un bovin.	34
Figure 11: Principaux facteurs de l'hôte et du vecteur dans le cas d'une transmission vectorielle.	35
Figure 12: Cinétique d'une infection à <i>Besnoitia besnoiti</i> après primo-infection chez un bovin.....	37
Figure 13: Signes cliniques caractéristiques de la phase fébrile.	39
Figure 14: Signes cliniques et lésions propres à la phase des oedèmes.	41
Figure 15: Signes cliniques et lésions de la phase de sclérodémie.....	43
Figure 16: Conséquences lésionnelles et fonctionnelles sur la fonction sexuelle d'un taureau infecté par <i>B. besnoiti</i>	45
Figure 17: Les différents moyens de diagnostic expérimental de la besnoitiose selon la phase de la maladie.	51
Figure 18: Exemple de courbe d'amplification obtenue pour une analyse PCR temps réel (ou qPCR : PCR quantitative) d'un échantillon donné.	53
Figure 19: Photo 1 : Observation microscopique de kystes à bradyzoïtes de <i>B.besnoiti</i> dans une biopsie cutanée. Photo 2 : Observation microscopique d'un frottis vaginal de vache avec présence de bradyzoïtes et des érythrocytes.....	54
Figure 20: Schéma du principe de l'immunofluorescence indirecte.	56
Figure 21: Observation de tachyzoïtes sur une lame « témoin positif » au microscope à UV par technique d'immunofluorescence indirecte à la dilution 1 :200.	57
Figure 22: Résultats de Western blot de sérum de bovins infectés à <i>B.besnoiti</i> à différentes phases de la maladie.	61

<i>Figure 23: Mesures sanitaires à mettre en place à différents niveaux pour le contrôle de la besnoitiose bovine</i>	70
<i>Figure 24: Logigramme de la gestion d'une suspicion clinique de besnoitiose bovine</i>	75
<i>Figure 25: Pièges pour la capture d'insectes hématophages</i>	77
<i>Figure 26: Présentation des différents profils de bovins présents dans un cheptel infecté et conduite à tenir par ordre de réforme</i>	83
<i>Figure 27: La définition du nombre V : nombre de nouvelles infections parasitaires induites par un individu</i>	84
<i>Figure 28: Zones de prélèvements externes réalisés sur les bovins autopsiés à l'ENVV</i>	88
<i>Figure 29: Carte de la répartition des élevages participants à l'étude</i>	90
<i>Figure 30: Étapes de prélèvement pour les biopsies cutanées</i>	94
<i>Figure 31 : Histogramme de la répartition du pourcentage d'individus par classe de Ct pour l'ensemble des élevages</i>	100
<i>Figure 32: Histogrammes de la répartition des individus par classe de Ct pour les élevages A à H</i> . 103	
<i>Figure 33: Graphique de la répartition des individus et corrélation linéaire selon le titre en anticorps (DO) et le résultat du signal PCR temps réel (Ct) pour 147 individus des élevages A à D</i>	104
<i>Figure 34: Histogramme représentatif de la distribution des 147 individus des élevages A à D selon leur résultat de PCR temps réel</i>	108
<i>Figure 35: Histogramme représentatif de la distribution des 147 individus des élevages A à D selon leur résultat au test ELISA (%DO)</i>	109
<i>Figure 36: Diagramme boîte à moustache de la répartition des 147 individus selon leur résultat de PCR temps réel par classes de DO</i>	110
<i>Figure 37: Frise événementielle du suivi des analyses et résultats obtenus pour l'élevage A de 2017 à 2019</i>	113

<i>Tableau 1:</i> Diagnostic différentiel de la phase fébrile.	48
<i>Tableau 2:</i> Diagnostic différentiel en phase des oedèmes.	49
<i>Tableau 3:</i> Diagnostic différentiel en phase de sclérodémie.	49
<i>Tableau 4:</i> Tableau comparatif des outils diagnostiques de détection de la besnoitiose bovine.	66
<i>Tableau 5:</i> Recommandations concernant l'utilisation des sulfamides dans le traitement de la besnoitiose bovine lors de phase aiguë.	68
<i>Tableau 6:</i> Liste des bovins infectés chroniques à <i>B. besnoiti</i> autopsiés à l'ENVT entre 2012-2017. .	87
<i>Tableau 7:</i> Tableau récapitulatif des données initiales des huit élevages étudiés.	93
<i>Tableau 8:</i> Programme du thermocycleur MX3005P Stratagène utilisé pour la qPCR.	95
<i>Tableau 9:</i> Tableau d'interprétation des valeurs de Ct obtenues en qPCR.	96
<i>Tableau 10:</i> Gamme de dilution 105 à 1 tachyzoïte en qPCR d'après (UMR 1125 IHAP).	96
<i>Tableau 11:</i> Tableau de la répartition des bovins par cheptels et pour tous les élevages selon leur résultat de l'analyse PCR temps réel.	99
<i>Tableau 12:</i> Tableau croisé des effectifs et pourcentages par catégorie des différentes variables (Ct ; élevage ; âge et classe de DO) du modèle logistique multinomial étudié*.	107
<i>Tableau 13:</i> Tableau des principales caractéristiques (minimum, 1e quartile (Q1), médiane, moyenne, 3e quartile (Q3), maximum, variance (Var) et écart-type (sd)) de la variable Ct.	107
<i>Tableau 14:</i> Tableau des principales caractéristiques (minimum, 1e quartile (Q1), médiane, moyenne, 3e quartile (Q3), maximum, variance (Var) et écart-type (sd)) de la variable DO.	108
<i>Tableau 15:</i> Résultats de l'analyse de régression logistique multinomiale de la variable Ct (résultat de la PCR temps réel « positif » et « négatif ») en fonction de trois variables : l'élevage, l'âge et le résultat de la sérologie (DO).	110
<i>Tableau 16:</i> Résultats des analyses sérologiques et PCR temps réel des 32 bovins aux différentes périodes de prélèvements de l'année 2017 de l'élevage A.	114
<i>Tableau 17:</i> Tableau récapitulatif de la situation actuelle (septembre 2019) des élevages G et H.	116
<i>Tableau 18:</i> Tableau des résultats des analyses PCR temps réel et sérologies du suivi des génisses de renouvellement de l'élevage C entre mai 2017 et avril 2018.	117

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

B.besnoiti : *Besnoitia besnoiti*

BVD : Diarrhée virale bovine

Ct : Cycle de seuil

DO : Densité optique

EFSA : European Food Safety Authority

ELISA : *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* : Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

ENV : Ecole Nationale Vétérinaire ; ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

GDS : Groupement de défense sanitaire

HE : Hemalun eosine

IC : Intervalle de confiance

IFI : Immunofluorescence indirecte

LDV : Laboratoire départemental vétérinaire

μm : Micromètre (= 10^{-6} m = 10^{-3} mm)

MO : Microscope optique

Obj : Objectif

PCR : *Polymerase Chain Reaction* : Réaction en chaîne par polymérase

P-value : *Probability value* : p-valeur

qPCR : PCR quantitative

Se : Sensibilité

Sp : Spécificité

sp. : *Species* : Espèce

spp. : *Species pluralis* : Espèces

TTC : Toutes taxes comprises

WB : Western blot

La besnoitiose bovine est une maladie parasitaire vectorielle causée par le protozoaire Apicomplexa *Besnoitia besnoiti*. Son expansion rapide et sans précédent fait qu'à ce jour, elle est qualifiée de maladie émergente en France et en Europe (EFSA 2010) avec un impact médical et économique avéré. Du fait d'un transit important de bovins au sein du pays, l'introduction d'un animal contaminé au sein d'un troupeau indemne est la cause de sa récente dissémination entre les cheptels français et à travers le continent européen.

La transmission mécanique de ce parasite, d'un bovin infecté à un bovin sain par les insectes vecteurs, ne fait plus de doutes. En effet, stomoxes et tabanidés, même en faible nombre, ont un rôle majeur dans la transmission immédiate dans un périmètre limité autour du bovin infecté « fort contaminateur » en phase de sclérodermie. Ils sont ainsi responsables de la diffusion essentiellement intra-cheptel du parasite.

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement efficace ni vaccin disposant d'une AMM en France. De plus, les moyens chimiques de lutte contre les vecteurs disponibles sont d'efficacité variable. De ce fait, la lutte contre la besnoitiose bovine repose sur l'identification et la réforme sélective, la plus rapide possible des individus séropositifs d'un troupeau. Or, de nombreux élevages ont un fort taux de séroprévalence, sans possibilité de réforme rapide des individus contaminés ou de conduite en lots séparés (un lot sain et un lot infecté). Dès lors, quelles sont les solutions envisageables pour un cheptel fortement contaminé ?

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet « Biopsie cutanée et besnoitiose », d'utiliser la biopsie cutanée comme un outil de diagnostic dans le but de détecter les individus à risque de contamination, dans des cheptels à forte séroprévalence, afin de pouvoir les éliminer en priorité.

La première partie de ce travail est une synthèse bibliographique des connaissances actuelles en matière de besnoitiose bovine en insistant sur les modes de transmission et la relation hôte-vecteur ; les différentes méthodes de diagnostic, allant de la suspicion à la certitude et les moyens de gestion aujourd'hui mis en oeuvre.

La seconde partie est consacrée à la première phase de ce projet et expose les résultats des travaux réalisés de 2017 à 2019 dans huit élevages français à fort taux de séroprévalence.

I. Définition de la besnoitiose bovine

La besnoitiose bovine, aussi appelée « anasarque » des bovins est une maladie parasitaire vectorielle provoquée par un protozoaire : *Besnoitia besnoiti*. Les premiers cas cliniques ont été observés à l'époque romaine avec des foyers anciens persistants en France méridionale mais le parasite a été décrit pour la première fois en 1912 par les professeurs C. Besnoit et V. Robin de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Le parasite fut nommé ainsi par Marotel en leur honneur.

Depuis 2010, elle est officiellement déclarée maladie émergente en Europe (European Food Safety Authority, 2010) du fait de son extension rapide et des conséquences sanitaires et économiques qu'elle induit.

II. Historique de la maladie

1. Description des premiers cas cliniques

Connue depuis l'Antiquité, la première description de cette maladie date du IV^e siècle où Végèce, reprenant les connaissances de Caton, Columelle et Pélagonios, précise les signes cliniques de la phase terminale de cette affection qu'il dénomme à l'époque « *éléphantiasis* ».

En 1817, un vétérinaire du Tarn, Santin, est le premier à décrire la phase d'oedèmes et de sclérodémie. Il dresse un tableau descriptif des localisations précises de ces oedèmes : « *engorgements des coudes, paupières, muflle et fanons ...* » et décrit l'évolution clinique « *la peau prend l'apparence d'un cuir tanné, tombe en lambeau et s'exfolie comme l'écorce d'un arbre* » (Ferrie, 1984).

Lafosse, professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse précise en 1858 l'évolution de la maladie en trois phases « *début, état et déclin* » avec seulement deux issues possibles, la mort ou la chronicité. Quelques années plus tard, Cruzel émet l'hypothèse de la transmission vectorielle par des insectes piqueurs (Legrand, 2003)

Ce n'est qu'en 1912 que le parasite est isolé pour la première fois à partir de lésions cutanées par les professeurs C. Besnoit et V. Robin de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Ils parlent alors de « *sarcosporidiose cutanée* ».

2. L'évolution de la maladie

2.1 *Au niveau mondial*

À l'échelle mondiale, des cas ont été décrits en Afrique du sud puis la maladie s'est largement répandue dans d'autres pays d'Afrique sub-saharienne (Swaziland, Botswana, Namibie, Zimbabwe, Angola, Congo, Kenya, Tanzanie, Ouganda, Soudan, Cameroun et Nigeria) où elle est considérée comme endémique. De plus, Israël, la Russie, la Corée du Sud ou encore le Venezuela rapportent également des cas cliniques de cette maladie (Alvarez-Garcia et al., 2013).

2.2 *Au niveau européen*

Les premiers cas cliniques de besnoitiose bovine ont été décrits dans les Pyrénées françaises et au Portugal (EFSA, 2010). Longtemps sous diagnostiquée du fait du manque de connaissances à son sujet, elle est restée cantonnée aux départements du sud ouest de la France : l'Aude, l'Ariège, les Pyrénées Orientales ou encore la Haute Garonne, dans les années 1990, avec une prévalence relativement faible (Sahun, 1998 ; Ferrie, 1984). Ainsi, elle est considérée comme maladie endémique en France mais aussi au Portugal et en Espagne (Alzieu et Jacquet, 2012).

Depuis les années 2000, il y a une réelle augmentation des cas de besnoitiose avec une progression géographique sans précédent en France, du sud-ouest vers l'ensemble de l'hexagone et une persistance des cas en Espagne et au Portugal. De nouveaux foyers ont également été décrits en Italie et en Allemagne révélant son caractère invasif (Alvarez-Garcia et al., 2013).

La figure 1 est une carte représentant la répartition des cas de besnoitiose bovine en Europe : les cercles rouges représentent les pays européens ayant déclaré au moins un cheptel infecté (GDS France, 2019)



Figure 1 : Carte représentative des pays infectés par la besnoitiose bovine en Europe.

(actualisée selon les données GDS France, 2019).

Plus récemment, des cas localisés ont été déclarés en Belgique, Hongrie (Hornok et al, 2014) et en Irlande (Ryan et al, 2016).

2.3 En France

En France, la zone du piémont pyrénéen est la zone historique d'origine de cette maladie. C'est aussi une zone où l'estive est pratique courante. Ainsi, il est probable que le mélange d'animaux provenant de cheptels différents soit une des causes primaires d'une large diffusion de cette maladie (Alzieu, 1991).

À partir des années 1990, de nouveaux cas sporadiques font leur apparition dans le nord du Massif Central et les Deux-Sèvres. De nouvelles zones endémiques se sont rapidement formées dans les Alpes du Sud à partir de 2001.

La maladie n'a cessé de progresser, au sud de la ligne Nantes-Lyon, avec de nouveaux cas répertoriés dans le Var (2004), l'Isère (2005), le Rhône (2007) ou encore le sud du Massif Central (2009) (Alzieu et Jacquet, 2009). Plus récemment, des cas ont été déclarés dans les départements de la Loire et du Cher (Duboisset, 2013).

La figure 2 permet de voir la dynamique d'expansion de la maladie en France de 1990 à aujourd'hui, reprenant les données de LVD (Laboratoire Vétérinaire Départemental) de différents départements, des écoles vétérinaires de Nantes (Oniris) et de Toulouse (ENVT) et des GDS (Groupement de Défense Sanitaire) synthétisées dans les travaux de JP. Alzieu et P. Jacquet. Chaque cercle représente des zones d'enzootie, d'émergence avec ou sans diffusion locale ou des cas sporadiques plus ou moins récents. Ces localisations sont relevées sur la base d'un cheptel ou groupe de cheptels avec des cas cliniques avérés.

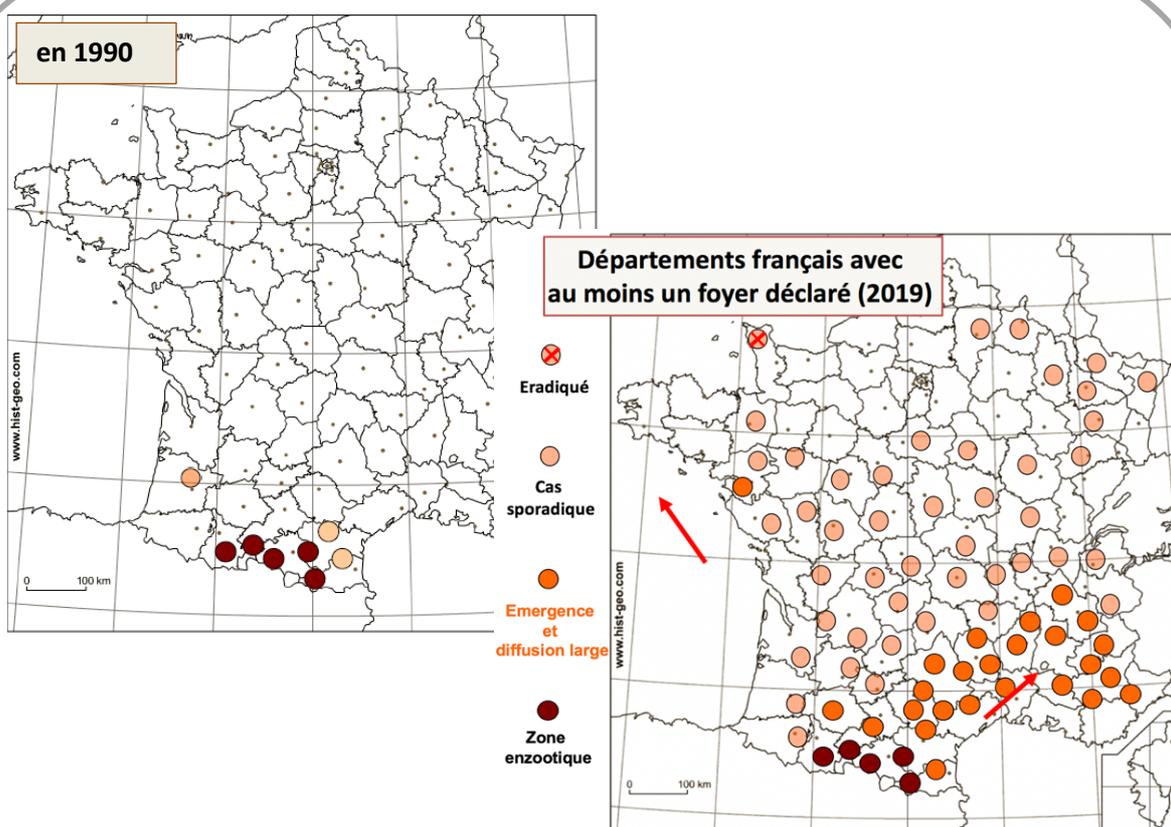


Figure 2 : Extension de la brucellose bovine en France de 1990 à 2019.

Sources : Ecoles vétérinaires, Laboratoires vétérinaires départementaux, Vétérinaires et GDS départementaux et régionaux.
actualisé d'après les données d'Alzieu et Jacquet (2019).

3. Etat des lieux aujourd'hui en France

Aujourd'hui, en 2019, plus de 50 départements français ont déclaré au moins un cheptel infecté et d'après les dernières données de GDS France, plus de 500 nouveaux cheptels infectés ont été repertoriés sur la seule année 2017. Cependant, il reste difficile d'établir une répartition géographique précise de la maladie sur notre territoire. En effet, la besnoitiose n'est pas une maladie réglementée. Elle est d'apparition récente dans de nombreuses régions et reste peu connue notamment en zone indemne ce qui rend difficile sa détection et sous évalue la prévalence des cas cliniques. De plus, le dépistage n'étant pas réalisé de manière systématique, elle est souvent déjà bien installée lorsqu'elle est présente en zone d'émergence. Ceci renforce l'idée que la détection précoce est primordiale afin d'éviter les répercussions économiques conséquentes auxquelles sont confrontés les éleveurs dont les cheptels sont atteints.

Son importance à la fois médicale, zootechnique mais aussi économique avec l'impact qu'elle induit dans les transactions commerciales d'animaux en fait une maladie redoutable qui lui vaut le statut de maladie vectorielle émergente des bovins depuis 2010 par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA).

III. Le parasite *Besnoitia besnoiti*

1. Taxinomie

L'espèce *Besnoitia besnoiti* est un protozoaire du phylum des Apicomplexa, famille des Sarcocystidae et sous-famille des Toxoplasmatinae. C'est un parasite obligatoire, dépourvu d'organites locomoteurs, existant sous deux formes chez l'hôte bovin : une forme proliférative (tachyzoïtes qui se multiplient à l'intérieur des cellules) et une forme kystique (bradyzoïtes enfermés dans des kystes). Ces deux états du parasite seront décrits par la suite lors de la description des formes du parasite chez le bovin. En plus du bovin, *B. besnoiti* a déjà été retrouvé chez d'autres espèces comme le gnou et l'impala (Lenfant, 2013).

Neuf autres espèces du même genre ont été signalées chez les grands mammifères ongulés domestiques (*B. caprae* chez la chèvre, *B. benneti* chez l'âne et le cheval) et sauvages (*B. tarandi* chez le renne et le caribou) mais aussi chez les lagomorphes, les marsupiaux et les lézards. Les espèces affectant les petits mammifères sont *B. darlingi*, *B. jellisoni*, *B. wallacei*, *B. oryctofelisi*, *B. akodoni* et *B. neotomofelis* (Lenfant, 2013).

Toutes ces espèces sont phylogénétiquement proches d'autres parasites tels que *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* ou encore *Sarcocystis spp.* Cette proximité a été une aide précieuse pour comprendre la biologie de *B. besnoiti*, cependant les relations évolutives entre toutes ces espèces et les modalités d'infestation ont été peu étudiées.

2. Les formes du parasite

Lors d'infection chez le bovin, *Besnoitia besnoiti* va évoluer en deux formes successives: la forme tachyzoïte puis la forme bradyzoïte à l'origine des kystes tissulaires (Figure 3).

La forme proliférative tachyzoïte est retrouvée chez le bovin récemment contaminé lors de la première phase de la maladie. Les tachyzoïtes sont capables de se multiplier activement au sein des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et des monocytes où ils forment des pseudo-kystes juxta-vasculaires (Thomas, 2007). Une partie d'entre eux se disséminent, via la circulation générale, dans l'organisme.

La forme bradyzoïte est une forme intracellulaire retrouvée dans de nombreux tissus. C'est le regroupement des bradyzoïtes qui forme les kystes tissulaires : entités caractéristiques de la phase chronique de la maladie. Bradyzoïtes et tachyzoïtes ont une morphologie similaire, en forme de virgule, et mesurent environ 6 à 8 μm de long pour 2 μm de large (Dubey et al., 2003).

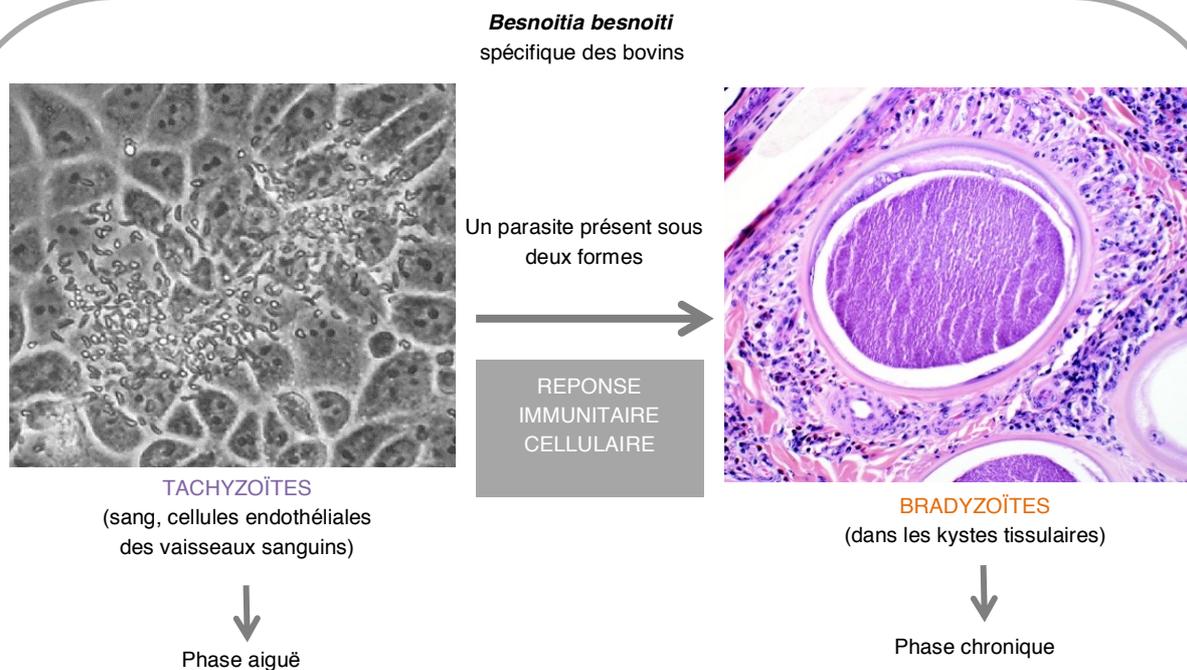


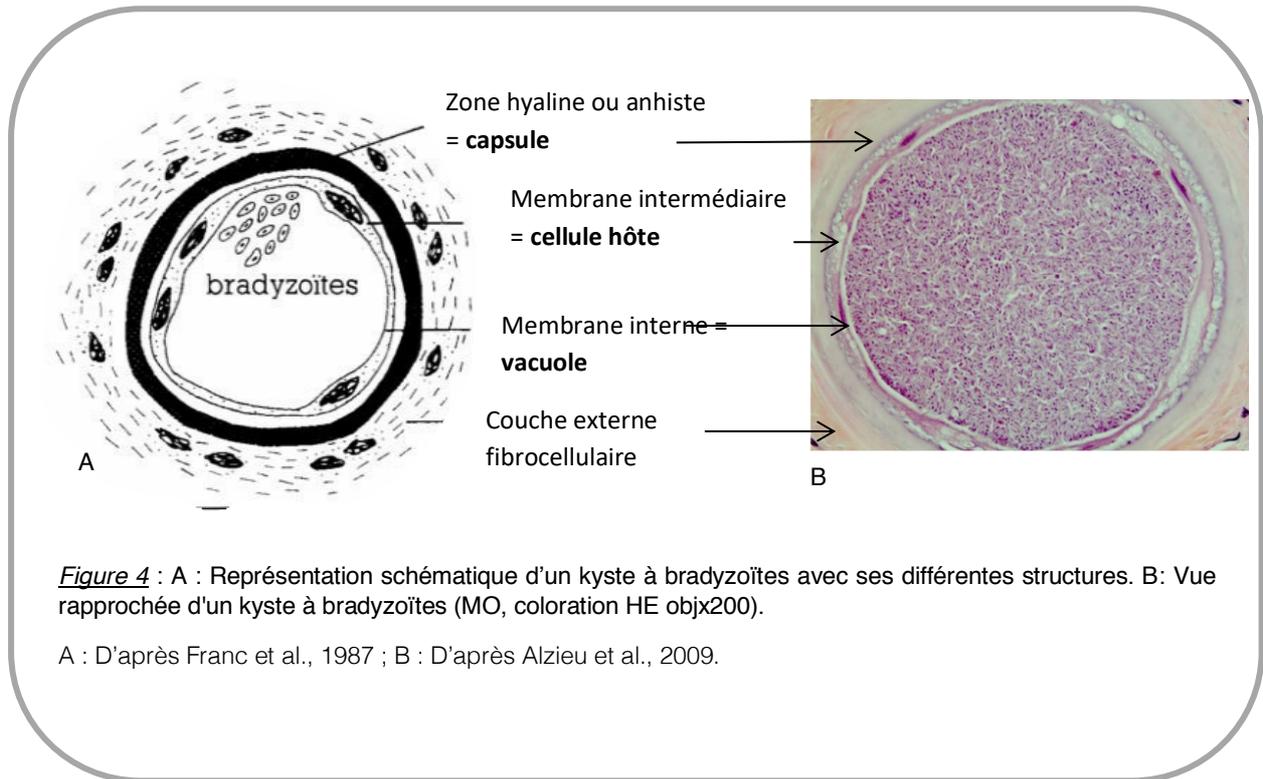
Figure 3: Les deux formes du parasite *Besnoitia besnoiti* lors d'infection d'un bovin.

D'après Alzieu et Jacquet, 2016

Photographies : Tachyzoïtes en culture cellulaire, d'après Alvarez-Garcia et al., 2014 ; Kyste à bradyzoïtes de *B. besnoiti* en vue microscopique, HE, objx200 d'après Ryan EG et al., 2016

La formation du kyste résulte d'un regroupement de bradyzoïtes associé à une réaction inflammatoire périphérique de l'hôte. Ces kystes, à paroi épaisse et globuleuse, mesurent 1 à 3 mm de diamètre et sont visibles à l'œil nu (Alzieu et al., 2011). C'est un élément de diagnostic important dans la détection de la maladie. Ils ressemblent à de petits points blancs en relief, en forme de tête d'épingle. Au microscope optique, on voit qu'ils sont entourés de cellules inflammatoires mononucléées et de fibroblastes. En périphérie, de manière centripète, différentes structures sont présentes (Figure 4) :

- une capsule kystique, zone hyaline formée de collagène qui confère la forme au kyste
- une membrane intermédiaire correspondant à la membrane de la cellule hôte
- une membrane interne qui délimite la vacuole parasitophore de la cellule hôte



Ces kystes peuvent être retrouvés dans divers tissus mais ils se localisent préférentiellement dans les fibroblastes du derme, la conjonctive et la sclère oculaire, les muqueuses de l'appareil respiratoire supérieur et la muqueuse vaginale (Frey et al., 2013). Ils peuvent également se former au niveau des tubes séminifères ou coloniser des organes internes comme le foie, la rate ou les poumons (Alzieu et al., 2011, Alvarez-Garcia et al., 2014). Ils représentent la forme de persistance du parasite puisqu'ils persistent plusieurs années, n'étant pas détruit par le système immunitaire d'un bovin infecté.

La figure 5 est une image microscopique de kystes à bradyzoïtes de *B. besnoiti* présents dans le derme d'un bovin infecté.

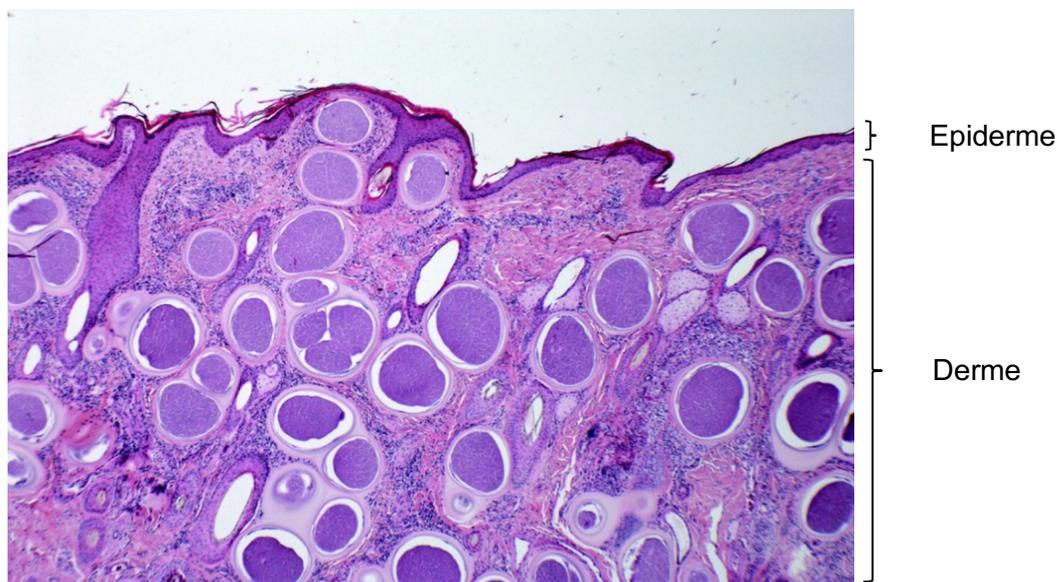


Figure 5 : Vue microscopique d'une coupe histologique de la peau d'un bovin avec de multiples kystes à bradyzoïtes de *B. besnoiti* (MO, coloration HE objx40).

D'après Ryan EG. et al., 2016.

3. Les cycles biologiques

Il existe deux types de cycles pour le parasite *Besnoitia besnoiti*. Un cycle biologique dixène à deux hôtes : intermédiaire et définitif et un cycle monoxène à deux hôtes de la même espèce : le bovin. Or, le cycle dixène, décrit par la suite, n'est pas établi avec certitude notamment pour la connaissance de l'hôte définitif. Le plus important à connaître et comprendre est le cycle monoxène entre bovins.

3.1 *Les hôtes*

Pendant de nombreuses années, le chat domestique a été considéré comme l'hôte définitif de *B. besnoiti* suite aux travaux de Peteshev en 1974 qui aurait mis en évidence des oocystes (forme de reproduction sexuée intestinale du parasite) dans des fecès de chat. Cependant, cette observation n'a pas été confirmée malgré de

nombreuses autres études sur la biologie du parasite *B. besnoiti* (Diesing et al., 1988). Une enquête récente conduite en Espagne par Millan et al., (2012) n'a pas mis en évidence d'anticorps spécifiques de *B. besnoiti* chez plusieurs espèces de carnivores européens : loups, renards, martres, fouines, chats domestiques, chats sylvestres, genettes et mangoustes ichneumons. Ainsi l'hôte définitif de ce parasite demeure encore inconnu.

L'espèce bovine est considérée comme hôte intermédiaire de *B. besnoiti*. En effet, par la formation de kystes à bradyzoïtes persistants, le bovin joue un rôle primordial dans la perennité de la maladie et représente le réservoir majeur du parasite.

Des chercheurs se sont intéressés à l'existence d'autres espèces réservoir domestiques ou sauvages. Il a été montré que le campagnol pouvait être porteur du parasite dans ses tissus (Basso et al., 2011) ; le cerf élaphe ou encore le chevreuil se sont avérés porteurs d'anticorps de *B. besnoiti* à de très faibles taux, dans des zones où la séroprévalence chez les bovins était supérieure à 40 % (Guttierez et al., 2016). Des kystes à bradyzoïtes ont également été retrouvés chez le chevreuil (Arnal et al., 2017). Cependant, même si le portage est possible, ces espèces-hôtes ne constituent pas un réservoir sauvage du parasite et seuls quelques cas sporadiques sont rapportés dans la littérature.

La besnoitiose n'est pas une zoonose. En effet, aucune transmission n'a été observée entre un bovin infecté et l'homme, de même qu'aucune forme clinique n'a été décrite chez ce dernier malgré un contact proche entre les deux espèces (Alzieu et Jacquiet, 2011). De ce fait, on considère à ce jour que la viande bovine porteuse de kystes tissulaires à bradyzoïtes n'est pas une source de contamination pour l'homme. Ainsi, leur présence ne constitue pas un motif de saisie de carcasse à l'abattoir sauf si l'étendue de la zone atteinte est trop importante ou que la viande présente des altérations organoleptiques, une saisie partielle est alors réalisée.

3.2 Les cycles

Même si pour *B. besnoiti* le cycle chez l'hôte définitif n'a jamais pu être mis en évidence, il est supposé que celui-ci fonctionne comme pour les autres coccidies tel que *T. gondii* entre un chat (hôte définitif) et un mammifère ou un oiseau (hôte intermédiaire) (Ferrie, 1984).

L'hôte définitif, en supposant que ce soit le chat domestique, s'infecterait par ingestion de kystes tissulaires (via une proie porteuse de kystes à bradyzoïtes). Le parasite réalise un cycle coccidien digestif avec formation d'ookystes (œuf encapsulé du protozoaire issu de l'union d'un gamète mâle et femelle). Par la suite, des ookystes non sporulés sont libérés dans l'environnement via les matières fécales. La sporulation permet la formation de sporozoïtes (cellules parasites infectant un nouvel hôte) au sein des ookystes qui sont alors qualifiés de sporulés. Ces ookystes sporulés sont ingérés par l'hôte intermédiaire : le bovin ou dans une moindre mesure, les cervidés sauvages. Suite à cette contamination, le bovin fait alors face aux deux formes de parasites : la forme tachyzoïte puis la forme bradyzoïte. A ce stade, les kystes tissulaires et viscéraux se forment et peuvent persister jusqu'à dix ans (Alzieu et al., 2011). Le cycle s'achève lorsque l'hôte définitif s'infeste par ingestion de tissu contaminé (Figure 6).

Cependant dans le cas de *B. besnoiti*, en l'état actuel des connaissances, ce cycle dont l'existence est toujours incertaine en Europe, n'est pas considéré dans la diffusion de la maladie.

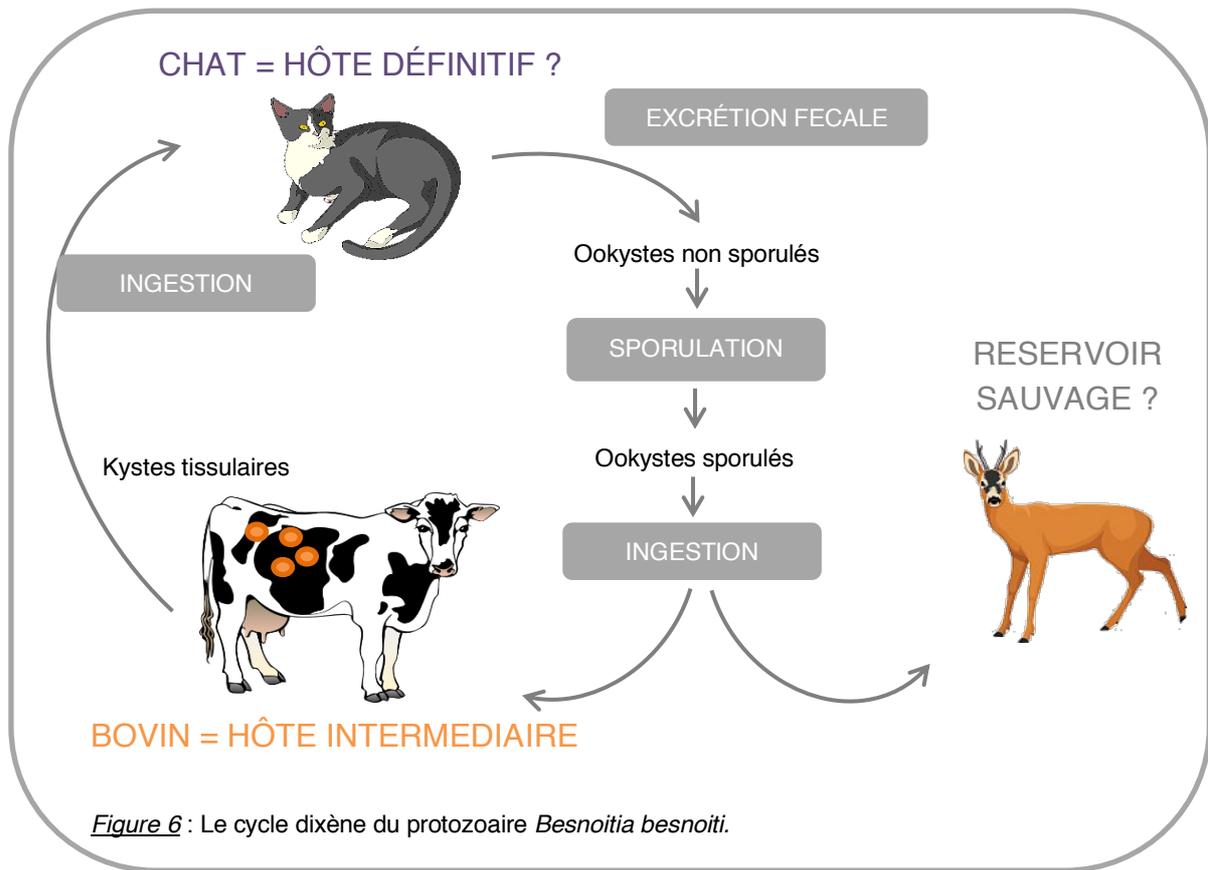
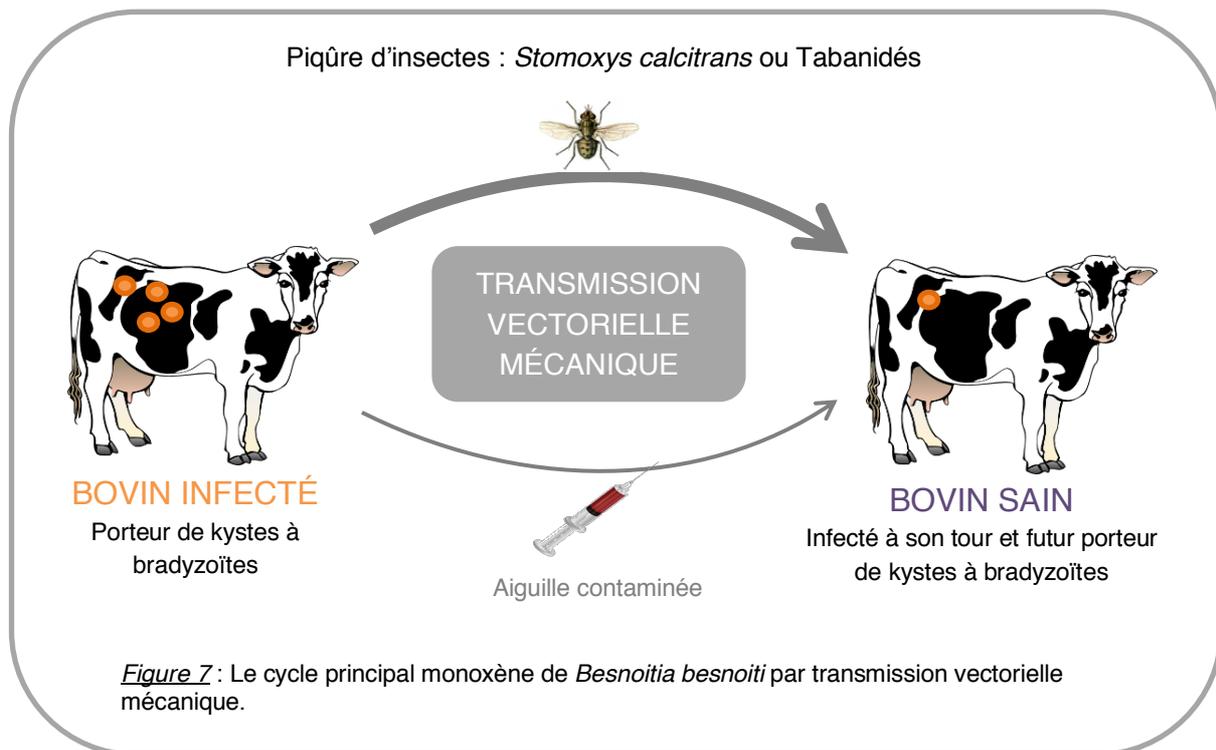


Figure 6 : Le cycle dixène du protozoaire *Besnoitia besnoiti*.

En l'absence d'hôte définitif connu en Europe, on en vient à suspecter un cycle monoxène, de bovin à bovin. Pils en 1960 a mis en évidence le fait que l'injection par voie intraveineuse ou sous-cutanée de la forme tachyzoïte ou bradyzoïte du parasite chez un bovin sain conduit à déclencher la maladie. Ainsi la contamination d'un bovin infecté, porteur de bradyzoïtes dans les kystes ou de tachyzoïtes dans la circulation générale, vers un bovin sain est possible (Diesing et al., 1988). Ce phénomène de transmission est réalisé par des insectes vecteurs hématophages (qui seront décrits en détail dans le chapitre suivant), ou bien par des aiguilles souillées lors d'usage multiples (Alzieu, 1991) (Figure 7).



Il est considéré que la transmission vectorielle permet la diffusion massive de la maladie au sein d'un cheptel (Alzieu et al., 2011). Cette notion est primordiale à comprendre pour cette étude.

Deux autres voies de transmission du parasite ont été envisagées : la transmission verticale et vénérienne.

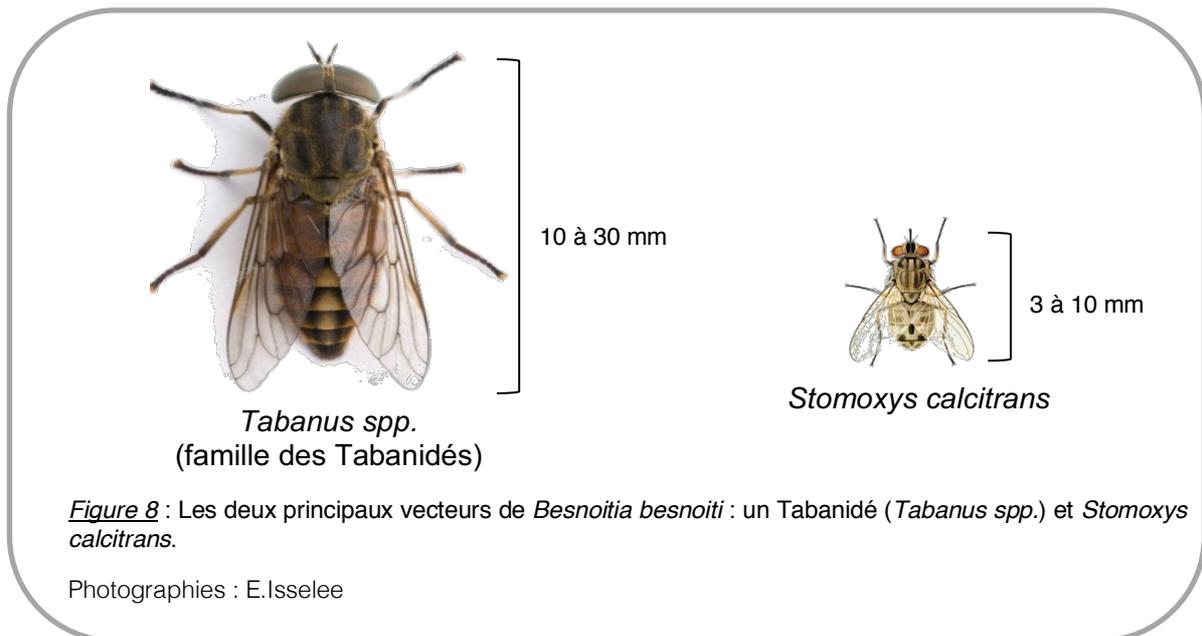
Il a été montré que la transmission d'une mère séropositive à son veau *in utero* était impossible étant donné que la séropositivité du nouveau-né n'est que transitoire durant les quatre à cinq premiers mois, après ingestion de colostrum et jusqu'à disparition des anticorps colostraux (Lienard et al., 2011).

Concernant la voie vénérienne, il semblerait que même si des kystes peuvent être présents dans la muqueuse vaginale d'une vache infectée, la transmission du parasite par le coït est peu probable voire anecdotique (Alzieu et al., 2011). De même, il n'a pas été montré qu'une transmission via le sperme soit possible même si des kystes peuvent être présents au niveau des tubes séminifères du mâle (Esteban-Gil et al., 2014).

3.3 Les vecteurs

Comme vu précédemment, cette maladie est transmise par des insectes hématophages. Les deux types d'insectes vecteurs impliqués dans cette transmission sont de la famille des Tabanidés et des Muscidés avec *Stomoxys calcitrans* (Figure 8). En effet, ces diptères hématophages sont capables, pendant leur repas de sang sur un bovin infecté, de prélever des bryzoïtes présents au niveau des kystes cutanés ou des tachyzoïtes circulants (Lienard et al., 2013) et de les transférer à un bovin sain. C'est la notion de transmission vectorielle mécanique. Ces vecteurs agissent simplement comme une « seringue souillée » sans développement du parasite à proprement dit, comme c'est le cas avec un vecteur biologique.

Il a également été montré, dans de rares cas, que les moustiques (*Culex spp.*, *Aedes spp.*) ou la mouche tsé-tsé (*Glossina spp.*) étaient capables eux aussi de transmettre le parasite (Bigalke et al., 1968).



Le rôle de ces insectes, leur importance ainsi que leurs caractéristiques biologiques dans la transmission de la maladie seront détaillés dans la partie suivante.

IV. Epidémiologie

Le phénomène de transmission vectorielle est essentiel dans la diffusion de la besnoitiose bovine. Certaines caractéristiques propres aux vecteurs sont donc à considérer pour comprendre l'épidémiologie. Quand à l'expression de la maladie, elle est modulée selon des caractéristiques de l'espèce bovine hôte.

1. Facteurs liés à l'hôte et au troupeau

Bien que cela n'ait pas été clairement prouvé, il est décrit depuis longtemps l'influence de l'âge, du sexe ainsi que de la race des bovins comme facteur de réceptivité et de sensibilité face à l'expression clinique de la besnoitiose (Ferrie, 1984).

1.1. *L'âge*

Il est important de différencier la réceptivité des bovins face à la contamination par le parasite et l'expression clinique des animaux. D'après Alzieu et al., (2011) il semblerait que dès l'âge de quatre mois, les veaux soient réceptifs à l'infection par *B. besnoiti* puisque des kystes cutanés auraient été isolés dans leur tissus.

La présence de kystes est une preuve directe de contamination du veau par le parasite mais des anticorps, marqueurs d'infection à *B. besnoiti*, ont également été mis en évidence chez le jeune. D'après Esteban-Gil et al., (2017), les taux d'anticorps retrouvés chez des veaux de moins de six mois prouvent la capacité du parasite à infecter les plus jeunes. Ces anticorps n'étaient pas d'origine maternelle mais bien des marqueurs d'infection nouvelle puisque ils ont été retrouvés chez des veaux issus de mères séronégatives. Cependant, les veaux porteurs de parasites ne déclenchent pas forcément de formes cliniques.

Il semblerait, en zone d'enzootie, que les formes cliniques se rencontrent préférentiellement chez les jeunes adultes (autour de quatre ans). Or ceci n'a été montré qu'une fois, dans une étude conduite par Lienard et al., en 2011, sur 57 vaches laitières où seuls deux formes cliniques (syndrome fébrile et oedème) ont été observées, sur des individus âgés de plus de quatre ans. En revanche, et c'est un fait nouveau et constant, en zone d'émergence, on constate une précocité clinique accrue

chez de jeunes veaux autour du sevrage, dès six à sept mois d'âge (Alzieu et Jacquet, 2016).

1.2. Le sexe

A ce jour, aucune corrélation n'a été prouvée entre le sexe des bovins et leur réceptivité à l'infection (Legrand, 2003). Or en terme de sensibilité, les mâles seraient plus souvent atteints cliniquement, d'une intensité plus importante et avec un taux de mortalité plus élevé que les femelles (Jacquet et al., 2010). Cette sensibilité plus importante chez les mâles aurait des conséquences sur la fonction sexuelle à l'origine d'infertilité et de réforme précoce des taureaux. (Esteban-Gil et al., 2016).

1.3. La race

Il semblerait que la race n'ait pas d'influence majeure sur la réceptivité ou la sensibilité à la besnoitiose du fait que cette maladie a autant été observée sur des cheptels laitiers qu'allaitants.

1.4. L'efficacité du système immunitaire

Face à l'infection à *B. besnoiti*, la réponse immunitaire mise en place est mixte : cellulaire et humorale. De ce fait, toute situation d'immunodépression, physiologique ou non, favoriserait l'expression d'une infection intercurrente (ou latente) de besnoitiose. Il a été décrit une succession de cas cliniques de besnoitiose dans des exploitations où le BVD (virus de la diarrhée virale bovine) circulait de manière intense. De même, une autre étude a montré que des vaches en post-partum, dont l'immunité après vêlage est moins performante, étaient plus à risque de développer une forme clinique si elles étaient contaminées à cette période (Alzieu et Jacquet, 2016).

1.5. La prévalence de l'infection

Il a été constaté qu'en zone d'enzootie, où la maladie persiste depuis plusieurs années, les cas cliniques avérés de besnoitiose sont sporadiques et la

séroprévalence est élevée voire très élevée avec des taux quasiment toujours supérieurs à 50 voire 60 %. A contrario, en zone d'invasion récente, après une première infection et/ou un cas clinique confirmé, la séroprévalence semble s'accroître de manière très rapide, de 20 à 30 % par an pour aboutir à une séroprévalence de l'ordre de 50 à 60 % en 2-3 ans seulement. Il semblerait qu'une situation « d'équilibre » enzootique s'installe progressivement en terme de séroprévalence mais l'apparition de nouveaux cas cliniques sur des animaux de plus en plus jeunes a remis en cause l'espoir d'arriver à cette stabilité enzootique dans des foyers récents d'émergence (Alzieu JP., Jacquiet P., Boulon C., données non publiées).

1.6. La taille du troupeau et les modes d'élevage

De nombreuses études se sont intéressées à l'influence de la densité d'animaux, les modes d'élevage et l'expression de la maladie. Il en résulte que pour des élevages de type allaitant, pratiquant l'estive, l'augmentation du nombre d'animaux tout comme le mélange de cheptels d'origine différente favorise la probabilité de transmission. Pour les élevages allaitants sédentaires, type atelier d'engraissement, c'est le fait d'introduire un bovin porteur lors d'achat qui est un facteur de risque. De plus, la contamination à distance, entre élevages voisins via les insectes piqueurs est possible. Cette notion sera détaillée par la suite.

Enfin, dans les élevages de type laitier, avec des tailles de troupeau plus réduite et un renouvellement constant, il a été observé une allure plus épizootique, sans forcément de raisons précises (Alzieu et al., 2009 ; Legrand, 2003).

2. Epidémiologie analytique

Cette partie détaille plus précisément de l'importance de la transmission vectorielle et plus particulièrement de la corrélation entre la répartition dans le temps et l'espace et les caractéristiques biologiques de ces vecteurs hématophages.

2.1. Persistance de B. besnoiti chez les insectes vecteurs

Les insectes hématophages agissent comme vecteurs mécaniques du parasite entre un bovin infecté et un bovin sain (Lienard et al., 2013). Ainsi, sans

modifications ou multiplication du parasite dans l'organisme de l'insecte, la transmission ne dépend que de la durée de vie du parasite dans les pièces buccales des insectes. Cette durée où le parasite demeure vivant et infectant a été estimée à 48 h selon l'étude de Sharif et al., (2017).

2.2. La notion de repas interrompu

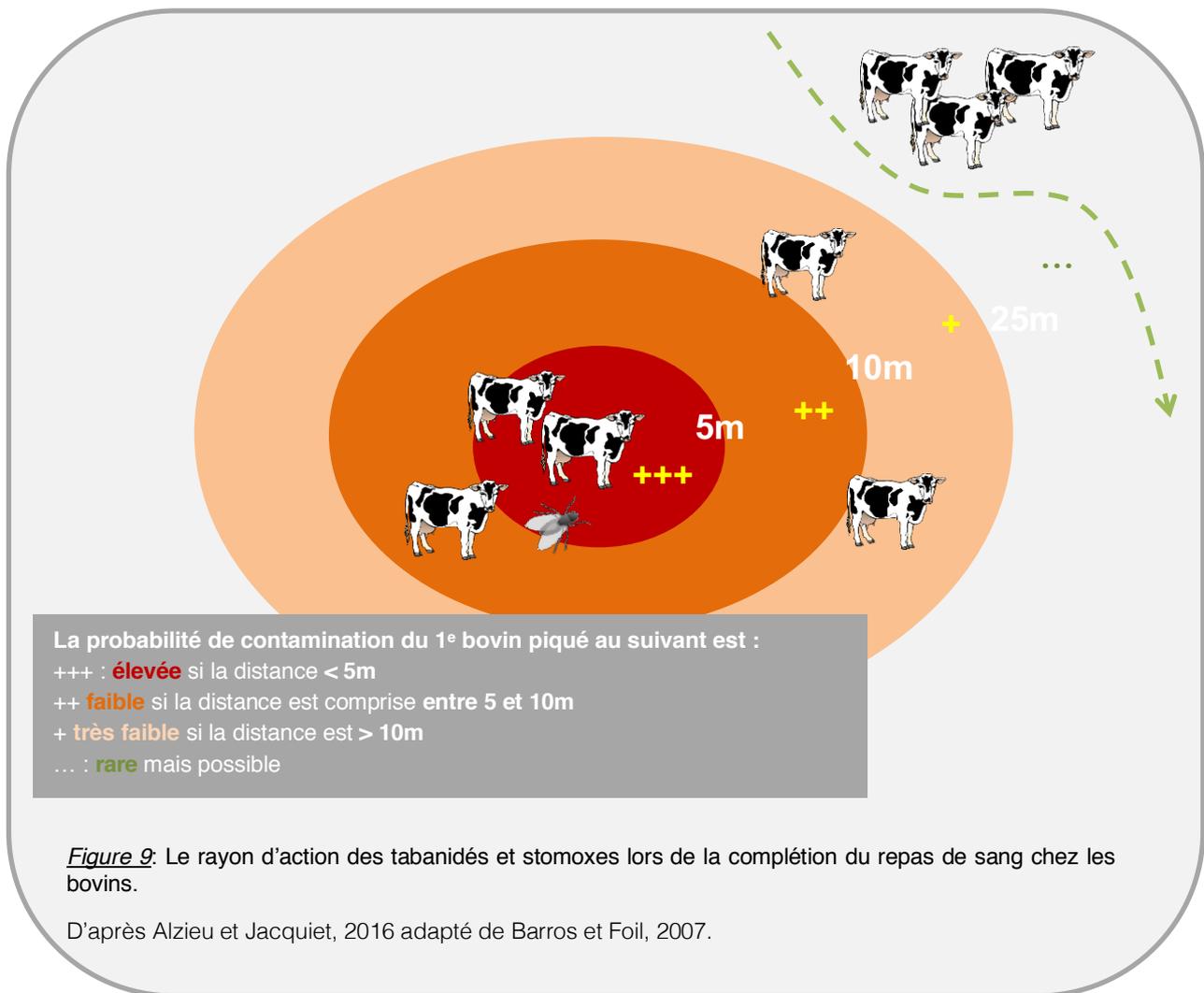
La transmission du parasite *B. besnoiti* est également dépendante du comportement alimentaire des insectes hématophages qui le véhiculent. Il est donc nécessaire que le repas de sang soit interrompu entre l'hôte infecté et le futur hôte contaminé.

Entre taons et stomoxes, il y a quelques différences notables : les taons, dont seules les femelles sont hématophages, induisent une piqûre très douloureuse. Lors du repas de sang, elles peuvent aspirer de 20 à 600 μL de sang en 3 minutes environ (Hollander & Wright, 1980). Pour les stomoxes, mâles et femelles sont hématophages et le repas de sang est moins volumineux : 10 à 15 μL aspiré en 2 à 3 min seulement (Salem et al., 2012) et la piqûre est un peu moins douloureuse.

Cependant, les piqûres induites par ces insectes provoquent une réaction de défense du bovin qui se manifeste par des coups de queue, de tête ou encore un tressaillement des muscles peuciers. Ces réactions lui permettent de les chasser induisant la recherche d'un nouvel hôte à parasiter. Selon une étude au Zimbabwe, un repas complet de stomoxe sur un bovin adulte dure en moyenne 147 s, or seuls 27 % des stomoxes achèvent leur repas d'un trait. La plupart quittent leur hôte avant la fin du repas de sang à cause de son comportement de défense (24 %, temps moyen de 59 s) ou de la concurrence avec d'autres mouches (44 %, temps moyen de 71 s) (Schofield et al., 2002).

Rapidement après cette interruption, l'insecte cherche à compléter et achever son repas de sang. D'après (Barros & Foil, 2007) qui a mené une étude sur le comportement alimentaire de certaines espèces de Tabanidés, la complétion du repas de sang interrompu peut très bien avoir lieu sur un même bovin ou sur un autre à proximité immédiate du premier.

Ces auteurs ont mis en évidence que le rayon de recherche du nouvel hôte peut s'étendre jusqu'à 25 m mais il est le plus souvent estimé entre 5 et 10 m. (Figure 9).



Ainsi la grande fréquence de repas interrompus et la rapidité de recherche d'un hôte à proximité immédiate pour le terminer pourraient expliquer le fait que la besnoitiose diffuse aussi rapidement entre bovins d'un même cheptel.

2.3. Le rôle du vecteur dans la contamination intra et intercheptel

La contamination entre les animaux d'un même cheptel ou de cheptels voisins est liée à la fois au vecteur par sa rapidité à rechercher un bovin pour terminer son repas de sang mais aussi à la densité d'animaux. La promiscuité des bovins d'un même troupeau ou de troupeaux différents favorise hautement la transmission du parasite. C'est la contamination intra cheptel qui est jugée comme dominante dans la diffusion de la maladie.

C'est une des différences avec la maladie de la fièvre catarrhale ovine (FCO) où les insectes vecteurs sont capables de parcourir de grandes distances, par

leur propre vol ou par l'appui du vent, pour transmettre le virus et favoriser la diffusion de la maladie à grande échelle.

Cependant, il ne faut pas sous-estimer la contamination intercheptel de voisinage. Du fait de la persistance du parasite, les insectes peuvent transmettre *B.besnoiti* d'un cheptel infecté à un cheptel voisin sain. Un suivi-épidémiologique mené à partir de 2010 et pendant six ans sur une « zone pilote » (Alzieu et Jacquet., 2016) a permis de mettre en évidence le fait que des bovins d'exploitations voisines (de part et d'autre d'un fil de clôture ou d'une haie) pouvaient se transmettre le parasite.

2.4. La saisonnalité

Longtemps la besnoitiose a été considérée comme une maladie estivale liée à l'activité des insectes hématophages. La plupart des cas cliniques sont observés lors des périodes de fortes chaleurs, de juillet à octobre, ce qui correspond à leur période d'activité maximale. Cependant la maladie connaît désormais une saisonnalité élargie sur toute l'année due à l'activité de *Stomoxys calcitrans*. Une période d'incubation hivernale anormalement longue et une augmentation des populations de stomoxes dès le printemps et en automne, y compris en bâtiment, font que la période d'activité de cette mouche d'étable est étalée sur toute l'année (Alzieu et Jacquet, 2016 ; Jacquet et al., 2014).

2.5. Le comportement trophique

L'activité des stomoxes est diurne et ils passent la quasi-totalité de leur temps sur des supports tels que des murs, fils électriques, poteaux de bâtiment ... ce qui lui vaut son surnom de « mouche d'étable ». Ils ne parasitent les bovins que pour le repas de sang et se nourrissent préférentiellement sur les parties inférieures des membres notamment les membres antérieurs : zone où le pelage est plus fin et où les vaisseaux sanguins plus en surface de la peau (Figure 10). Or ce sont des zones très riches en kystes à bradyzoïtes (Alzieu et al., 2009). Il en est de même pour les tabanidés qui piquent surtout sur les zones à peau fine et poils courts des membres et du ventre (Phelps et Holloway, 1990).



Photo 1



Photo 2

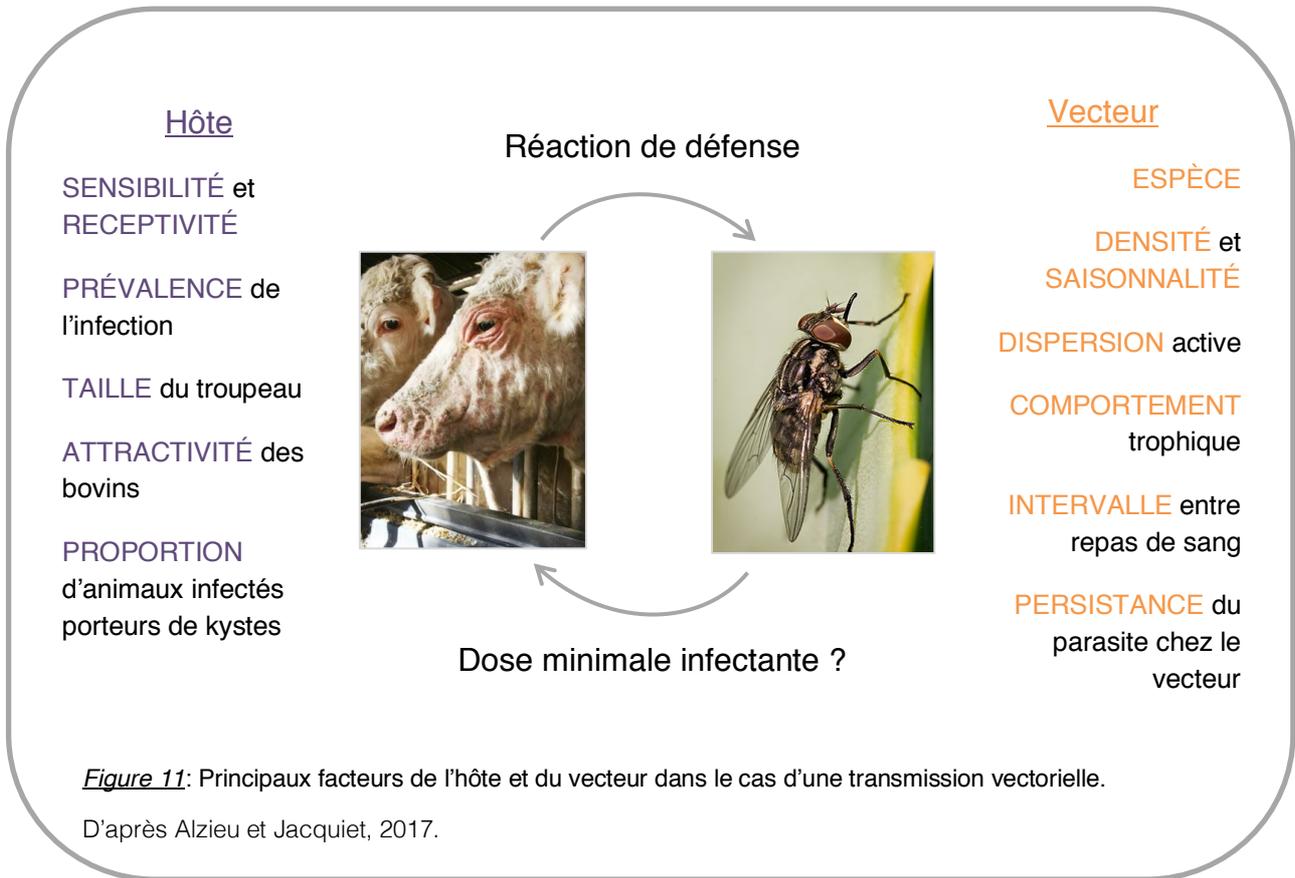
Figure 10: Photo 1 : Multiples stomoxes présents sur les membres antérieurs et le ventre d'un bovin lors du repas de sang ; Photo 2 : Stomoxes se gorgeant au niveau du canon d'un bovin.

Photographies : Pr. Duvallet.

3. Bilan

En résumé, la besnoitiose est une maladie dépendante de la transmission vectorielle mécanique. Pour que celle-ci soit efficace et maximale il est nécessaire que trois facteurs soient réunis : la présence dans le troupeau de bovins infectés dont le sang ou la peau sont riches en parasites, la présence d'un grand nombre d'animaux non infectés et enfin une abondance d'insectes piqueurs (Alzieu et Jacquet, 2016).

La figure suivante (Figure 11) reprend les principaux facteurs propres à l'espèce bovine et aux vecteurs qui influencent l'expression de la maladie dans le cadre d'une transmission vectorielle mécanique.



La besnoitiose est alors considérée comme une maladie d'élevage dépendante de l'activité vectorielle propre aux insectes hématophages. Le comportement trophique, la faible persistance du parasite chez les stomoxes ainsi que leur sédentarisation au troupeau font que la transmission intracheptel est très forte et nuance celle entre les cheptels.

Toutes situations créant des mélanges d'animaux entre troupeaux de statut sanitaire différents, lors de transhumance ou de mélange accidentel est un facteur de risque majeur. A cela s'ajoute la proximité entre un cheptel sain et un cheptel infecté.

Enfin, et c'est un des phénomènes qui permet de comprendre l'émergence de la maladie à plus grande échelle, c'est le déplacement d'animaux porteurs qui a permis une telle expansion et a conduit à la situation actuelle que l'on connaît en France et en Europe (Alzieu et al., 2009). On parle de diffusion de la maladie par « camion ». Avec l'intensification des mouvements d'animaux ces dernières années, l'achat de bovin infecté, non systématiquement contrôlé à l'introduction, représente une source potentielle de contamination pour un troupeau. Les échanges

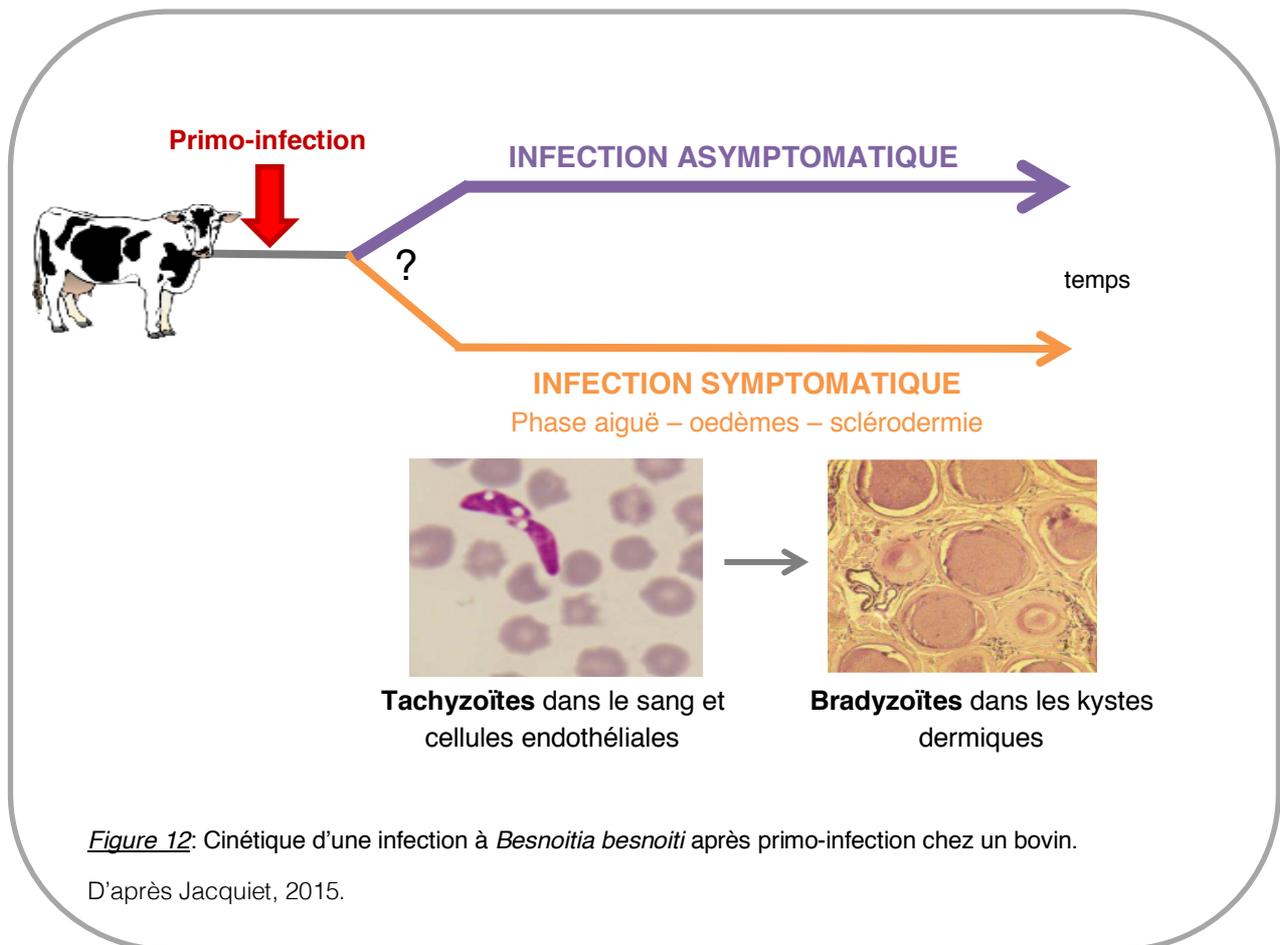
commerciaux mal maîtrisés ont été et sont toujours encore majoritairement à l'origine de l'extension de cette maladie à grande échelle (Alzieu et Jacquet, 2016). La besnoitiose est alors qualifiée de « maladie qui s'achète » (Alzieu et al., 2009).

V. Pathogénie et signes cliniques

1. Modalités d'infection et réponse immunitaire

Dans l'état actuel de nos connaissances, la primo-infection d'un bovin est principalement réalisée par la piqûre d'un insecte hématophage et l'inoculation soit de tachyzoïtes, issus du sang de l'animal donneur en phase aiguë ou de bradyzoïtes, provenant de kystes d'un animal en phase chronique de sclérodermie. Suite à cette primo-infection, deux voies sont possibles. Dans la majorité des cas l'infection est asymptomatique, le bovin reste alors porteur latent de la forme bradyzoïtes. Soit l'infection est symptomatique avec la succession des trois phases cliniques : phase aiguë, d'oedème et de sclérodermie. La multiplication active des tachyzoïtes dans les cellules endothéliales et leur dispersion par voie sanguine est responsable de la phase aiguë. Or, la cause du déclenchement de cette phase reste encore inconnue (Duboisset, 2013) (Figure 12).

Une des hypothèses formulée pour expliquer ce phénomène serait que suite au « switch » de la forme bradyzoïte à tachyzoïte après inoculation du parasite chez l'individu sain ; le passage ou non à l'infection symptomatique serait conditionnée par la quantité de bradyzoïtes inoculés et/ou le statut immunitaire de l'hôte (Alzieu et Jacquet, 2012).



En réponse à l'invasion du parasite, l'hôte met d'abord en place un mécanisme de l'immunité innée en faisant intervenir des monocytes et polynucléaires neutrophiles dans le but de limiter l'expansion de la forme tachyzoïte libre et l'invasion de nouvelles cellules endothéliales (Munoz-Caro et al., 2014 a et b). Par la suite, conjointement au passage de la forme tachyzoïte à bradyzoïte, une réponse à médiation cellulaire spécifique permet de contenir le parasite sous sa forme quiescente dans les kystes pendant plusieurs années voire à vie, sans pouvoir l'éliminer (Dubey et al., 2003).

Un phénomène de réactivation de ces kystes est possible lors de baisse d'immunité de l'individu porteur latent mais l'explication de ce mécanisme demeure inconnue. Ceci permettrait d'expliquer les formes hivernales observées dues à une contamination antérieure, lors de la période de pullulation des insectes hématophages. D'après les travaux de Guttierrez-Exposito (2015a), cette réactivation de kystes est possible.

Dans un second temps, une réponse à anticorps sériques (immunoglobulines G et M) s'installe (Euzéby, 1987) entre 15 et 18 jours post-infection pour atteindre un titre maximal entre 30 et 40 jours (Franc et al., 1987). Ces anticorps, dont l'importance sera primordiale pour le diagnostic, persistent tant que le parasite est présent, même au sein des kystes. La durée de persistance reste, là encore, très variable selon les études : de deux ans au minimum (Lienard et al., 2011) jusqu'à quatre ans pour une vache infectée chronique porteuse de kystes (Alzieu et Jacquet, 2016). De même, la variation du taux d'anticorps n'a pas été clairement établie et fera l'objet de nos observations lors de cette étude.

2. L'infection asymptomatique

Comme évoqué précédemment, l'infection est asymptomatique dans la plupart des cas, de 80 à 95 % des cas (Dorchies et al., 2012). C'est une des difficultés supplémentaires dans la gestion de cette maladie car il ne faut pas sous-estimer la présence d'individus infectés asymptomatiques au sein d'un cheptel.

D'après Esteban-Gil et al., (2014) ayant travaillé sur des taureaux naturellement infectés, certains individus séropositifs infectés subcliniques (sans kystes ou épaissement de la peau lors de l'examen clinique) ont présenté des signaux PCR temps réel (permettant la détection de l'ADN du parasite) positifs sur des biopsies cutanées. Ceci renforce l'idée que tout individu infecté asymptomatique est potentiellement réservoir de parasite, même à faible niveau et présente un risque de contamination des individus sains par transmission vectorielle. Le fait de les détecter et de les réformer le plus rapidement possible est une des mesures permettant de diminuer le risque d'extension de la maladie au sein du cheptel. C'est une des solutions d'assainissement qui sera proposée par la suite.

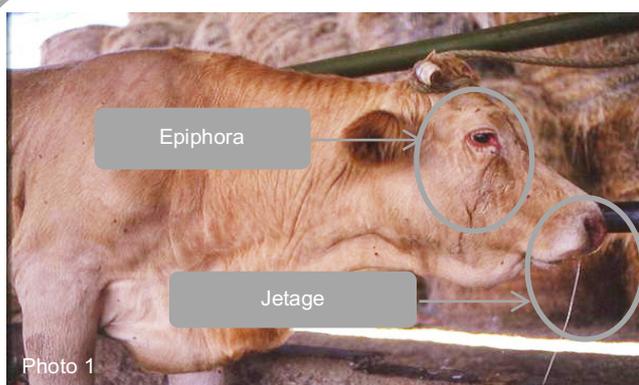
3. Les phases cliniques de l'infection symptomatique

Pour les bovins qui vont développer une forme clinique, le délai d'apparition des premiers signes est très variable : de dix jours à plusieurs mois (Dorchies et al., 2012). Le tableau clinique et lésionnel est caractéristique, en trois phases successives, d'intensité décroissante et variable au cours de l'évolution : la phase fébrile, la phase d'œdème et la phase de sclérodémie (Alzieu et al., 2011).

3.1. La phase fébrile

Après une période d'incubation d'une semaine au minimum, le bovin présente une hyperthermie marquée (40 à 42°C), des essoufflements et une baisse d'état général : rumination inconstante, abattement, anorexie, tachycardie, isolement du reste du troupeau (Alzieu et al., 2007a).

A l'examen externe, la peau du bovin est congestionnée, chaude, sensible voire douloureuse au toucher : hyperesthésie cutanée. Cette modification cutanée est généralisée mais plus marquée au niveau de la tête et du cou avec un aspect « zébré » (Figure 13, Photo 2). A cela s'ajoute une inflammation des muqueuses oculaires et pituitaires responsable d'un épiphora constant, d'une photophobie et d'un jetage séreux filant et abondant (Alzieu et al., 2011) (Figure 13, Photo 1). Cette congestion faciale peut induire un gonflement précoce et des yeux paraissant exorbités qui lui donne une « tête d'hippopotame » (Dorchies et al., 2012) (Figure 13, Photo 3).



Congestion de la face

Figure 13: Signes cliniques caractéristiques de la phase fébrile.

Photographies : Photos 1, 2 et 3 : JP. Alzieu.

Au niveau biologique, la phase fébrile d'une durée moyenne de trois à dix jours est corrélée à la multiplication active des tachyzoïtes dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Cette première phase induit une baisse marquée de l'état général de l'animal mais aussi de sa production (chute de la production laitière ou bien moins bon engraissement) à l'origine d'un impact économique conséquent.

Avec une telle présentation clinique, le diagnostic différentiel reste difficile du fait des symptômes peu caractéristiques. Pourtant plus il est précoce, plus il permet la mise en place rapide d'un traitement symptomatique afin de diminuer l'intensité des signes cliniques. Or, dans les formes les plus graves, malgré la mise en place d'un traitement, le syndrome fébrile et un tableau congestif très accusé conduisent à la mort de l'animal.

3.2. La phase d'œdèmes

Lors de la phase d'œdème, la température rectale redevient normale à subnormale laissant penser à une éventuelle guérison. A l'examen externe, la peau reste chaude, épaisse et douloureuse, d'importants œdèmes sous-cutanés apparaissent au niveau de la tête, des fanons (Figure 14, Photo 1), en régions déclives et à l'extrémité des membres (au niveau du boulet et du canon) s'accompagnant d'une difficulté locomotrice (Alzieu et al., 2011).

Des lésions commencent à apparaître : chez la vache, la mamelle présente une congestion marquée avec une coloration violacée des trayons à leur base (Figure 14, Photo 2). Chez les mâles, les bourses sont hypertrophiées et œdématiées et des zones indurées de nécrose se forment (Figure 14, Photo 3). De plus, une adénomégalie des nœuds lymphatiques superficiels qui drainent ces zones déclives est notable (Dorchies et al., 2012).

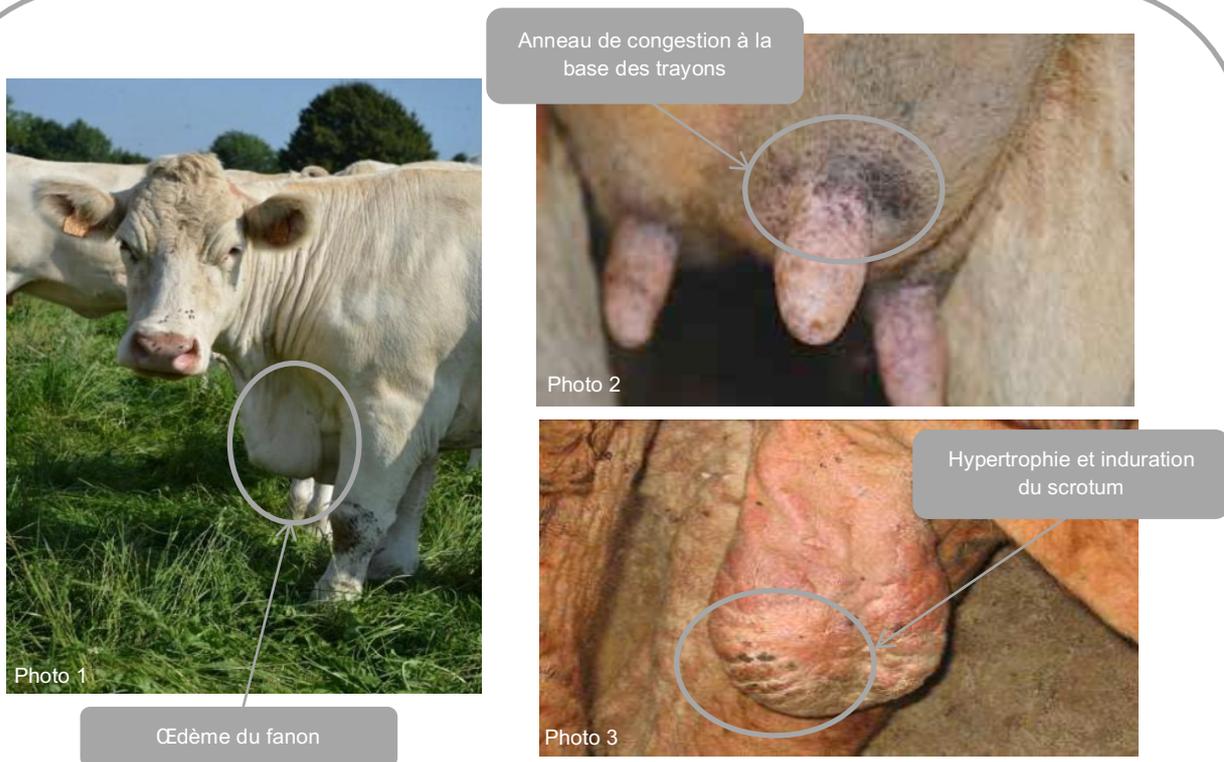


Figure 14: Signes cliniques et lésions propres à la phase des oedèmes.

Photographies : JP. Alzieu.

A ce stade, les animaux perdent de l'état, de l'appétit et la production laitière est durablement affectée. De rares cas d'avortements ont été décrits (Cortes et al., 2005). Cette phase d'œdèmes et de vascularite, secondaire aux thrombis causés par la multiplication massive des tachyzoïtes, dure entre une et deux semaines selon les cas.

3.3. La phase de sclérodermie

Les oedèmes régressent pour laisser place à la phase de sclérodermie. La peau se plisse et s'épaissit, elle devient hyperkératosique avec un aspect cartonnée entre cinq et six semaines après les premiers signes cliniques (Figure 15, Photo 1). Ceci lui donne une impression de peau d'éléphant d'où le terme « *d'éléphantiasis* » pour qualifier cette phase de la maladie (Alzieu, 1991).

La peau perd en élasticité et reste douloureuse à la palpation ce qui empêche les animaux de se déplacer ou de se tenir debout. Une alopecie par plaques et un

squamosis apparaissent (Figure 15, Photo 1). Les zones de sclérodermie les plus atteintes sont les faces latérales de la tête, l'encolure, et les faces internes des cuisses (Alzieu et al., 2011) (Figure 15, Photos 2 et 3).

En phase terminale, des lambeaux de peau nécrosée peuvent se détacher et s'exfolier ; « *la peau s'exfolie comme l'écorce d'un platane* » (Ferrie, 1984). Cette fragilité de la peau peut engendrer l'apparition de crevasses, pouvant se surinfecter, surtout localisées au niveau des membres et des articulations.

Chez la vache, la peau des trayons peut présenter des excroissances, déformant le pis et rendant la tétée et la traite difficile (Figure 15, Photo 4). A ce stade, les animaux les plus touchés s'amaigrissent considérablement et leur production est quasi-inexistante, ils représentent une non-valeur économique. L'euthanasie est souvent la seule alternative.

D'autres, moins atteints peuvent survivre, montre même parfois une amélioration clinique au bout de quelques semaines ou mois et persistent dans cet état de chronicité, marqué par des signes cutanés d'hyperkératose et de dépilation.

C'est également lors de cette phase que des kystes se forment dans la peau mais aussi au niveau du limbe scléro-cornéen (Figure 15, Photo 5). D'une taille d'une tête d'épingle, ces petits nodules blanchâtre de 0,5 mm de diamètre environ sont visibles à l'œil nu dès la cinquième semaine après le début de la phase fébrile. Ils représentent le signe pathognomonique de la phase terminale de la maladie et peuvent persister de longs mois (Franc et Cadiergues, 1999). Or, certains individus peuvent développer ces kystes sans forcément avoir de tableau clinique et lésionnel caractéristique. Ils sont cependant peu utiles à la détection des porteurs sains car leur apparition n'est pas systématique (Bordes, 2009). En moyenne, seuls 25 % des sujets asymptomatiques vont présenter ces kystes sur la sclère (Alzieu et Jacquiet, 2016).

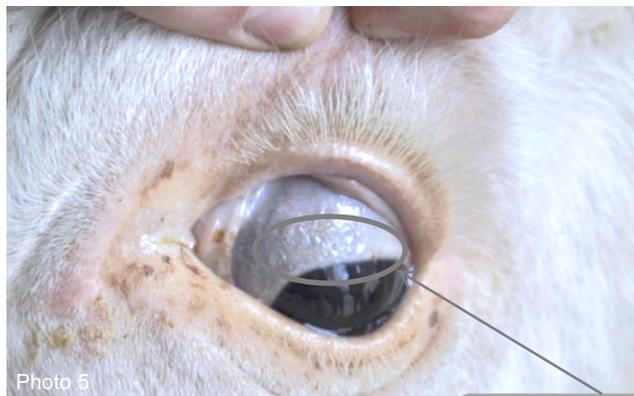


Figure 15: Signes cliniques et lésions de la phase de sclérodémie.

Photographies : Photos 1, 2, 3, 4 JP. Alzieu ; Photo 5 : P. Grange.

4. Les conséquences fonctionnelles

La besnoitiose bovine est une pathologie dont l'impact clinique et lésionnel est important mais également aux lourdes conséquences fonctionnelles notamment sur la fonction reproductrice. Comme vu précédemment, ce sont plus souvent les mâles qui présentent des formes cliniques sévères avec des répercussions sur la fertilité qui peuvent s'avérer dramatiques (Ferrie, 1984).

D'après une étude en zone d'endémie, Alzieu et al., (2011) ont mis en évidence que des taureaux ayant présenté une forme clinique de besnoitiose sont devenus infertiles de façon définitive, même en cas de traitement précoce et adapté.

Cette infertilité est secondaire à l'inflammation testiculaire sévère du stade aigu (Figure 16, Photo 1) provoquant une orchio-épididymite mais aussi à l'invasion de bradyzoïtes formant de multiples kystes. Ils se localisent au niveau du rete testis, de l'épididyme, des tubes séminifères ou encore de la lumière des vaisseaux du plexus pampiniforme (Esteban-Gil et al, 2016) chez des individus infectés chroniques. Des lésions testiculaires irréversibles sont alors observées avec des zones de nécrose et des foyers de fibrose et de calcification (Alzieu et Jacquiet, 2016).

La qualité de la semence est également altérée chez des individus ayant présenté une forme clinique avec une concentration en spermatozoïdes diminuée et des anomalies morphologiques (Figure 16, Photo 2 et 3) par rapport à des individus séronégatifs ou séropositifs asymptomatiques (Esteban-Gil et al., 2016 ; Cortes et al., 2006a).



Cette infertilité a un impact économique majeur pour les éleveurs reproducteurs les obligeant à avoir recours aux inséminations artificielles ou motivant des réformes anticipées de taureaux, parfois de grande valeur génétique.

Chez la vache, l'atteinte de la mamelle (inflammation et lésions induites) rend la traite difficile voire insupportable mais à ce stade, la production est déjà plus que minime (Duboisset, 2013). Enfin de rares cas d'avortements ont été décrits (Cortes et al., 2006b) mais n'ont pas été clairement confirmés. La besnoitiose ne peut pas être qualifiée de maladie abortive mais on peut supposer que les avortements feraient suite aux épisodes fébriles prolongés.

5. Les lésions

Dans l'ordre chronologique d'apparition, les lésions décrites par Pals en 1960 lors d'infection à *B. besnoiti* sont les suivantes :

- des lésions de vascularite du fait de la prolifération des tachyzoïtes dans les cellules endothéliales à l'identique de celles provoquées lors d'infection à *T. gondii* ou *N. caninum* (Alvarez-Garcia et al., 2013). Elles induisent une modification de la perméabilité vasculaire et provoquent les oedèmes.
- au niveau du derme et du tissu conjonctif, un envahissement par les bradyzoïtes qui s'enkystent. Ils gênent la vascularisation cutanée, les tissus souffrent, dégènerent et se nécrosent de même que les follicules pileux d'où le squamosis et l'alopecie observée (Alzieu, 1991).
- des kystes se forment également dans la plupart des muqueuses, la sclère, l'endomètre utérin, le vagin et la vulve (Nobel et al., 1997) mais aussi au niveau testiculaire.
- des lésions irréversibles de fibrose et de nécrose sont retrouvées au niveau des trayons ou des testicules.

6. Evolution et pronostic

Dans le cas de la besnoitiose, plusieurs évolutions sont possibles en fonction du statut de l'animal. Les animaux asymptomatiques ou porteurs latents de kystes n'ayant jamais déclaré de forme clinique peuvent continuer à vivre normalement mais restent un réservoir potentiel de parasite. Ce sont ces individus qui représentent le risque le plus important de contamination pour le cheptel et dont la détection (par séropositivité) et la gestion est indispensable pour maîtriser la maladie.

Pour des formes cliniques avérées, c'est avant tout la précocité du traitement qui conditionne le devenir de l'animal. En effet, il n'y a pas de traitement efficace (cf partie VII.1) permettant de blanchir l'animal mais si la prise en charge médicale a lieu dès l'expression des premiers signes cliniques (avant la phase d'oedème), les chances de guérison clinique et le pronostic vital sont plutôt favorables (Alzieu, 1991).

Dans de rares cas, les animaux ayant manifesté une forme clinique présentent une amélioration spontanée et retrouvent suffisamment d'état pour être engraisés avant la réforme. D'autres demeurent dans un état de chronicité avec une persistance des signes cutanés : hyperpigmentation, squamosis et alopecie.

VI. Diagnostic

1. Diagnostic clinique et différentiel des différentes phases de la maladie

Il est fondamental dans le cas de la besnoitiose que la détection du « cas index » (premier cas clinique de la maladie) soit faite le plus rapidement possible. Pour cela, éleveurs et vétérinaires doivent être capables de reconnaître les symptômes souvent frustrés et peu caractéristiques surtout dans les premières phases d'infection. De plus, il est nécessaire de savoir faire le diagnostic différentiel qui peut s'avérer difficile selon les phases de la maladie.

En phase fébrile, le diagnostic différentiel est délicat car les signes cliniques observés ne sont pas caractéristiques et communs à de nombreuses autres affections. Le tableau suivant (Tableau 1) présente le diagnostic différentiel qui peut-être fait lors de la phase fébrile de la maladie selon les signes cliniques observés et leur intensité.

Tableau 1: Diagnostic différentiel de la phase fébrile.

Maladie	Fréquence relative actuelle	Intensité fièvre	Tachypnée	Congestion de la peau	Jetage nasal séreux
Besnoitiose <i>Besnoitia besnoiti</i>	+++	++++	+++	++++	+++
Coryza gangréneux <i>Ovine herpesvirus 2</i>	(+)	++++	+++	+++	+++
Ehrlichiose granulocytaire bovine <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	++++	++++	+++	+	++
Fièvre catarrhale ovine (phase aiguë) <i>Bluetongue virus</i>	0 à +	+++	++	++	++
Maladie respiratoire infectieuse type broncho-pneumonie infectieuse enzootique (BPIE) <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Manheima haemolytica</i> , virus respiratoire syncytial bovin (BRSV), virus de la rhino-trachéite infectieuse bovine (IBR), <i>Mycoplasma bovis</i>	+(+)	++++	+++	(+)	+++
Photosensibilisation	+	+(+)	+(+)	++++	+

Légende : 0 = absence ; + : léger ; ++ : modéré ; +++ : marqué ; ++++ : très marqué

d'après Alzieu et Jacquet, 2016.

Pour la phase des oedèmes, le diagnostic différentiel est plus simple car les signes observés sont plus caractéristiques (Tableau 2). Il faut surtout distinguer la besnoitiose de l'ehrlichiose granulocytaire bovine à *Anaplasma phagocytophilum* pour laquelle la formation d'oedèmes déclives représente est un des signes caractéristiques, d'où son nom de maladie des « gros pâturons ».

Tableau 2: Diagnostic différentiel en phase des oedèmes.

Maladie	Fréquence relative actuelle	Epaississement et chaleur cutanée sans hyperkératose	Oedèmes déclives
Besnoitiose <i>Besnoitia besnoiti</i>	+++	+++	++(+)
Ehrlichiose granulocytaire bovine <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	++(+)	0	+(+)
Fièvre catarrhale ovine (phase aiguë) <i>Bluetongue virus</i>	+++	+++	++(+)
Photosensibilisation (phase aiguë)	(+)	++	0

Légende : 0 = absence ; + : léger ; ++ : modéré ; +++ : marqué ; ++++ : très marqué

d'après Alzieu & Jacquet, 2016.

Enfin, le diagnostic différentiel en phase chronique est plus aisé (Tableau 3). En effet la présence de kystes et les modifications cutanées comme les dépilations et la sclérodémie sont des signes caractéristiques de la besnoitiose. Il ne peut y avoir de confusion avec les gales extensives parasitaires car il n'y a jamais de prurit lors de besnoitiose. Enfin, les kystes scléaux et présents au niveau de la muqueuse vaginale sont les seuls signes pathognomoniques de cette affection, cependant ils ne sont pas systématiques.

Tableau 3: Diagnostic différentiel en phase de sclérodémie.

Maladie	Hyperkératose et plis cutanés	Dépilation	Prurit
Besnoitiose <i>Besnoitia besnoiti</i>	++++	+++	0
Carence en zinc	+	+++	0
Gales extensive <i>Psoroptes ovis, Chorioptes bovis</i>	++(+)	+	++++

Légende : 0 = absence ; + : léger ; ++ : modéré ; +++ : marqué ; ++++ : très marqué

d'après Alzieu & Jacquet, 2016.

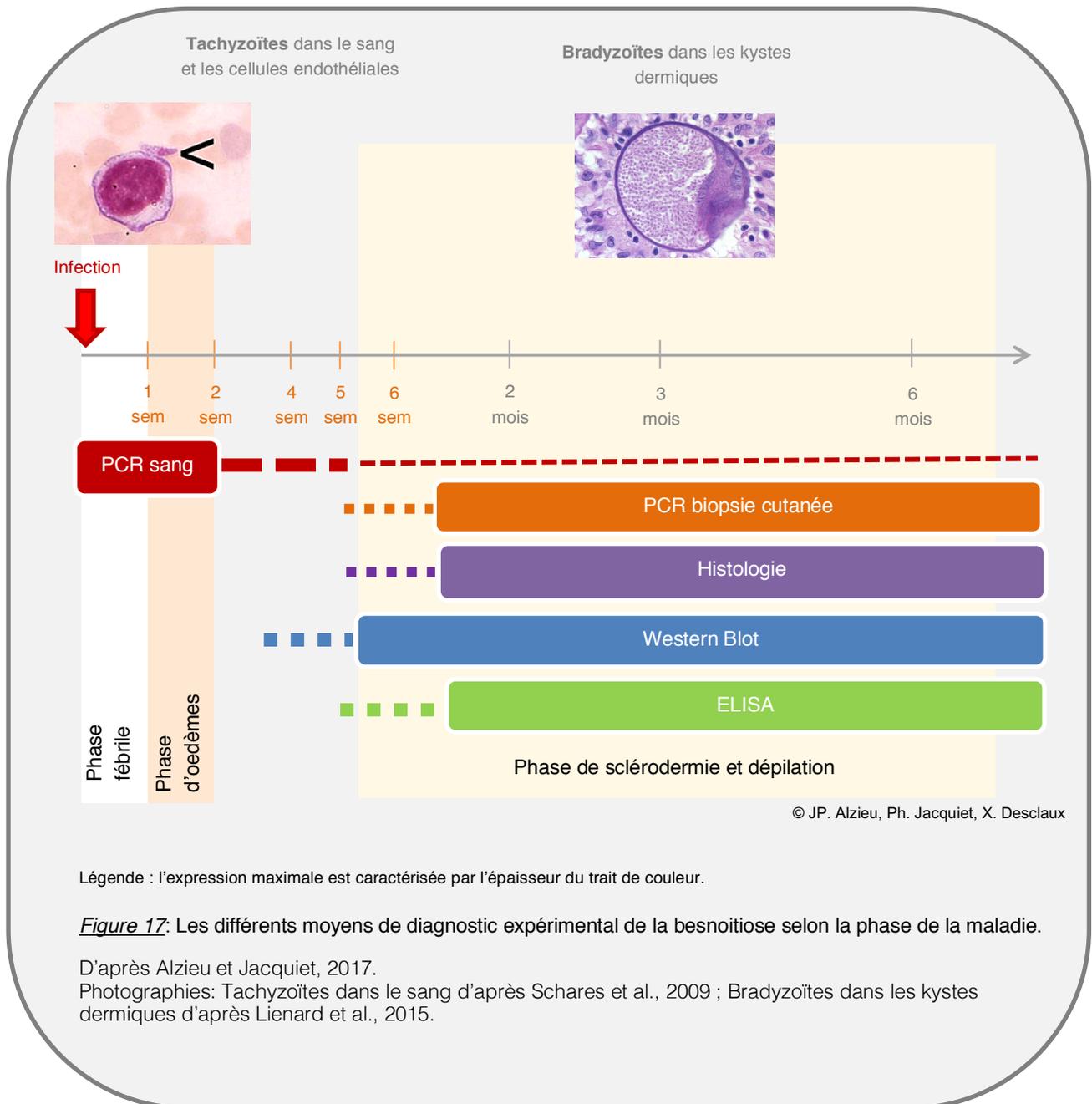
Sur la base d'éléments épidémiologiques, cliniques et lésionnels, lorsque c'est le cas, des suspicions de besnoitiose sont émises plus ou moins facilement. Cependant la confirmation d'un cas par le diagnostic de laboratoire est nécessaire afin d'avoir une évaluation de « l'intensité » de l'infection au niveau du cheptel.

La partie suivante détaille donc les différentes possibilités diagnostiques qui peuvent être mise en œuvre selon la chronologie de la maladie.

2. Diagnostic de laboratoire

De multiples moyens de diagnostic expérimental de la besnoitiose peuvent être utilisés. Ils permettent soit de déceler directement le parasite ou son ADN, on parlera de tests directs ou bien de détecter des marqueurs de sa présence, par des tests indirects, et notamment les anticorps formés par le système immunitaire en réponse d'une infection. Tous ne peuvent pas être utilisés à n'importe quelle phase de la maladie et il est important de connaître la méthode la plus adéquate à utiliser selon l'évolution ou selon les objectifs recherchés : confirmer un cas clinique ou détecter un porteur sain.

La figure 17 résume l'ensemble des moyens de diagnostic expérimental utilisables selon l'évolution de la maladie afin de détecter le parasite sous ses deux formes (tachyzoïtes ou bradyzoïtes) ou les anticorps, marqueurs d'infection.



2.1 Mise en évidence directe du parasite

Le diagnostic précoce d'un cas clinique est primordial pour envisager un traitement symptomatique et améliorer le pronostic à la fois vital et économique de l'animal. De plus, lors des premières phases cliniques, c'est la forme tachyzoïte qui prédomine dans le sang et les cellules endothéliales. Ainsi la mise en évidence directe du parasite par PCR semble être la méthode diagnostique la plus appropriée (Alzieu et Jacquet, 2012).

2.1.1 Détection de l'ADN parasitaire par PCR (Polymerase Chain Reaction).

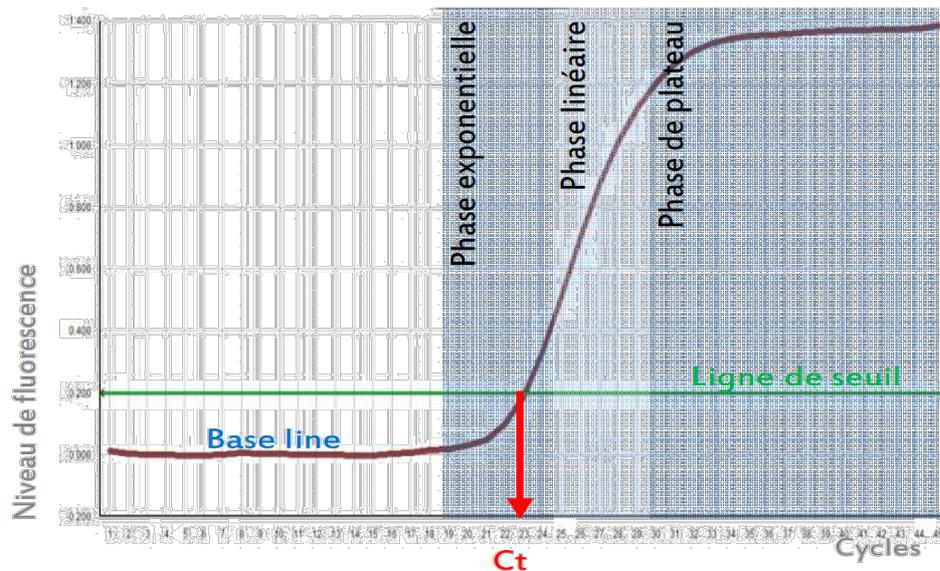
La mise en évidence de *B. besnoiti* peut se faire par le diagnostic moléculaire de son ADN par PCR conventionnelle, temps réel ou appelée également qPCR : PCR quantitative.

C'est au Portugal d'après les travaux de Cortes, en 2006, que le premier fragment d'ARN ribosomal de *B. besnoiti* a été utilisé pour un test PCR (Cortes et al., 2006b). Il s'agit du fragment ITS-1 pour « *internal transcribed spacer 1* ». Cette méthode consiste à amplifier l'ADN du parasite présent dans les échantillons analysés d'un animal éventuellement contaminé. Pour cela, des amorces complémentaires du fragment du gène codant pour le fragment ITS-1 de l'ARN ribosomal ont été dessinées et sont utilisées dans les réactions de PCR pour initier les cycles d'amplification (Schaes et al., 2011a, b, 2013).

Cette technique de détection peut aujourd'hui être utilisée sur différents types de matrices : du sang sur tube EDTA (anticoagulant) mais également des biopsies cutanées (dont la technique sera détaillée dans la partie II.2) ou encore des écouvillons vaginaux (Alvarez-Garcia et al, 2013 ; Schaes et al, 2013).

Selon le contexte, cela peut permettre à la fois de détecter des individus lors des phases précoces (syndrome fébrile et phase des œdèmes) notamment par PCR temps réel (qPCR) (Schaes et al, 2011b) mais également ceux en phase chronique, porteurs de kystes à bradyzoïtes.

En France, nous disposons d'un test PCR temps réel : Adiavet™ Besnoitia Real-Time (BIOX, France) permettant de détecter l'ADN de *B. besnoiti* (Figure 18). Par expérience, il semblerait qu'un résultat positif de ce test sur un prélèvement de sang permette de confirmer une suspicion clinique de besnoitiose aiguë alors qu'un résultat négatif ne permet pas de l'exclure. Des résultats négatifs en PCR temps réel ont été obtenus chez des animaux qui ont présenté une séroconversion peu de temps après l'apparition de signes cliniques de phase aiguë (Alzieu et Jacquet, 2017). Ceci laisse à penser que la forme tachyzoïte n'est pas présente de manière constante lors de la phase aiguë de la maladie.



Légende : La ligne de base (Base line) correspond au bruit de fond de la fluorescence observée pendant les premiers cycles de l'amplification ; la courbe d'amplification correspond à la courbe de fluorescence en 3 phases (exponentielle, linéaire et de plateau) ; la ligne seuil est placée au-dessus de la ligne de base dans la phase exponentielle de la courbe d'amplification ; le cycle seuil Ct (thershold cycle) correspond pour l'échantillon testé à l'abscisse du point d'intersection entre la courbe d'amplification et la ligne seuil.

Figure 18: Exemple de courbe d'amplification obtenue pour une analyse PCR temps réel (ou qPCR : PCR quantitative) d'un échantillon donné.

Photographie : biox.com

L'analyse PCR à partir de biopsies cutanées sur des bovins infectés en phase chronique (sclérodermie et dépilations nettes), montrent des résultats sans équivoque. D'après les observations de Alzieu et Jacquet (2017), les valeurs de Ct (nombre de cycle d'amplification nécessaire pour détecter l'ADN) sont le plus souvent très faibles ($Ct \leq 20$). Il y a besoin de peu de cycles d'amplification pour que l'ADN soit détecté ainsi on peut dire que la quantité d'ADN parasitaire est élevée dans ces échantillons de peau (Alzieu et Jacquet, 2017).

2.1.2 Techniques d'histopathologie

L'histologie a été un des premiers examens complémentaires utilisé pour mettre en évidence le parasite (Bigalke, 1968 ; Besnoit and Robin, 1912).

Rapidement, il s'est révélé être un examen de choix afin de confirmer un cas infecté chronique par la détection du parasite sous sa forme bradyzoïte dans les kystes. A partir de plusieurs types de prélèvements, une mise en évidence du parasite est possible : biopsie cutanée ou par raclage du derme, de la muqueuse vaginale ou de la sclère où les kystes à bradyzoïtes sont macroscopiquement visibles (Sannusi, 1991 ; Rostaher et al, 2010).

Les échantillons sont alors séchés et fixés au méthanol ou formaldéhyde tamponné et colorés par la coloration au Giemsa et/ou Hemalun Eosine (Sannusi, 1991 ; Rostaher et al, 2010). Après un raclage, le prélèvement est écrasé entre lame et lamelle et traité de la même manière que les biopsies cutanées. Le diagnostic de certitude est obtenu si la structure caractéristique des kystes à bradyzoïtes de *B. besnoiti* ou de la forme bradyzoïte est identifiée (Jacquet et al, 2010) (Figure 19).

Les kystes cutanés peuvent également être détectés par immunohistochimie (IHC) en utilisant des anticorps polyclonaux spécifiques de *B. besnoiti* de la forme tachyzoïte ou bradyzoïte ainsi que des anticorps monoclonaux. Or, elle nécessite un laboratoire spécialisé d'où son utilisation en recherche plutôt pour l'étude des lésions ou lors d'infection expérimentales (Frey et al., 2013 ; Langenmayer et al., 2015)

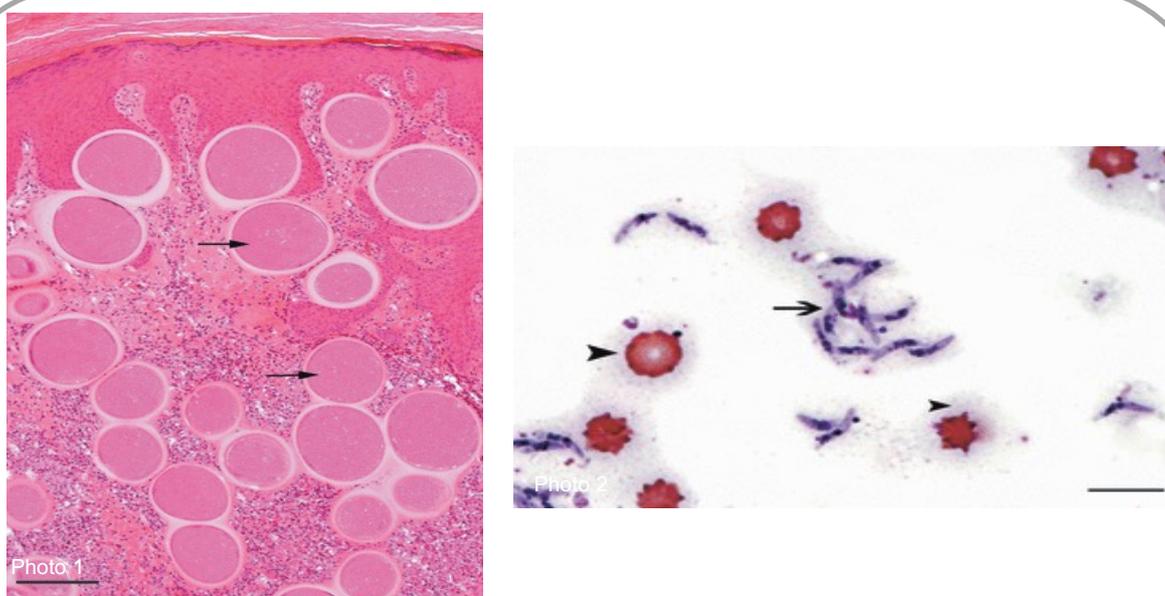


Figure 19: Photo 1 : Observation microscopique de kystes à bradyzoïtes (→) de *B. besnoiti* dans une biopsie cutanée (HE, échelle 200µm). Photo 2 : Observation microscopique d'un frottis vaginal de vache avec présence de bradyzoïtes (→) et des érythrocytes (Giemsa, échelle 10µm)

Photographies : d'après Rostaher et al, 2010.

Certaines notions importantes sont à prendre en compte pour l'examen histopathologique :

- le diagnostic n'est possible qu'en moyenne cinq à six semaines après l'infection du fait de l'apparition tardive des kystes à bradyzoïtes (Alzieu et al., 2010).
- comme évoqué précédemment, les kystes à bradyzoïtes ne sont pas présents chez tous les individus infectés (25 % des individus infectés avec des kystes scléreaux uniquement d'après l'étude d'Alzieu et Jacquet (2011)).
- la répartition des kystes n'est pas homogène chez l'individu atteint et selon le site de prélèvement (Basso et al, 2013 ; Dubey et al, 2003 ; Schares et al, 2016). Il a été récemment établi, selon l'étude de Schares et al (2016), que le lieu optimal pour détecter le parasite par PCR sur biopsie cutanée d'un individu infecté chronique est la base de la queue, les membres postérieurs (partie distale) et antérieurs (partie moyenne) le mufle ou encore les oreilles.

Pour la forme tachyzoïte, d'après la littérature, elle n'a été que très rarement visualisée par examen histopathologique, à partir de frottis sanguin ou de biopsie cutanée (Bigalke 1968, Gollnick et al, 2015). Ce sont plutôt les lésions induites de vascularites liées à la multiplication du parasite qui sont observées (Langenmayer et al, 2015).

2.2 Mise en évidence des marqueurs d'infection par sérologie

Suite à une infestation par le parasite, la réponse immunitaire induit, dans un second temps, la production d'anticorps spécifiques marqueurs de l'infection. Ces anticorps vont alors être recherchés par sérologie. Pour cela, différentes méthodes sont actuellement disponibles.

Neuman en 1972, a été le premier à développer un test d'immunofluorescence indirecte (IFI) en utilisant des antigènes de la forme tachyzoïte obtenus à partir d'ascite de la cavité abdominale de gerbilles infectées. Par la suite, de nouvelles techniques d'IFI ont été élaborées et rapidement les premiers tests ELISA et Western Blot ont été standardisés, utilisant la forme tachyzoïte produite à partir de culture cellulaire (Goldman and Pipano, 1983 ; Janitschke et al., 1984 ; Shkap et al., 1984, 2002).

2.2.1 L'immunofluorescence indirecte (IFI)

Ce test repose sur la mise en évidence de complexes antigène-anticorps primaires à l'aide d'un anticorps secondaire dirigé contre ce complexe primaire, couplé à un fluorochrome pour une révélation colorée (Figure 20).

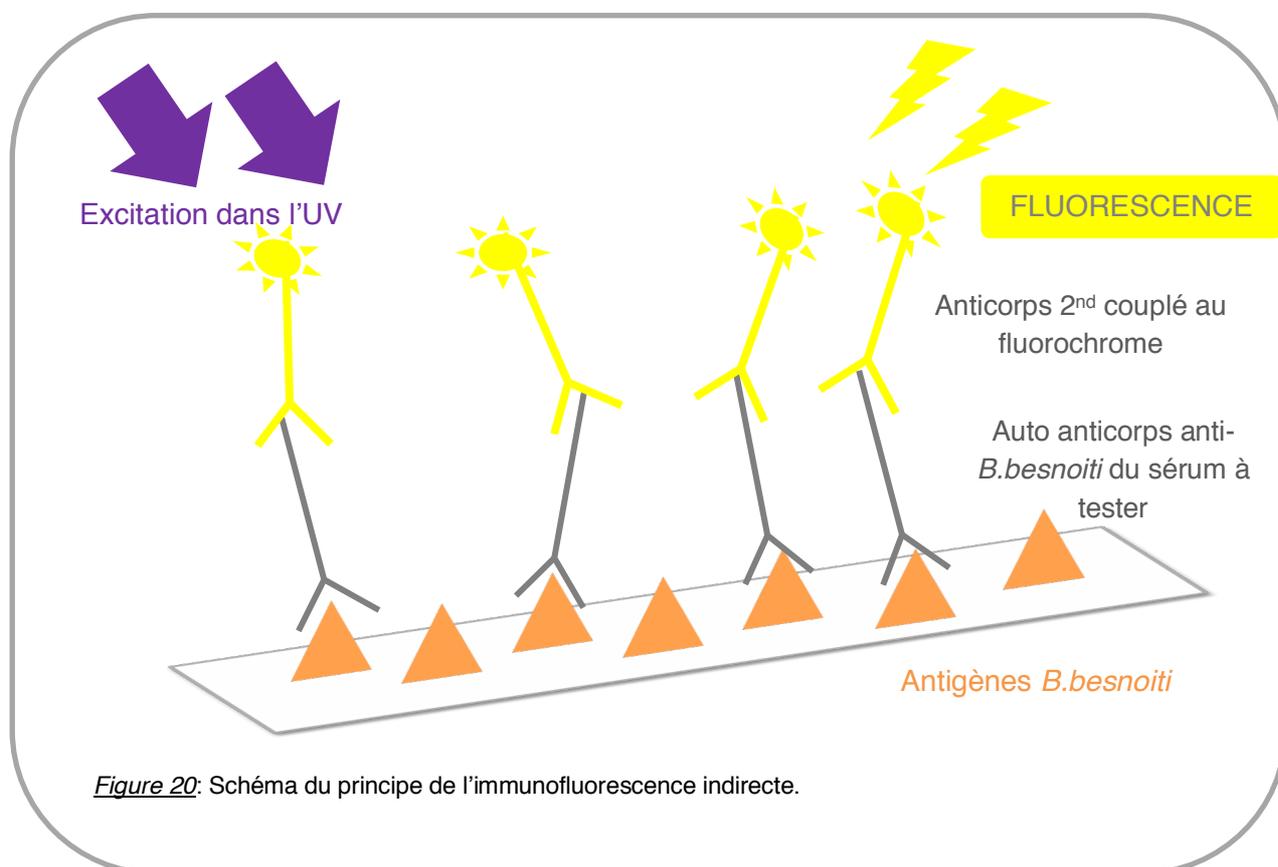


Figure 20: Schéma du principe de l'immunofluorescence indirecte.

Les tachyzoïtes (représentant l'antigène parasite) sont fixés sur une lame sur laquelle est déposé le sérum de l'animal à tester. La formation de complexes antigène-anticorps a lieu si des anticorps dirigés contre le parasite sont présents dans le sérum du bovin. Après lavage, les anticorps secondaires marqués du fluorochrome et dirigés contre ces complexes antigènes-anticorps sont ajoutés. Si l'animal est séropositif (porteur d'anticorps anti-*B. besnoiti*) une fluorescence est émise et visualisée par un microscope UV (Figure 21).

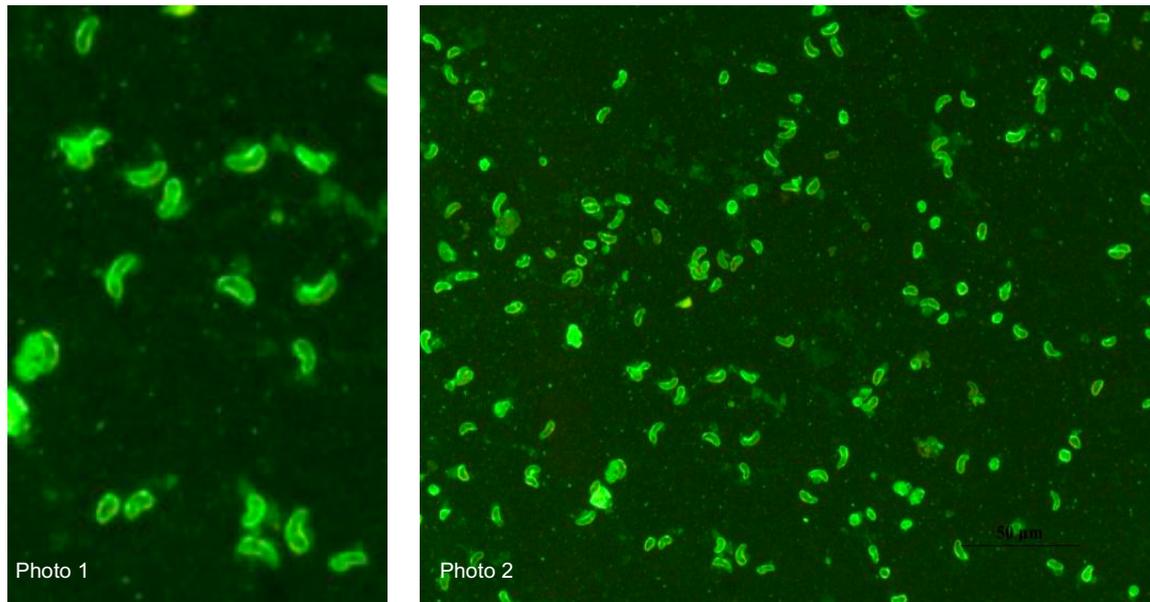


Figure 21: Observation de tachyzoïtes sur une lame « témoin positif » au microscope à UV par technique d'immunofluorescence indirecte à la dilution 1 :200.

Photo 1: obj x 1600 ; Photo 2 : obj x 400.
 Photographies : d'après Lenfant, 2013

Selon les auteurs, le seuil de positivité de cette technique est variable, d'une dilution 1:16 à 1:200 (Franc et Cadiergues, 1999 ; Cortes et al., 2006b ; Fernandez-Garcia et al, 2009b ; Lenfant 2013). En conditions expérimentales, il a été établi que la détection d'anticorps par cette méthode peut se faire dès 10 jours après injection en intraveineuse du parasite et dès 22 jours après injection sous-cutanée (Janitschke et al., 1984).

Cette technique étant basée sur la détection d'antigènes de surface, présents chez d'autres Sarcocystidae, des réactions croisées ont été observées notamment avec des anticorps anti-*N. caninum* à la dilution 1:64 et 1:100 (Shkap 2002 ; Schares et al., 2010). Or, Lenfant (2013) a montré qu'avec une dilution de 1:200, il n'y avait quasiment plus de réactions croisées possibles et que la sensibilité et spécificité de cette technique était respectivement de 91,8 et 100 %.

Initialement, l'IFI était considérée comme la méthode de référence cependant elle est semi-quantitative, donc moins précise. Elle est également dépendante de l'expertise et de l'expérience de l'observateur (Cortes et al., 2014). De ce fait, elle n'est pas recommandée pour un diagnostic de routine mais plus fréquemment utilisée dans le domaine de la recherche (Alzieu et Jacquet, 2017).

2.2.2 La sérologie ELISA : Enzyme Linked Immunosorbant Assay

Le diagnostic sérologique par la méthode ELISA repose sur la détection des anticorps anti-*B.besnoiti* que l'animal synthétise en réponse à l'infestation parasitaire (Cortes et al., 2006b). Elle se fait de manière identique au diagnostic ELISA réalisé pour la néosporose à *N. caninum* (Gottstein et al., 1999).

Le sérum de l'animal à tester est directement mis en contact avec des antigènes du parasite. Ces antigènes sont des antigènes de tachyzoïtes solubles et totaux pouvant induire des réactions croisées avec les anticorps spécifiques anti-*N. caninum* et anti-*Sarcocystis spp.* (Schaes et al., 2011a ; Garcia-Lunar et al., 2013).

Les tachyzoïtes sont cultivés in vitro, purifiés à l'aide de colonne de chromatographie puis lysés. Les antigènes totaux ainsi obtenus sont déposés au fond de puits de plaques de microtitration. Si l'animal est séropositif, des complexes immuns anticorps-antigènes se forment comme dans le cas de l'IFI. Après un premier rinçage, des anticorps secondaires couplés à une enzyme sont ajoutés au mélange et à l'issue d'un deuxième rinçage, le substrat de l'enzyme est ajouté. C'est l'émission d'un signal chromogénique quantifié par spectrophotométrie qui démontre que la réaction enzymatique a eu lieu et révèle la présence de ces complexes immuns.

Aujourd'hui en France, deux tests ELISA sont disponibles sur le marché : le PrioCheck Besnoitia Ab2.0® (PRIONICS, Suisse) et l'ID Screen Besnoitia Indirect® (IDVET, France) disponibles sur sérum.

D'après les travaux de Garcia-Lunar et al., (2013), ces tests ont révélé leur efficacité par rapport à tous ceux présents sur le marché européen. En réalisant une étude comparative, ils ont mis en évidence le fait qu'ils présentent tous deux une très bonne sensibilité et spécificité respectivement de 100 et 98,8 % pour le PrioCheck

Besnoitia Ab2.0® et 97,2 et 100 % pour l'ID Screen Besnoitia Indirect®. Même s'ils ont de bons résultats, les défauts de ces tests doivent être pris en compte selon la situation épidémiologique de l'élevage dans lequel on souhaite l'appliquer.

Il est donc possible d'obtenir soit des faux-positifs avec le Priocheck Besnoitia Ab2.0® soit des faux-négatifs avec l'ID Screen Besnoitia Indirect® (Alzieu et al., 2012). Vu la possibilité de diffusion massive de la maladie à partir d'un individu infecté sur l'ensemble d'un cheptel, on ne peut se permettre de laisser passer un animal positif. Un autre test complémentaire sera nécessaire.

Il faut également prendre en compte le choix de la valeur seuil qui modifie considérablement les résultats de ces tests (Sahun, 1998). D'après des expérimentations de terrains avec le diagnostic Priocheck Besnoitia Ab2.0®, les conclusions suivantes ont été émises :

- Il existe une faible proportion d'animaux dont les résultats sont proches du seuil de positivité. Ceci est probablement dû à des réactions croisées avec *N. caninum* qu'il faut alors confirmer avec un test de référence : le Western Blot (cf partie VI. 2.2.3) (Alzieu et al., 2011).
- la présence de kystes à bradyzoïtes (cutanés ou scléaux) assurent une stimulation antigénique permanente génératrice d'une réponse à anticorps entretenue et importante (Lienard et al., 2011 ; Schares et al., 2011a). Mais à l'heure actuelle on peut se demander s'il y a une relation de proportionnalité entre l'intensité de la réponse en anticorps et la richesse du derme en kystes ?
- un test positif n'est observable qu'au minimum trois semaines après le début des premiers signes cliniques.

Un autre test est disponible sur le marché européen, l'INGEZIM BES 12.BES.K1® (INGENASA) mais ces résultats sont moins bons que les tests disponibles en France avec une sensibilité de 97,2 % et spécificité de 93 % (Garcia-Lunar et al., 2013).

Plus récemment, deux nouveaux tests ELISA ont été élaborés : l'Apure-BbELISA® par l'équipe allemande de Schares (2013) et le BbSALUVET ELISA 2.0® qui présentent d'excellents résultats en termes de sensibilité et spécificité. Ils seraient capables de détecter l'infection à un stade plus précoce : entre sept et huit jours après le début de la phase fébrile (Scharès et al., 2013).

Le diagnostic par la méthode ELISA est recommandé pour le diagnostic de troupeau étant donné qu'il est facile à mettre en œuvre et peu coûteux. C'est une technique de choix pour établir la séroprévalence à l'échelle du troupeau ou d'un territoire dont on veut connaître la situation face à la besnoitiose. Cependant, dans des zones indemnes ou de faible prévalence il sera nécessaire d'associer un autre moyen diagnostique plus spécifique comme le western blot.

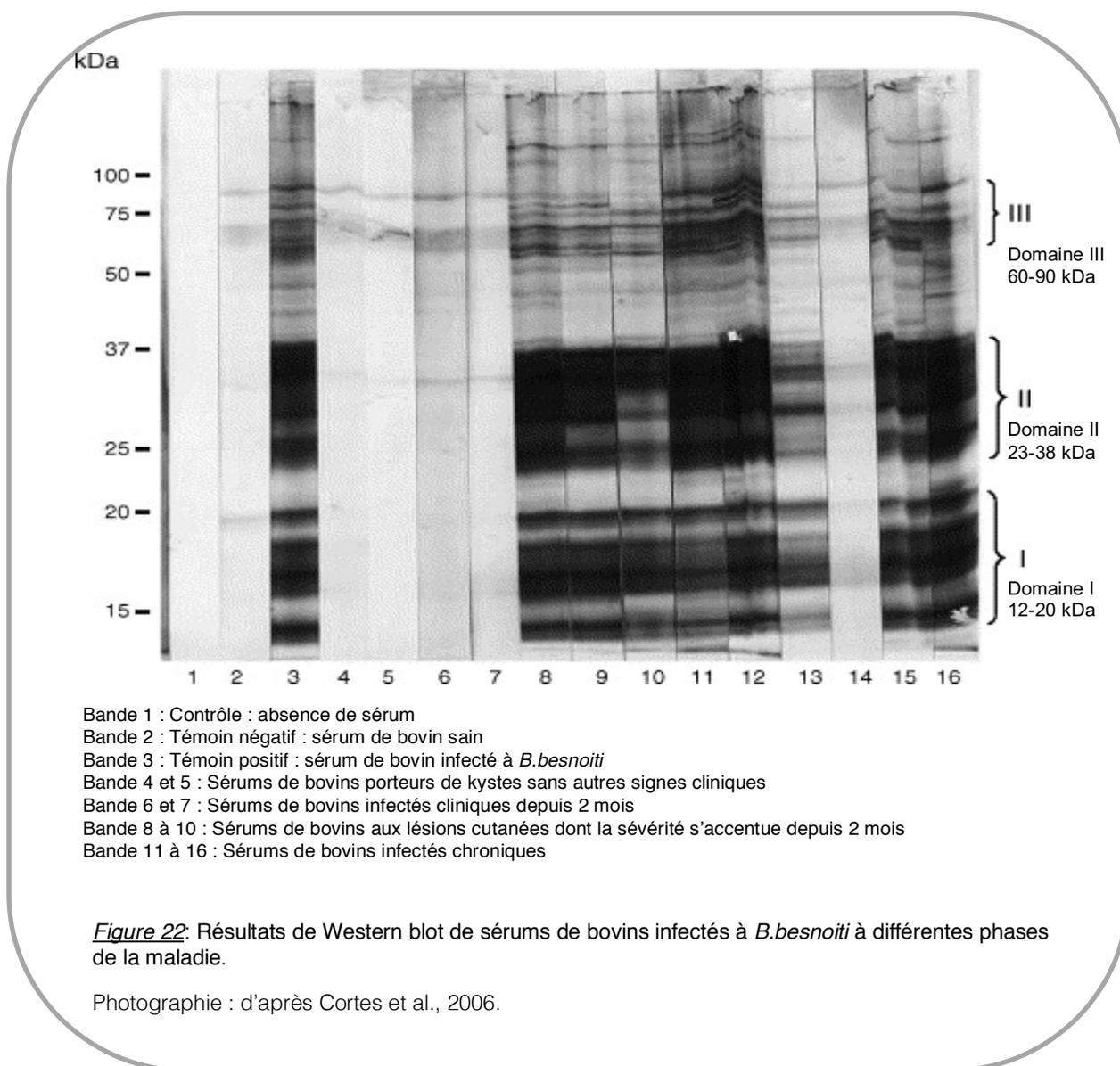
Pour déterminer depuis combien de temps un cheptel est infecté, un test ELISA basé sur l'avidité des anticorps a été également développé. Selon l'étude de Schares et al., (2013) des valeurs de faible avidité seraient révélatrices de séroconversion récente et donc d'une infection primaire récente. Or, il semble que la cinétique des valeurs d'avidité diffère entre animaux. Des variations d'avidité ont été observées 32 jours après séroconversion (chez un animal n'ayant présenté aucun signe de besnoitiose aiguë) et entre 83 à 145 jours après séroconversion (chez des animaux ayant présenté une besnoitiose aiguë clinique). Ils en ont conclu que la maturation des immunoglobulines G était plus lente que le développement du kyste tissulaire mais n'ont pas prouvé de corrélation entre une forte avidité et l'apparition des kystes. Pour le moment, l'utilité de ce test ELISA dans les études épidémiologiques reste à clarifier.

Un dernier test ELISA sur lait a été mis sur le marché depuis 2017. Par son excellente corrélation avec l'analyse sur sérum, l'ELISA sur prélèvement de lait individuel se révèle être un très bon outil de diagnostic. Sur lait de mélange, il doit être considéré comme un indicateur et utilisé à intervalle réguliers. Il a montré de très bonnes performances en dépistage de cheptels à séroprévalence supérieure à 50 %. Ainsi cet outil sur cette nouvelle matrice permet de mieux connaître la situation des cheptels laitiers (Alzieu et Jacquet, 2019)

2.2.3 Le Western Blot (WB)

La méthode du Western Blot, aussi appelée Immunoblot, est le « gold standard » au niveau européen dans le diagnostic sérologique de la besnoitiose bovine (Cortes et al., 2006b ; Garcia-Lunar et al., 2013).

Pour la réalisation de ce test, différentes étapes sont nécessaires. Une culture *in vitro* de la forme tachyzoïte permet d'obtenir des antigènes qui seront séparés par électrophorèse des protéines et transférés sur une membrane de nitrocellulose. Les étapes d'immunodétection sont réalisées sur cette membrane et c'est par la présence de bandes colorées spécifiques que l'animal testé est révélé porteur ou non d'anticorps. Ceci permet d'obtenir un profil de répartition d'antigènes reconnus par le sérum d'un animal infecté selon trois domaines (I, II et III) de faible (I), moyen (II) et fort (III) poids moléculaire qui sera comparé à des témoins négatifs et positifs (Figure 22).



Dans le cas du western blot réalisé à l'École Vétérinaire de Toulouse (ENVT), un sérum est considéré comme positif si au moins quatre bandes spécifiques sont

détectées, réparties sur au minimum deux des trois domaines observés (Garcia-Lunar et al., 2013).

Cette technique est qualifiée de méthode sensible mais surtout très spécifique. Dans une étude comparative de tous les Western Blot utilisés en Europe, celui réalisé à l'ENVT offre une spécificité de presque 98,5 % mais une sensibilité moindre de 90,9 %. Ce manque de sensibilité est probablement dû à une sélection de critères très stricts pour considérer un sérum positif permettant d'avoir une telle spécificité (Garcia-Lunar et al., 2013).

Le western blot permettrait une détection plus précoce (entre 15 et 20 jours après le début de la phase fébrile) par rapport à la sérologie ELISA (usuellement positive à partir de 3 semaines) (Alzieu et Jacquiet, 2017).

De très faibles réactions croisées entre des antigènes de *B. besnoiti* et des anticorps dirigés contre des pathogènes taxonomiquement proches comme *N. caninum* ont été révélées (Shkap et al., 2002) ce qui donne d'autant plus de fiabilité à cet outil de diagnostic. Cela reste cependant une méthode lourde à mettre en œuvre et coûteuse : 20€ TTC (ENVT) par sérum testé, qui ne peut être appliquée à grande échelle pour un diagnostic de masse.

Cet outil diagnostic est complémentaire des autres méthodes sérologiques. Il est fortement recommandé d'utiliser cette technique en association avec le diagnostic ELISA, afin d'avoir le moyen le plus fiable pour détecter un individu infecté dont le sérum serait douteux ou en cas de réaction croisée (Alzieu et Jacquiet, 2009 ; Garcia-Lunar et al., 2013). Du fait qu'il repose sur des extraits totaux de tachyzoïtes y compris les produits d'excrétion-sécrétion, il permet la détection de sérums révélés faux négatifs en IFI (car l'IFI ne détecte que les anticorps dirigés contre les antigènes de surface du parasite).

2.2.4 Le test de microagglutination (MAT)

Proposé par Waap et al. (2011), ce test consiste à mettre en évidence les anticorps agglutinants présents dans le sérum de l'animal potentiellement infecté en contact avec des antigènes de tachyzoïtes.

Si le test est positif, une agglutination est visible à l'œil nu, se traduisant par une opacité diffuse. A l'inverse, une sédimentation des antigènes parasite en cercle ou anneau est le signe d'un résultat négatif.

Pour cela, le seuil de positivité retenu est une agglutination nette à la dilution de 1:160 du sérum selon l'auteur.

Son faible coût, son applicabilité à grande échelle et sa capacité de détection d'anticorps, sans avoir besoin d'anticorps secondaires spécifiques, rendent cette technique très attrayante pour des études. Elle est souvent utilisée sur la faune sauvage ou dans des régions où l'IFI, l'ELISA ou le WB sont inabordables en raison d'un manque d'équipement sophistiqué, de réactifs coûteux ou d'expertise (Guttierez-Exposito et al., 2015a).

Des réactions croisées avec *N. caninum*, *T. gondii* et *Sarcocystis spp.* doivent également être prises en compte. La réalisation d'un test de confirmation est conseillée en complément.

Enfin, la sensibilité et la spécificité de ce test ont été obtenus sur la base de résultats d'IFI et avec un panel limité de sérums étudiés (Waap et al., 2011).

3. Bilan

Le diagnostic direct de *B. besnoiti*, par technique d'histopathologie ou PCR temps réel est un moyen de confirmer la présence du parasite ou de son ADN chez un bovin suspect d'infection à partir de multiples prélèvements (biopsies cutanées, frottis vaginaux, scléaux, sanguins ou encore du sang).

Ces techniques peuvent être appliquées pour la détection des deux formes parasites aux différentes phases de la maladie en prenant en compte la méthode la plus appropriée.

L'examen histopathologique, performant pour la mise en évidence de kystes à bradyzoïtes, sera préférentiellement réalisé pour le dépistage des sujets infectés chroniques alors que le diagnostic PCR temps réel, plus sensible, pourra être utilisé plus précocement.

Les tests moléculaires ont montré une très haute sensibilité par rapport au test sérologique notamment en phase aiguë (Schaes et al., 2013). Ils peuvent occasionnellement détecter le parasite à partir de biopsie cutanée ou du sang de bovin infecté avant séroconversion (Dubey et al., 2003). En revanche l'utilité de ces tests est limitée sur des individus subcliniques, lorsque le nombre de kystes cutanés est faible (Frey et al., 2013) ou dont la parasitémie est sous le seuil de détection.

Pendant la phase chronique, le taux de parasite est plus élevé du fait de la taille et du nombre de kystes cutanés, ce qui a permis de définir des zones où les kystes sont présents en plus grande quantité (Schaes et al., 2016). Cette répartition sera un des éléments importants à prendre en compte pour notre étude.

Les nouveaux outils sérologiques, indispensables dans le contrôle de la besnoitiose, permettent de faire une détection des marqueurs du parasite quel que soit le stade d'infection et de donner une idée du statut de l'animal.

La sérologie est utilisable selon différents objectifs : orienter le diagnostic d'une suspicion clinique, établir un sérodiagnostic sur des infectés chroniques ou bien détecter des bovins séropositifs asymptomatiques dont le rôle épidémiologique ne doit en aucun cas être négligé (Alzieu et Jacquiet, 2017).

L'ELISA est une technique très avantageuse en terme de diagnostic de masse car peu coûteuse mais de précision variable car elle dépend à la fois de la phase de la maladie, du contexte épidémiologique ou encore de la taille de l'échantillon notamment en situation de faible séroprévalence (Alzieu et al., 2015).

D'après l'ensemble des études, la fenêtre de détection des anticorps, trois semaines post-infection, reste une période complexe pour le diagnostic sérologique. De ce fait, par manque de sensibilité, il est conseillé de faire deux sérologies séquentielles avec un test ELISA à deux ou trois semaines d'intervalle pour confirmer un cas aigu de besnoitiose.

Il faut prendre en compte le manque de détection de certains infectés chroniques porteurs de kystes du fait d'un taux d'anticorps trop faible (Fernandez-Garcia et al., 2010 ; Schares et al., 2010). Le pourcentage de faux-négatifs peut être parfois très élevé en zone endémique (supérieur à 17 %) et le fait qu'une réponse en anticorps soit trop faible pourrait être attribuée à un faible nombre de kystes tissulaires (Guttierrez-Exposito et al., 2017). En revanche, les animaux à fort taux d'ADN parasite (Scharès et al., 2011b, 2013) ou ceux pour lesquels les kystes ont été rompus ou dégradés auraient des taux d'anticorps bien plus élevés (Frey et al., 2013) et donc seraient bien détectés.

Différents groupes de recherches ont proposé des procédures de diagnostic à mettre en œuvre pour faciliter des stratégies de contrôle commune dans les pays infectés et ceux à risque d'infection. L'usage du western blot est fortement recommandée pour re-tester un animal douteux en ELISA mais également pour tester un animal avant son introduction en zone indemne ou encore pour les animaux de valeur lors d'abattage sélectif.

Il est essentiel de connaître quelle stratégie doit être suivie selon l'outil diagnostic disponible. La complémentarité de l'ensemble des outils diagnostiques (ELISA, WB, PCR), fréquemment utilisés en routine, est indispensable pour avoir des résultats qui soient les plus fiables possibles dans la détection des individus infectés.

Le tableau suivant (Tableau 4) compare les différents outils diagnostiques disponibles dans la détection de la besnoitiose bovine avec les valeurs seuil retenues, la sensibilité et la spécificité de chaque test ainsi que les avantages et inconvénients principaux selon les données de la littérature.

Tableau 4: Tableau comparatif des outils diagnostiques de détection de la besnoitiose bovine.

Test	Valeur seuil	Se/Sp (%)	Avantages	Limites
PCR	Ct ≤ 36	100/99,8 (Schaes et al., 2013)	<ul style="list-style-type: none"> - Haute sensibilité pour détecter l'ADN parasitaire dans des prélèvements cutanés, vaginaux ou scléreaux (Schaes et al., 2011) - Permet la détection dès la phase fébrile par PCR sur du sang (Alvarez-Garcia et al., 2013 ; Schaes et al., 2013) 	<ul style="list-style-type: none"> - Réactions croisées possibles : <i>B. benetti</i>, <i>B. tarandi</i> (ITS-1 commun) (Schaes et al., 2011b) ; <i>B. darlingi</i>, <i>B. oryctofelisi</i>, <i>B. neotomofelisi</i> par RT-PCR (Schaes et al., 2011b) - Résultats inconstants pour détecter des bovins en phase précoce (Alzieu et Jacquet, 2016) - Coûteuse : 25€ TTC (ENVT)
Histopathologie			<ul style="list-style-type: none"> - Rapide et faible coût (Sannusi, 1991) - Sensible pour les infectés chroniques 	<ul style="list-style-type: none"> - Diagnostic tardif du fait de l'apparition des kystes dans les 5-6 semaines post-infection (Alzieu et Jacquet, 2010) - Peu fiable pour les individus asymptomatiques (25% des cas porteurs de kystes scléreaux) (Alzieu et al., 2007)
IFI	1:200 (Lenfant et al., 2013)	91,8/100 (Lenfant et al., 2013)	<ul style="list-style-type: none"> - Diagnostic plus précoce 10-22 jours post-infection par rapport à l'histologie et meilleure sensibilité (Janitschke et al., 1984) 	<ul style="list-style-type: none"> - Technique semi-quantitative, difficile à mettre en œuvre et non standardisée (Legrand, 2003) - Coûteuse : 15€ TTC (ENVT) - Réactions croisées possibles aux dilutions < 1:200 avec <i>N. caninum</i> et <i>T. gondii</i> (Franc and Cadiergues 1999 ; Goldman and Pipano, 1983) - Moins bonne sensibilité en l'absence de kystes (Alvarez-Garcia et al., 2013)
ELISA Priocheck besnoitia Ab 2.0	15 %	100/98,8 (Garcia-Lunar et al., 2012)	<ul style="list-style-type: none"> - Intérêt pour le diagnostic de masse (Garcia-Lunar et al., 2012) 	<ul style="list-style-type: none"> - Réactions croisées possibles avec <i>N. caninum</i> (Schaes et al., 2010) et déjà observées avec <i>T. gondii</i> (Cortes et al., 2006)
ELISA ID Screen Besnoitia Indirect IDVET®	70 %	97,2/100 (Garcia-Lunar et al., 2013)	<ul style="list-style-type: none"> - Standardisé et reproductible (Cortes et al., 2006) 	<ul style="list-style-type: none"> - Certains infectés chroniques porteurs de kystes, passent sous le seuil de détection : faible circulation d'anticorps (Garcia-Lunar et al., 2011)
ELISA INGEZIM BES 12 BesK1 INGENASA®	9 %	97,2/93 (Garcia-Lunar et al., 2013)	<ul style="list-style-type: none"> - Peu coûteux : 10€ TTC et facile à mettre en œuvre (ENVT) - Détection précoce : entre 7-21 jours après les premiers signes cliniques 	<ul style="list-style-type: none"> - Un résultat positif ou douteux doit être confirmé par un western blot (Alzieu et Jacquet, 2017)

			selon les tests (Schaes et al., 2013) mais usuellement positive dès 22 jours (Alzieu et Jacquet, 2017)	- Manque de sensibilité pour les phases précoces de la maladie (fébrile) (Garcia-Lunar et al., 2013)
WB Bb-Spain1 (Extraits de tachyzoïtes totaux)	Présence de min 3 ou 4 bandes sur min 2 des 3 domaines décrits	98,1/97,7 (Garcia-Lunar et al., 2013)	- Détection plus précoce que l'ELISA : 15-21 jours (Alzieu et Jacquet, 2017)	Lourde à mettre en œuvre et coûteuse : 20€ TTC (ENVT)
WB (ENVT)		98,5/90,9 (Lenfant, 2013)	- Faibles réactions croisées observées (Shkap et al., 2002)	
WB (Bradyzoïtes)		99/97,7 (Garcia-Lunar et al., 2013)	- Complémentaire aux autres outils sérologiques (ELISA et IFI) permettant une confirmation : gold standard (Schaes et al., 2013)	
MAT	1:160 (Waap et al., 2011)	97,2/99,3 (Waap et al., 2011)	Facile et peu coûteux (Waap et al., 2011)	- Réactions croisées possibles (Waap et al., 2011) - Pas utilisable en phase aiguë (Alvarez-Garcia et al., 2013)

VII. Mesures de lutte

1. Traitement des cas cliniques

Les molécules utilisées pour traiter l'infection à *B. besnoiti* en phase aiguë sont des antibiotiques de la classe des sulfamides utilisés à forte dose (Alzieu et al., 2011).

Les posologies sont très supérieures à celles mentionnées dans les recommandations des AMM (Tableau 5), il est donc nécessaire de respecter un délai forfaitaire en terme de délai d'attente.

Le traitement doit être suivi pendant 7 jours minimum : d'abord initié par voie intraveineuse puis relayé par voie orale au bout de deux à trois jours. Son rôle est de diminuer l'intensité des signes cliniques en phase aiguë mais il ne permet pas d'éliminer le parasite. Il permet de restaurer l'état de santé d'un bovin en vue de sa réforme rapide.

En revanche, il est illusoire de vouloir traiter un bovin en phase de sclérodémie. L'inefficacité du traitement en phase chronique serait due à l'inaccessibilité des

parasites protégés de la molécule active dans les kystes, comme dans le cas d'autres maladies parasitaires avec des kystes d'Apicomplexa (Jacquet et al., 2010).

Tableau 5: Recommandations concernant l'utilisation des sulfamides dans le traitement de la besnoitose bovine lors de phase aigüe.

Principe actif Nom déposé	Dose AMM	Dose recommandée	Temps d'attente AMM
Sulfadimidine			
AMPHOPRIM® (Virbac)	90 mg/kg/j IM ou	150-200 mg/kg IV J0 et	Viande et abats : 12j
Sulfadimerazine	IV pendant 3j	J2 (Alzieu et al., 2011)	Lait : 10 traites
NOÉ® (Qalian)			
Sulfadiméthoxine	20 mg/kg/j IM ou	80mg/kg IV J0 et J2	Viandes et abats : 12j
ACTI-METHOXINE® (Biove)	IV pendant 3j	(Alzieu et al., 2011)	Lait : 6 jours

Légende : IV : intra-veineuse ; IM : intra-musculaire

En conditions de terrain, il a été montré que l'observance de la prescription est souvent faible, du fait d'un sous-dosage fréquent et d'une durée de traitement trop courte (2 à 4 jours) contre les 7 à 10 jours recommandés conduisant à de nombreux échecs de traitements ou des effets moindres. De plus, un des facteurs contribuant à la réussite du traitement est le moment où celui-ci est mis en place. Il faut l'initier au plus tôt, durant la phase fébrile dès l'apparition des premiers signes cliniques ou à la rigueur au tout début de la phase d'œdème (Alzieu et Jacquet, 2017).

Il est également conseillé lors de la phase aigüe d'administrer en complément des anti-inflammatoires non stéroïdiens comme le kétoprofène, Ketofen® 10% (Ceva), l'acide tolfénamique, Tolfine® (Vetoquinol) ou encore la flunixin, Finadyne® (MSD) (Legrand, 2003) afin de réduire l'inflammation (Rostaher et al., 2010). Des diurétiques comme l'hydrochlorothiazide (en association avec la dexaméthasone dans la Diurizone® Vetoquinol) peuvent être administré pour diminuer le phénomène congestif et la formation d'œdèmes (Alzieu et al., 2007b).

2. Mesures de prophylaxie

2.1 *Prophylaxie médicale : la vaccination*

A l'heure actuelle, la prévention médicale de la besnoitiose bovine est limitée. Seuls deux vaccins vivants atténués sont actuellement disponibles dans le monde (Alzieu et Jacquet, 2017).

Le premier vaccin est utilisé essentiellement en Afrique du Sud, préparé à partir d'une souche isolée de gnou. Il présente une atténuation dite « naturelle » lorsqu'il est inoculé aux bovins. Le second, utilisé en Israël, est préparé à partir d'une souche de *B. besnoiti* isolée sur bovin et entretenue sur culture cellulaires (Esquerre, 2015).

De par leur utilisation dans ces pays, les résultats ont prouvé qu'aucun animal vacciné n'a fait de forme clinique. Cependant, la vaccination n'a pas empêché l'apparition de kystes dans le derme, d'après les résultats d'essais en ferme en Afrique du Sud (Bigalke et al., 1974). Or, la proportion d'animaux porteurs de kystes était beaucoup plus faible (de 0 à 1,8 % contre 4 à 35 % pour les bovins témoins).

En Europe, il n'y a aucun vaccin disponible à ce jour avec AMM (Alvarez-Garcia et al., 2013). Des essais ont été envisagés (Lienard et al., 2015) sur un modèle lapin afin de reproduire l'infection de *B. besnoiti* en réduisant les coûts dans une perspective d'évaluation de candidats vaccins mais aucune commercialisation n'est pour le moment envisagée.

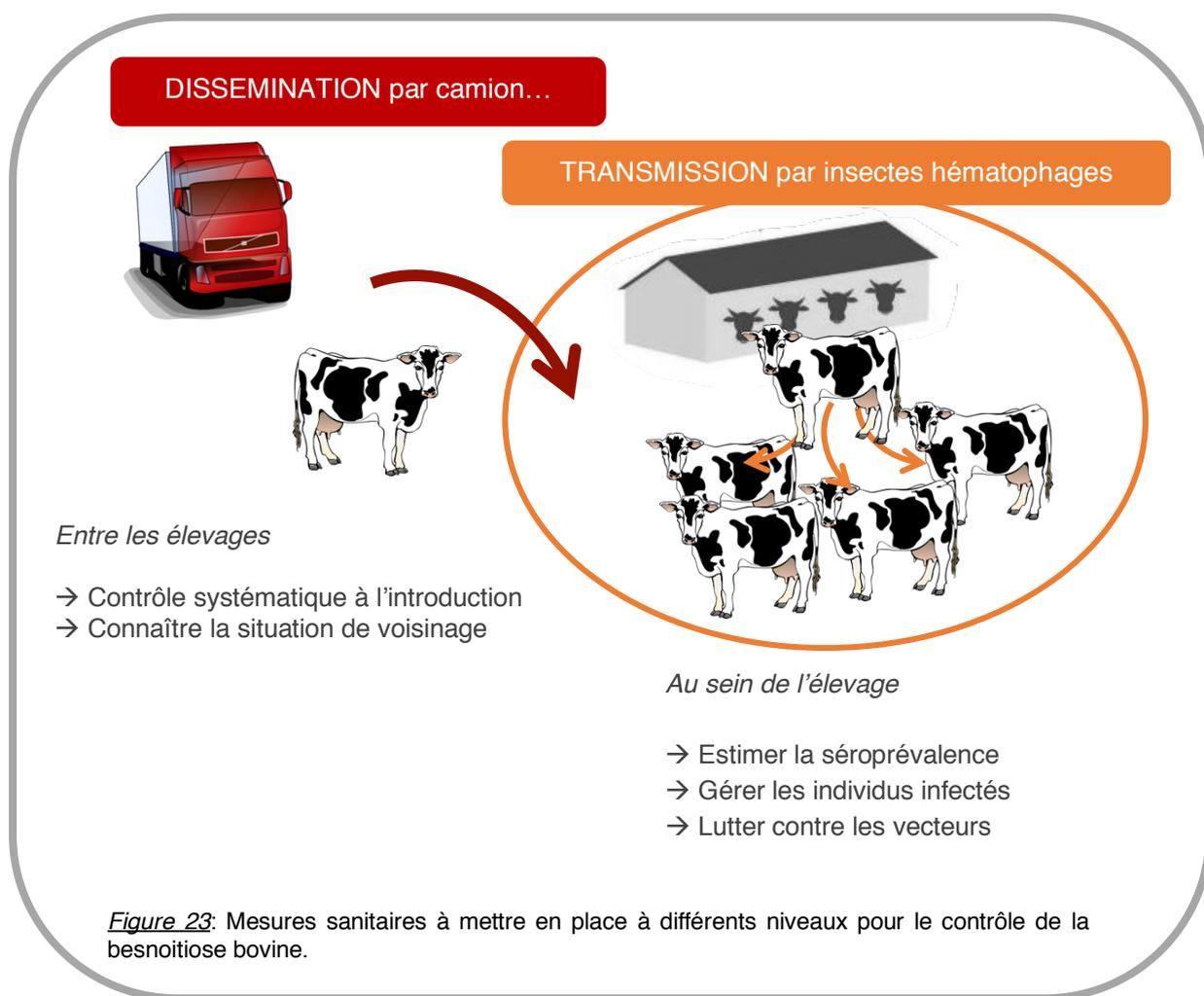
2.2 *Prophylaxie sanitaire*

Du fait de l'efficacité très variable du traitement des cas cliniques et de l'inexistence de vaccin, les mesures de prophylaxie sanitaire sont indispensables à mettre en œuvre pour le contrôle de la besnoitiose bovine.

L'unité de gestion sanitaire correspond non pas à l'individu mais au cheptel. Par ailleurs, il faut rappeler qu'à ce jour la besnoitiose n'est pas une maladie réglementée, elle ne fait donc pas l'objet d'un dépistage généralisé, hormis dans certaines zones qui en ont pris l'initiative (Alzieu et Jacquet, 2017). A priori, il est admis à ce jour,

qu'une majeure partie des cheptels français est indemne de besnoitiose. Même si un nombre conséquent de départements connaît des situations d'infection, c'est en réalité quelques cheptels qui sont infectés ou des foyers qui restent localisés et cantonnés. La seule exception sont les zones « historiques » d'endémie et d'émergence d'extension récente.

Comme évoqué précédemment, deux phénomènes ont permis l'expansion de la maladie au niveau national et ce sont ceux sur lesquels il faut intervenir pour la contrôler (Figure 23) : la dissémination intercheptels, par camion, du fait du transit d'animaux et la transmission intracheptel par l'action des insectes hématophages et dans une moindre mesure des pratiques d'élevages lors d'injections multiples.



Différentes mesures sanitaires sont applicables selon le statut épidémiologique du cheptel sain ou infecté et des stratégies différentes peuvent être mises en place pour gérer au mieux les cas infectés.

2.2.1 Cas d'un cheptel sain

Un cheptel est qualifié de sain s'il ne contient aucun sujet infecté et non pas aucun individu en phase clinique ou ayant présenté une phase clinique. Afin de conserver ce statut et de protéger le cheptel, deux mesures sont indispensables :

- *1^e mesure : Confirmation du statut indemne*

La confirmation initiale du statut indemne d'un cheptel passe par la réalisation d'un balayage sérologique individuel de l'ensemble des bovins âgés de plus de six mois par un test ELISA confirmé d'un Western Blot si nécessaire dans les cas douteux.

- *2^e mesure : Contrôle des animaux introduits*

Il est nécessaire de contrôler systématiquement, par l'outil sérologique, les animaux d'achat introduits sur l'élevage que ce soit pour le renouvellement, la reproduction mais aussi la pension ou encore les animaux destinés à l'engraissement.

Pour plus de prudence, d'après Alzieu et Jacquier (2011), il convient de réaliser deux sérologies à six semaines d'intervalle même si cela est très rarement appliqué sur le terrain. Ces contrôles sont d'autant plus importants si l'animal provient d'une zone endémique ou d'émergence (Alvarez-Garcia et al., 2013).

Aujourd'hui, le dépistage sérologique systématique apparaît comme une composante majeure du contrôle à l'introduction d'où l'intérêt du « pack intro » associant le sérodiagnostic de l'IBR (Rhinotrachéite infectieuse bovine), la paratuberculose, la BVD et la besnoitiose. Ce dépistage a fait ses preuves dans plusieurs départements en évitant l'introduction ou la ré-introduction de la maladie dans plusieurs cheptels (Boulon C., GDS Ardèche, données non publiées).

2.2.2 Cas d'un cheptel infecté

Dans un élevage infecté, les pertes sont parfois très lourdes économiquement (Duboisset, 2013) et l'espoir d'arriver rapidement à une situation de stabilité semble illusoire. Dans ce cas, la gestion est plus complexe, elle passe à la fois par des mesures sanitaires couplées à du dépistage.

Dans un premier temps il faut gérer les éventuels cas cliniques. Dans un second temps, il faut évaluer la séroprévalence et prendre des mesures différentes selon son niveau d'importance. Puis, il sera nécessaire de réaliser un contrôle systématique à l'achat afin d'éviter toute nouvelle introduction d'animal contaminé.

- *1^e mesure : Elimination des bovins malades et porteurs de kystes*

Rappelons que les bovins ayant présenté une forme clinique sont de bonnes sources de parasites pour les vecteurs avec une quantité considérable de parasites dans les kystes cutanés. Ils représentent ainsi la population à risque le plus élevé. Dans l'idéal ils doivent être isolés, traités puis réformés dans les plus brefs délais.

Selon les travaux de Mourier (2013) qui a réalisé une enquête dans une zone pilote, le fait de réformer seulement la moitié des individus malades est insuffisante, notamment les jeunes bovins de moins de deux ans (du fait de la volonté de l'éleveur à conserver le pré-troupeau). Même si le traitement est un succès apparent, permettant une résolution des signes cliniques, le risque de conserver durablement un individu réservoir de *B. besnoiti* est toujours présent.

Ainsi, il est indispensable de réformer précocément l'ensemble des individus ayant eu une forme clinique, même légère, traités ou non, afin de pouvoir espérer assainir le troupeau.

- *2^e mesure : Estimation de la séroprévalence et stratégies mises en place*

Dans un second temps, il est nécessaire d'estimer la séroprévalence au niveau du cheptel afin de connaître le niveau d'infection du troupeau et de pouvoir agir en conséquence selon le nombre d'individus séropositifs.

Pour cela, un balayage sérologique de l'ensemble des individus de plus de six mois par réalisation de test ELISA est la méthode de choix pour évaluer la séroprévalence du cheptel. Sur les individus dont le résultat est douteux, un western blot est réalisé afin de confirmer ou non leur statut d'infection.

En conséquence, selon l'importance de la séropositivité, des stratégies de lutte plus ou moins drastiques, sont décidées par l'éleveur. Deux alternatives sont possibles afin d'éliminer les individus séropositifs: les réformer dans les plus brefs délais ou réaliser une conduite en lots séparés, bovins infectés / bovins sains, dans un objectif de réforme plus échelonnée dans le temps.

Selon les études de terrain, il semblerait qu'un certain seuil de séroprévalence conditionne la conduite choisie. En effet, dans les cas de faible prévalence, inférieure à 10 % (Alzieu, 2009), il est indiqué d'éliminer les individus séropositifs le plus rapidement possible. Dans les cas de haute prévalence, au-delà de 30 %, la situation devient alors plus complexe à gérer puisque la réforme rapide et massive des bovins infectés représente un coût non négligeable pour l'éleveur. Le risque de voir une augmentation de la séroprévalence en conservant ces individus infectés est réel.

En cas de forte séroprévalence, certains éleveurs selon leur motivations et moyens, font le choix de réaliser la conduite en lots. Le principe est de réaliser une séparation physique des bovins infectés et des bovins sains de plusieurs centaines de mètres (entre 100 et 300 m idéalement) ce qui minimise les mouvements d'insectes contaminants entre lots, tout en faisant des traitements antiparasitaires externes ponctuels aux saisons les plus propices à la pullulation des insectes vecteurs (Alzieu et Jacquet., 2017).

L'objectif est donc de protéger les individus sains de ceux qui sont infectés en évitant de nouvelles contaminations tout en réformant progressivement l'ensemble des bovins infectés. Cette stratégie de contrôle requiert des moyens importants que ce soit en bâtiment, en charge de travail supplémentaire ou de main d'œuvre mais elle a montré ses preuves sur le long terme.

D'après Alzieu et Jacquet (2017), un éleveur allaitant sédentaire, en zone d'émergence de besnoitiose avec une séroprévalence initiale de 30 % a fait le choix en 2012 de réaliser des lots de vaches négatives et positives (seulement 6 vaches sur 60 étaient séronégatives). Par la gestion du pâturage en parcs séparés et du cheptel de renouvellement inclus dans le lot des séronégatives, en 2017, 55 vaches sur 80 étaient séronégatives. Une éradication par l'élimination des derniers bovins séropositifs était envisagée pour l'année 2018.

Par un allotement raisonné, l'assainissement d'un cheptel semble possible mais cela dépend beaucoup de la volonté, des moyens et de la rigueur de l'éleveur ainsi que de l'accompagnement de la part du GDS local et du vétérinaire traitant pour y parvenir.

- *3^e mesure : Contrôle des animaux à l'introduction*

Comme dans le cas d'un cheptel sain, le contrôle systématique à l'achat de tout bovin est indispensable pour ne pas aggraver la situation.

Pour résumer, la figure 24 présente la conduite à tenir, dans l'idéal, lors de suspicion clinique de besnoitiose bovine pour un éleveur afin d'éviter la dissémination de la maladie au sein du cheptel.

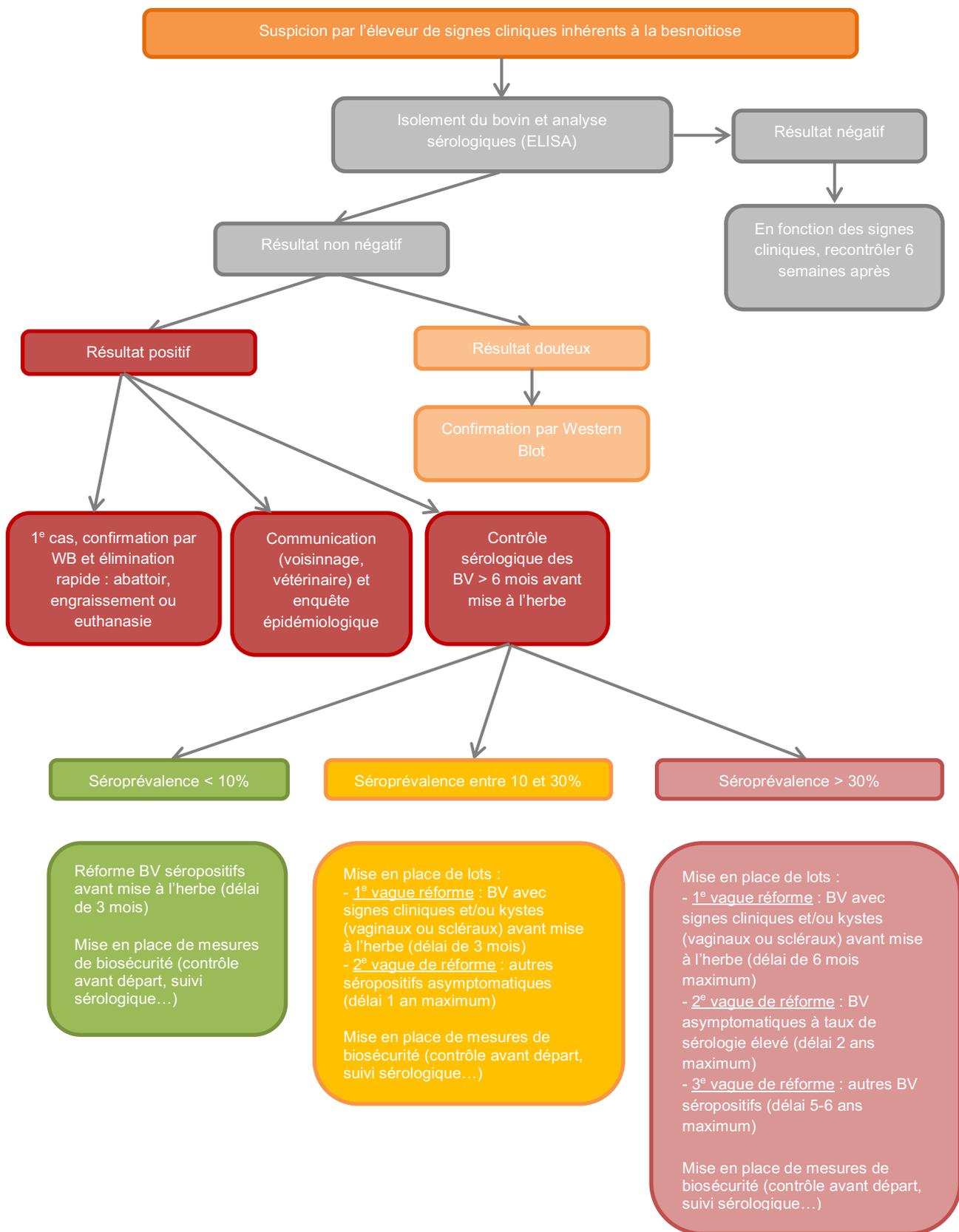


Figure 24: Logigramme de la gestion d'une suspicion clinique de besnoitiose bovine

D'après GDS France (2018).

2.3 Lutte antivectorielle

La lutte chimique contre les insectes hématophages, notamment les stomoxes est illusoire. En effet, elle est de plus en plus difficile du fait de la résistance accrue de certaines populations aux pyréthroïdes de synthèse, insecticides les plus communément utilisés pour traiter les bovins au pâturage (Salem et al., 2012, Tainchum et al., 2018, Reissert-Oppermand et al., 2019).

On remarque une extension de leur période d'activité maximale, d'avril à novembre dans le sud-ouest de la France selon Jacquiet et al., 2014 mais ils sont également présents en hiver en bâtiment (Lienard et al., 2011).

En ce qui concerne les tabanidés, leur période d'activité se limite à la saison estivale, de juin à septembre selon les espèces. Leur résistance aux insecticides est peu documentée à ce jour cependant il semblerait qu'aucune molécule ne soit efficace pour empêcher le repas de sang (Presley et Wright, 1986) car les pyréthroïdes peuvent avoir une action qu'une fois l'insecte gorgé.

Selon Presley et Wright (1986), une mortalité de 75 % a été obtenue chez les tabanidés deux jours après application de pyréthroïdes en pour-on (application cutanée), 24 h après leur repas de sang. Cet effet persiste seulement quinze jours après application du produit.

Il n'y a donc pas de traitement insecticide efficace aujourd'hui qui garantisse une protection contre l'infection à *B. besnoiti* qu'elle soit médiée par les stomoxes ou par les taons. On peut uniquement espérer que l'application de traitements ponctuels mais réguliers, lors du pic d'activité des insectes hématophages, permette de diminuer la taille des populations et par conséquent la pression de transmission.

Plusieurs chercheurs réalisent des essais afin de trouver des mesures alternatives pour lutter contre ces vecteurs.

Par exemple, l'utilisation de régulateurs de croissance comme la cyromazine sur les stades larvaires de *S. calcitrans* (Taylor et al., 2012) dont une application au printemps autour des nourisseurs au pâturage induirait une réduction de 97 % de la population dans les deux mois suivants.

D'autres études se sont focalisées sur le piégeage des adultes stomoxes. Différents types de pièges ont été testés (Gilles et al., 2007) ; (Taylor et Berkebile., 2006) dont le piège Vavoua (Figure 25, Photo 1) conçu initialement pour la lutte contre la mouche tsé-tsé. Il existe aussi des écrans attractifs en tissu ou plastique imprégnés d'insecticides mais leur efficacité reste discutable (Jacquiet et al., 2014).

Enfin, en bâtiment, il y a également possibilité d'utiliser des dispositifs de pièges lumineux (Figure 25, Photo 2) supposés être très attractifs pour les stomoxes, qui ont été testés à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse mais dont les résultats restent peu concluants (Jacquiet, 2018, données non publiées).



Photo 1

Figure 25: Pièges pour la capture d'insectes hématophages.

Photo 1 : Piège Vavoua d'après Jacquiet et al., 2016

Photo 2 : Désinsectiseur électrique à UV d'après Hellopro.fr



Photo 2

Concernant les Tabanidés, les stades larvaires sont plus difficilement accessibles car selon les espèces, les milieux où on peut les trouver sont extrêmement variés : terrestres (*Phillipomyia spp.*), semi-aquatiques (*Hybomitra spp.*) ou lenticues (eaux stagnantes pour *Haematopota pluvialis*). De plus certaines espèces sont très actives autour de leur gîtes larvaires et s'en éloignent peu ainsi un déplacement des animaux de ces zones à risque pourrait permettre de diminuer les nuisances

occasionnées. De plus, des pièges ont été également conçus: le piège N'zi utilisé en Loire-Atlantique ou encore le piège H-trap utilisé pour protéger les chevaux.

Ces alternatives aux insecticides sont certes encore en cours d'évaluation mais il semblerait que ce soit des outils prometteurs afin de gérer les populations d'insectes hématophages dans le contrôle de la besnoitiose bovine.

3. Evaluation de l'impact zootechnique et économique

Les conséquences de la besnoitiose bovine sont très variables d'un élevage à l'autre selon le taux d'infestation. Les pertes subies qu'elles soient directes ou indirectes sont conséquentes : des cas cliniques induisant une mortalité qui peut s'élever jusqu'à 10 % (Jacquiet et al., 2012), des pertes de production sur les individus infectés chroniques ou encore une valeur réduite des bovins de réforme.

Dans son étude, Duboisset (2013) a évalué les conséquences économiques d'un groupe d'élevages allaitants d'une zone d'émergence ardéchoise pendant 3 ans. Il a montré que le coût global de la maladie pour les élevages qui « vivent avec » est significativement très supérieur à celui des élevages sains ou en voie d'assainissement. Il rapporte que les frais de traitement des cas cliniques se sont élevés à 128 € par bovin malade (traitement spécifique aux sulfamides à fortes doses, anti-inflammatoires et antiparasitaires externes). Pour les élevages vivant avec la maladie, le coût annuel global s'élève en moyenne à 40 € par bovin présent dans l'exploitation (ceci recense les moins-values en terme de vente d'animaux, les réformes anticipées et renouvellement et les frais d'insémination artificielle). Enfin, il a montré que le coût annuel du dépistage sérologique et des mesures de prophylaxie pour des élevages sains ou en voie d'assainissement s'élève à 9 € par bovin.

Ces résultats renforcent le fait qu'il est primordial de chercher à assainir les cheptels infectés dans la mesure du possible et selon la motivation et les moyens de l'éleveur.

4. Les aides financières à disposition des éleveurs engagés

C'est avant tout l'introduction de bovins infectés qui contribue à la dissémination massive de la maladie à l'échelle nationale et européenne. Lors du contrôle à l'introduction, il est alors fortement conseillé aux éleveurs de faire une analyse sérologique de l'animal introduit pour préciser son statut vis-à-vis de la besnoitiose.

Cette analyse, à la demande volontaire de l'éleveur acheteur, est prise en charge par le Conseil Départemental à 50 % pour les utilisateurs du billet de garantie conventionnelle (document signé lors de la vente d'un bovin entre l'acheteur et le vendeur, permettant à l'acheteur de rendre l'animal si les analyses réalisées suite au kit intro ne sont pas favorables).

Depuis 2017, GDS France a mis en place un plan d'assainissement dans les foyers dans le but d'éliminer les individus infectés. Un protocole national initié par le Fond de mutualisation des GDS intervient en complément des mesures mises en place dans chaque département et permet aux éleveurs éligibles de bénéficier d'une aide financière.

Les éleveurs doivent pour cela être adhérents à leur GDS, détenir ou avoir détenu au moins un bovin ayant été confirmé positif en besnoitiose (par Western Blot) ou un cas clinique confirmé en sérologie ELISA et s'engager dans un plan de lutte d'assainissement de la maladie. Leur engagement consiste à :

- réaliser des sérologies sur tous les bovins de plus de six mois
- éliminer les bovins dont l'analyse ELISA ou Western Blot est positive selon un plan d'assainissement et un calendrier prévisionnel défini par le GDS
- dépister dans les 30 jours avant la sortie, les animaux prévus à la vente à destination d'un autre élevage.

Pour cela, ils bénéficient d'une aide des GDS départementaux de l'ordre de 100 € par animal infesté éliminé et de 6 € par analyse réalisée en sortie de foyer et, ceci, jusqu'en 2020.

Par ailleurs, la réalisation d'une enquête épidémiologique aux alentours du foyer (dans un rayon d'environ 100 mètres) et dans les élevages où des animaux ont pu être vendus ou achetés, permet de recueillir les informations nécessaires à la mise en place d'un plan d'assainissement.

VIII. « Vivre avec » la besnoitiose

Dans certains élevages à forte séroprévalence, quand il est impossible de réformer les individus infectés ou de réaliser une conduite en lots séparés, les éleveurs sont alors condamnés à vivre avec la maladie. En zone d'endémie du piémont pyrénéen, certains élevages ont une séroprévalence de 60 à 80 % mais très peu de cas cliniques (Fouquet, 2009). Dans ces élevages, le coût relatif à la maladie est conséquent car cela impose aux éleveurs de conserver au maximum le pré-troupeau pour ne pas introduire de jeunes animaux à risque d'être contaminés et de limiter l'introduction de taureaux.

I. Présentation du projet

1. Contexte, objectifs et hypothèses de l'étude

Au jour d'aujourd'hui, comme il a été montré dans la première partie, nous sommes dans une situation où la besnoitiose bovine est en pleine expansion que ce soit au niveau national et européen. On note une très forte augmentation du nombre de départements français touchés par la maladie déclarant des cheptels infectés (GDS, 2018). De plus, seule une très faible proportion d'animaux déclare une affection symptomatique (moins de 20 %). On se trouve confronté à une situation où la maladie circule à bas bruit, dans des cheptels présentant un fort taux de séroprévalence.

En l'absence de traitement, vaccin ou encore de moyens efficaces pour lutter contre les stomoxes, l'unique arme en mesure d'enrayer la propagation de l'infection et de réduire la prévalence au sein d'un cheptel est le dépistage des bovins infectés et leur réforme sélective en priorité. Cette stratégie, conduite avec méthode et persévérance, peut permettre d'aboutir à l'assainissement d'un cheptel infecté dont la prévalence sérologique est peu importante et les moyens économiques sont disponibles pour cet effort d'assainissement. Or, le caractère « silencieux » de cette maladie fait que de nombreux cheptels ont une prévalence sérologique forte à très forte (parfois supérieure à 70 %) et dans ces cas, il est difficile d'appliquer cette méthode drastique.

Récemment, une autre stratégie consistant à réaliser au sein même d'une exploitation, une conduite en lots séparés (un lot d'individus séropositifs et un lot de séronégatifs), séparés d'une certaine distance (plusieurs centaines de mètres) pendant au moins la saison de pâturage, a connu un réel succès (GDS Tarn, Ardèche). Cependant, elle ne peut s'appliquer dans tous les élevages, faute de moyens de bien séparer les lots.

Face à l'impossibilité d'appliquer des mesures de réforme immédiate des individus infectés ou bien de réaliser une conduite en lot séparés, la finalité de cette étude prend alors tout son sens. Que peut-on proposer à un éleveur dont le cheptel se révèle fortement séropositif, ne pouvant appliquer les stratégies précédemment évoquées ?

On peut définir quatre statuts d'animaux infectés ou non par *Besnoitia besnoiti* (sur la base d'une sérologie individuelle sur l'animal de plus de six mois) (Figure 26).

- L'individu séronégatif que l'on peut caractériser d'animal sain non infecté.
- L'individu séropositif, porteur d'anticorps dirigés contre le parasite, marqueur d'infection (en cours ou ancienne) à *B. besnoiti*. Parmi ces individus, on peut subdiviser en deux autres catégories selon la présentation clinique :
 - L'individu infecté symptomatique, présentant les signes cliniques caractéristiques de la maladie comme décrits dans la première partie.
 - L'individu infecté asymptomatique porteur ou non de kystes à bradyzoïtes

Comme évoqué précédemment, il est indispensable de détecter au plus tôt les individus les plus à risque de transmettre le parasite au sein du troupeau. On pourrait imaginer qu'une réforme sélective et prioritaire des animaux les plus « contaminateurs » puisse faire baisser la pression de transmission au sein du cheptel, permettant de laisser plus de temps pour éliminer le reste des animaux séropositifs sans risquer de nouvelles contaminations.

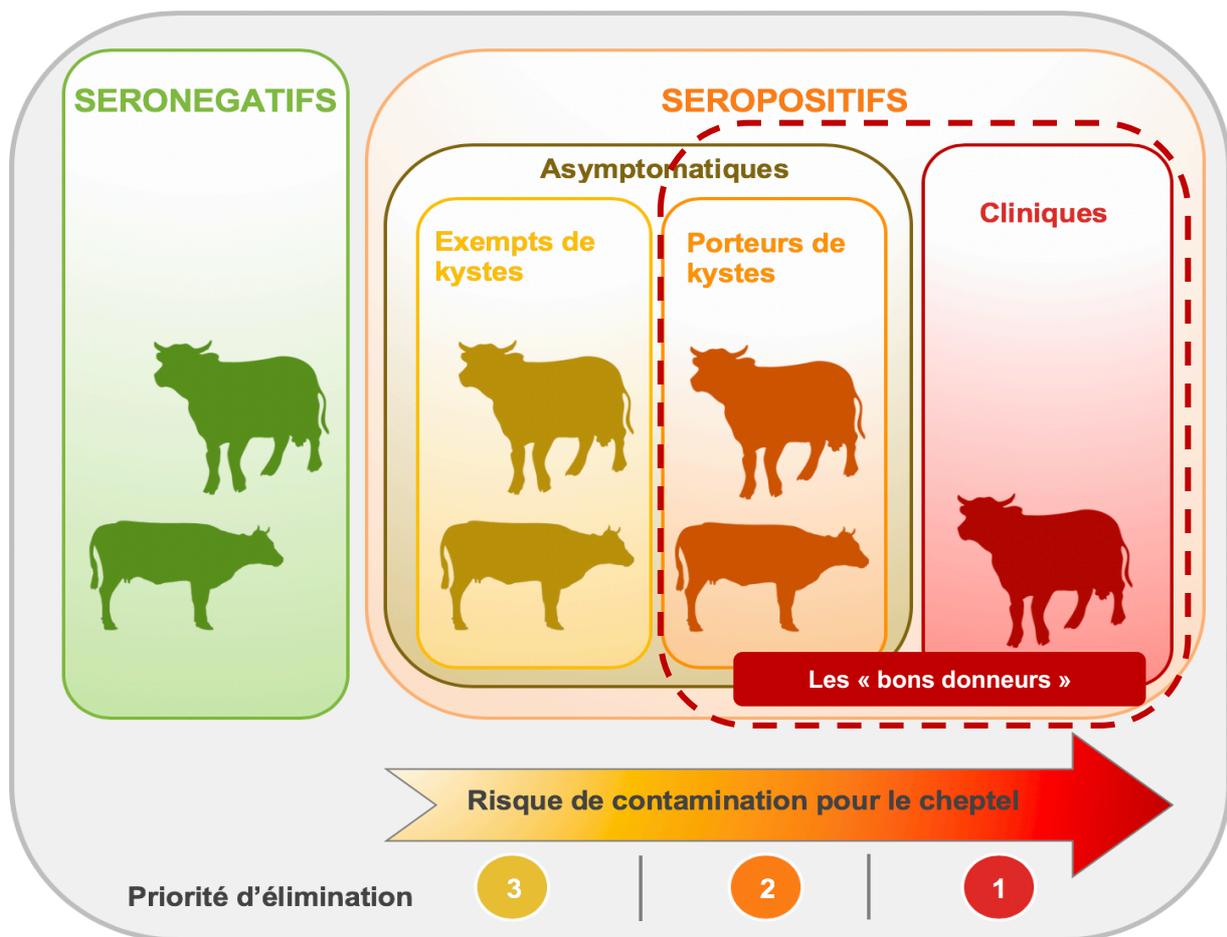


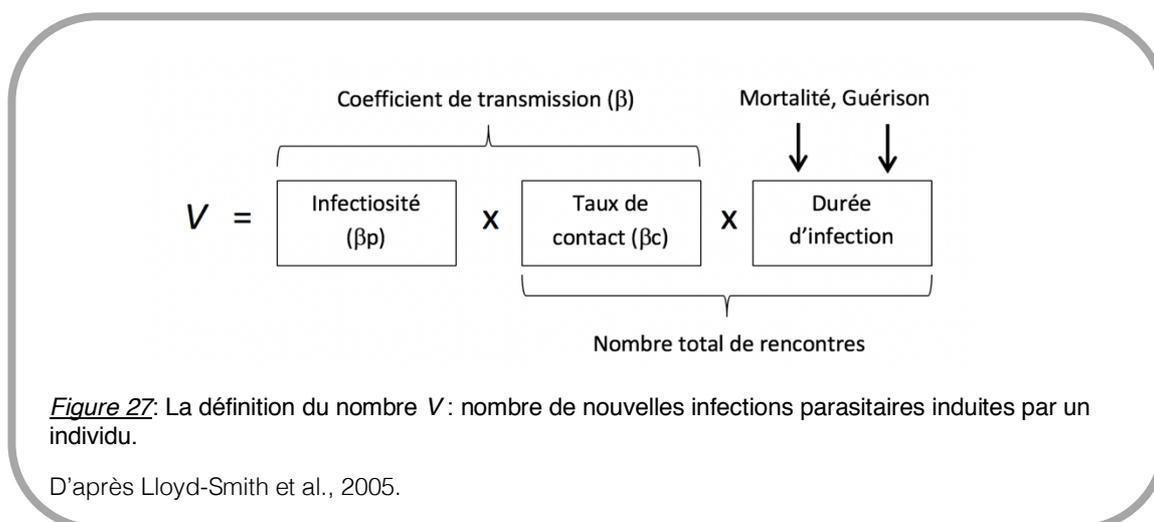
Figure 26: Présentation des différents profils de bovins présents dans un cheptel infecté et conduite à tenir par ordre de réforme.

D'après FRGDS Occitanie, 2017.

Ceci nous amène à évoquer la notion d'individu qualifié de « super-spreader » qui pourrait s'appliquer à l'infestation parasitaire des bovins par *B. besnoiti*.

D'après Vanderwaal et al., (2016), de nombreuses infestations parasitaires, que ce soit par des helminthes, arthropodes ou microparasites suivent une certaine « loi » de répartition biologique. Il explique qu'il y aurait un phénomène d'agrégation importante de parasites sur une petite partie d'une population hôte. Autrement dit, un unique individu peut avoir une charge parasitaire très importante et représente à lui seul, une source de parasite pérenne dont le potentiel de transmission est considérablement élevé. Ceci peut se traduire par la règle des 20-80 : 20 % des hôtes contribuent à 80 % de la transmission potentielle d'un pathogène au sein d'une population (Wilson et al., 2002 ; Woolhouse et al., 1997). Il décrit qu'on peut définir pour cet individu le critère V comme étant le nombre de nouvelles infections induites par cet individu (Lloyd-Smith et al., 2005) dépendant de trois composantes :

l'infectiosité, le taux de contact entre les individus infectés et sains et la durée de l'infection. (Figure 27).



Ainsi, dans le cas du contrôle de l'expansion de la besnoitiose bovine, il semblerait que la détection et l'élimination précoce de ce type d'individu à fort potentiel de transmission soit un moyen de réduire considérablement la diffusion du parasite.

Sur ces éléments, il a été admis que tous les bovins séropositifs ne contribuaient pas avec la même intensité à la transmission du parasite. L'objectif de cette étude était donc d'identifier de manière précoce, parmi les bovins séropositifs, les individus « bons donneurs » de parasite, représentés par les bovins infectés cliniques et les bovins asymptomatiques porteurs de kystes à bradyzoïtes. Par la suite, les réformer ou dans une moindre mesure, les isoler du reste du troupeau, permettrait de diminuer la pression de transmission, de protéger le troupeau sain et d'aller, à terme, vers un assainissement progressif du cheptel.

De plus, sur la base des connaissances actuelles et pour attribuer un statut à chaque individu, plusieurs hypothèses de travail ont alors été formulées :

- parmi les bovins séropositifs asymptomatiques, seule une faible proportion d'entre eux présenterait des kystes parasitaires (individus en orange sur la figure 26) et pourraient être considérés comme « forts contaminateurs » pour les bovins sains du cheptel via les insectes piqueurs.

- l'autre partie des individus séropositifs n'aurait qu'une très faible quantité de kystes voire aucun dans leur derme (individus en jaune sur la figure 26).
- la distinction entre ces catégories d'animaux pourrait se faire par le biais d'une analyse PCR temps réel, sur un fragment de peau en considérant que les plus « forts contaminateurs », dont la richesse en kystes est plus importante aurait un signal PCR temps réel plus significatif.

Ainsi, l'hypothèse principale de cette étude était que *l'utilisation de la PCR temps réel sur biopsie cutanée, comme un outil de gestion performant, pourrait permettre de classer les animaux asymptomatiques d'un troupeau infecté selon leur richesse en ADN parasite présent dans le derme afin d'identifier les bovins les plus contaminants pour les éliminer en priorité.*

De ce fait, dans les élevages à forte séroprévalence dans lesquels la réforme exhaustive et rapide des séropositifs est difficile voire impossible, des stratégies d'assainissement adaptées pourraient être proposées.

2. Les acteurs du projet

Ce projet de thèse a été élaboré, à la demande de la Fédération Régionale des Groupements de Défense Sanitaire (FRGDS) d'Occitanie et s'inclue dans le projet global de mise en place d'une stratégie d'assainissement dans les troupeaux à forte séroprévalence, conduit au niveau national par GDS France.

Les principaux collaborateurs étaient :

- L'équipe « besnoitiose et vecteurs » de l'Unité Mixte de Recherche INRA/ENVT 1225 Interactions Hôtes-Agents pathogènes (UMR INRA/ENVT 1225 IHAP) sous la direction du Pr. Philippe Jacquet et ses collaborateurs Christelle Grisez, Françoise Prevot et Emmanuel Lienard, permettant la coordination de l'ensemble du projet, les visites et prélèvements au sein des différents élevages et la réalisation de test PCR et Western blot dans le laboratoire de parasitologie de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
- La FRGDS Occitanie sous la direction de Christophe Lacz
- Les GDS de l'Ardèche (GDS 07) représenté par Christian Boulon ; de l'Indre (GDMA 36) représenté par Julie Petermann et du Cher (GDS 18) représenté par

Esthel Thieripige, permettant le recrutement des différents élevages et l'organisation du projet au niveau départemental.

- Les Laboratoires Départementaux de l'Ariège (LDV 09) basé à Foix dirigé par Jean-Pierre Alzieu, du Cher (LDV 18) et de l'Indre (36) pour la réalisation des sérologies ELISA des prélèvements effectués

Enfin ce projet a été soutenu financièrement par les subventions de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, la FRGDS Occitanie, le GDS de l'Ardèche et GDS France.

3. Résultats de l'étude préalable (d'après Le Mével, 2017)

Ce projet est la poursuite d'une étude réalisée par une étudiante de l'Université de Brest, Jeanne Le Mével, ayant travaillé en collaboration avec l'UMR INRA/ENVT 1225 IHAP de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse de mars à juillet 2017.

*3.1 Évaluation de la répartition de *B. besnoiti* chez des bovins infectés chroniques*

Le premier objectif était de déterminer la répartition de l'ADN parasitaire de *B. besnoiti* dans différents prélèvements (cutanés et organes internes), chez des animaux infectés en phase chronique de sclérodermie. Pour cela, des résultats de treize autopsies de bovins, réalisées par le service d'anatomie pathologique de l'ENVT entre 2012 et 2017 ont été utilisés. Ces bovins, infectés chroniques en phase de sclérodermie ont été adressés par des éleveurs ou vétérinaires praticiens à l'hôpital de l'ENVT dans un but pédagogique, (Tableau 6).

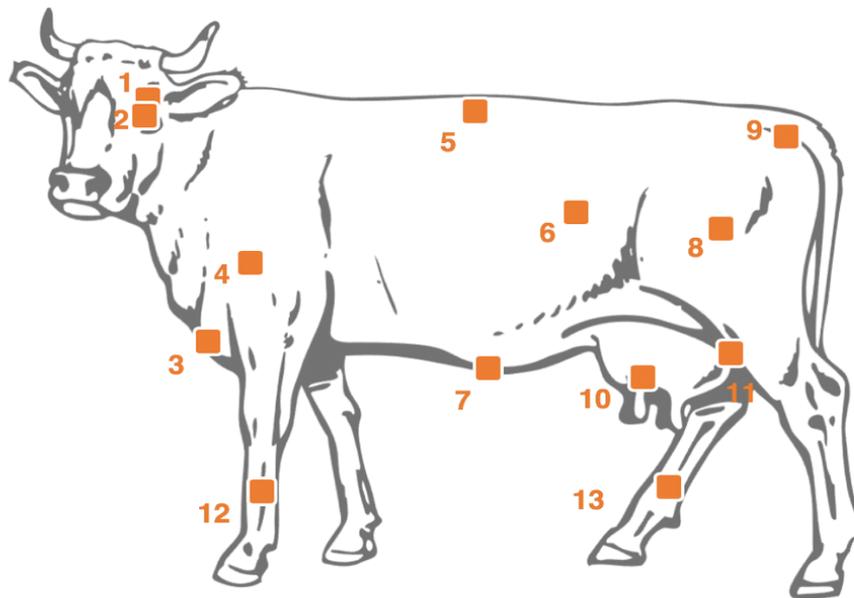
Tableau 6: Liste des bovins infectés chroniques à *B. besnoiti* autopsiés à l'ENVT entre 2012-2017.

Date de l'autopsie	Race	Sexe	N° d'identification
21/11/2012	ND	Taureau	0909309797
01/09/2013	ND	Taureau	5835
15/09/2014	Limousine	Femelle	072
26/05/2015	ND	Taureau	4963
14/09/2015	ND	Femelle	0908378228
02/10/2015	Salers	Femelle	2404869728
26/10/2015	Limousine	Femelle	8132221330
24/02/2016	Charolaise	Femelle	4916311020
01/03/2016	Limousine	Femelle	3100321099
29/09/2016	Limousine	Femelle	1533161411
13/10/2016	Limousine	Femelle	1115002893
12/01/2017	Blonde d'Aquitaine	Femelle	310031575
06/02/2017	ND	Femelle	8121572063

Légende : ND = données non communiquées

D'après Le Mével, 2017.

Les prélèvements réalisés par le service de parasitologie lors de l'autopsie étaient des prélèvements cutanés (Figure 28), d'organes internes et des muqueuses de l'appareil respiratoire et reproducteur, réalisés à l'aide d'un scalpel, de 1x2 cm². Pour les organes internes, ce sont les poumons, le foie, la rate, le cœur, les reins, le diaphragme, du tissu conjonctif sous-cutané, du muscle peaucier et de la muqueuse nasale et trachéale qui ont été prélevés. Des fragments d'ovaire et de muqueuse vulvaire et utérine ont été prélevés chez les femelles tandis que pour les mâles, ce sont le pénis, les testicules, la peau du scrotum, la muqueuse prépucciale, l'épididyme, la vésicule séminale et la prostate qui ont fait l'objet d'analyses (Le Mével, 2017).



Prélèvements externes latéralisés à droite ou à gauche : 1 : paupière ; 2 : sclère ; 3 : fanon ; 4 : épaule ; 5 : ligne du dos ; 6 : flanc ; 7 : ombilic ; 8 : cuisse ; 9 : base de la queue ; 10 : mamelle ; 11 : face interne de la cuisse ; 12 : canon antérieur ; 13 : canon postérieur.

Figure 28: Zones de prélèvements externes réalisés sur les bovins autopsiés à l'ENVV.

D'après Le Mével, 2017.

Après la réalisation d'une PCR temps réel sur l'ensemble des prélèvements, les résultats ont permis de donner les conclusions suivantes :

- Les prélèvements externes et de la sclère ont révélé une quantité d'ADN parasitaire significativement plus importante qu'au niveau des organes internes sur les treize bovins autopsiés : en moyenne, les tissus internes ont obtenu une valeur de Ct = 28 [12,3-39,7] contre Ct = 17 [12,6-34,2] pour ceux des zones externes et la sclère.
- Les prélèvements réalisés au niveau des canons et des parties déclives, zones où se concentrent majoritairement les stomoxes pour leur repas de sang, avaient une quantité d'ADN parasitaire supérieure aux autres prélèvements externes.
- Les muqueuses trachéale et nasale présentaient des taux d'ADN parasitaire plus importants que l'appareil respiratoire profond (poumon).

B. besnoiti ne semble pas être réparti de manière homogène chez les bovins infectés ayant fait un épisode clinique. Les prélèvements cutanés sont significativement plus riches en ADN parasitaire que les organes internes avec une

quantité importante de kystes à bradyzoïtes. Ceci est en lien avec la transmission vectorielle du parasite, facilitée par le tropisme cutané du parasite formant des kystes présents en grande quantité dans le derme (Schaes et al., 2016).

3.2 Définition d'une zone de biopsie cutanée de choix avec la meilleure sensibilité de détection de l'ADN parasite en PCR temps réel.

Des prélèvements de peau à trois localisations différentes (oreille, encolure et la base de la queue), effectués sur des bovins séropositifs asymptomatiques ont été analysés par PCR temps réel. Ces bovins provenaient d'abattoirs situés en zone d'enzootie : l'abattoir de Pamiers (09, Ariège) où 106 animaux ont été prélevés en 2012 ; l'abattoir de Gap (05, Hautes-Alpes) où 30 bovins ont été prélevés en 2016 et l'abattoir de Digne-les-Bains (04, Alpes de Haute-Provence) où 22 bovins ont été prélevés en 2013.

Sur ces animaux, treize bovins ont présenté un signal PCR quantitatif jugé « positif » ($Ct \leq 36$) sur au moins une des trois zones. Sur ces mêmes individus, la zone péri-anale a présenté le plus souvent un signal positif : 85 % contre 62 % pour l'encolure et 69 % pour l'oreille. C'est au niveau de la zone péri-anale que le taux d'ADN parasite était le plus élevé par rapport aux autres prélèvements avec en moyenne un signal PCR : $Ct = 29$.

De ces observations, la zone péri-anale a été définie comme prélèvement de choix pour la réalisation de biopsie cutanée et la détection d'ADN de *B. besnoiti*. L'analyse PCR temps réel peut être faite avec une bonne sensibilité du fait de la forte positivité en ADN parasite. De plus, l'accessibilité de la zone de prélèvement en situation réelle en élevage était un argument favorable. En effet, lorsque les animaux sont au cornadis, contenu par l'encolure, la zone péri-anale est plus facile d'accès tout comme la prise de sang à la veine caudale.

C'est sur ces éléments que s'est appuyé ce projet, d'utiliser la biopsie cutanée de la zone péri-anale pour réaliser le test de diagnostic PCR temps réel avec la meilleure sensibilité pour la détection de l'ADN de *B. besnoiti* dans le suivi des bovins des élevages étudiés.

II. Matériels et méthodes

1. Les élevages de l'étude

Huit élevages ont souhaité participer à l'étude par l'intermédiaire de leur GDS. Ces élevages sont localisés dans différents départements français (Figure 29) : l'Aveyron (12), le Tarn (81), l'Ariège (09), l'Ardèche (07), le Cher (18) et l'Indre (36).

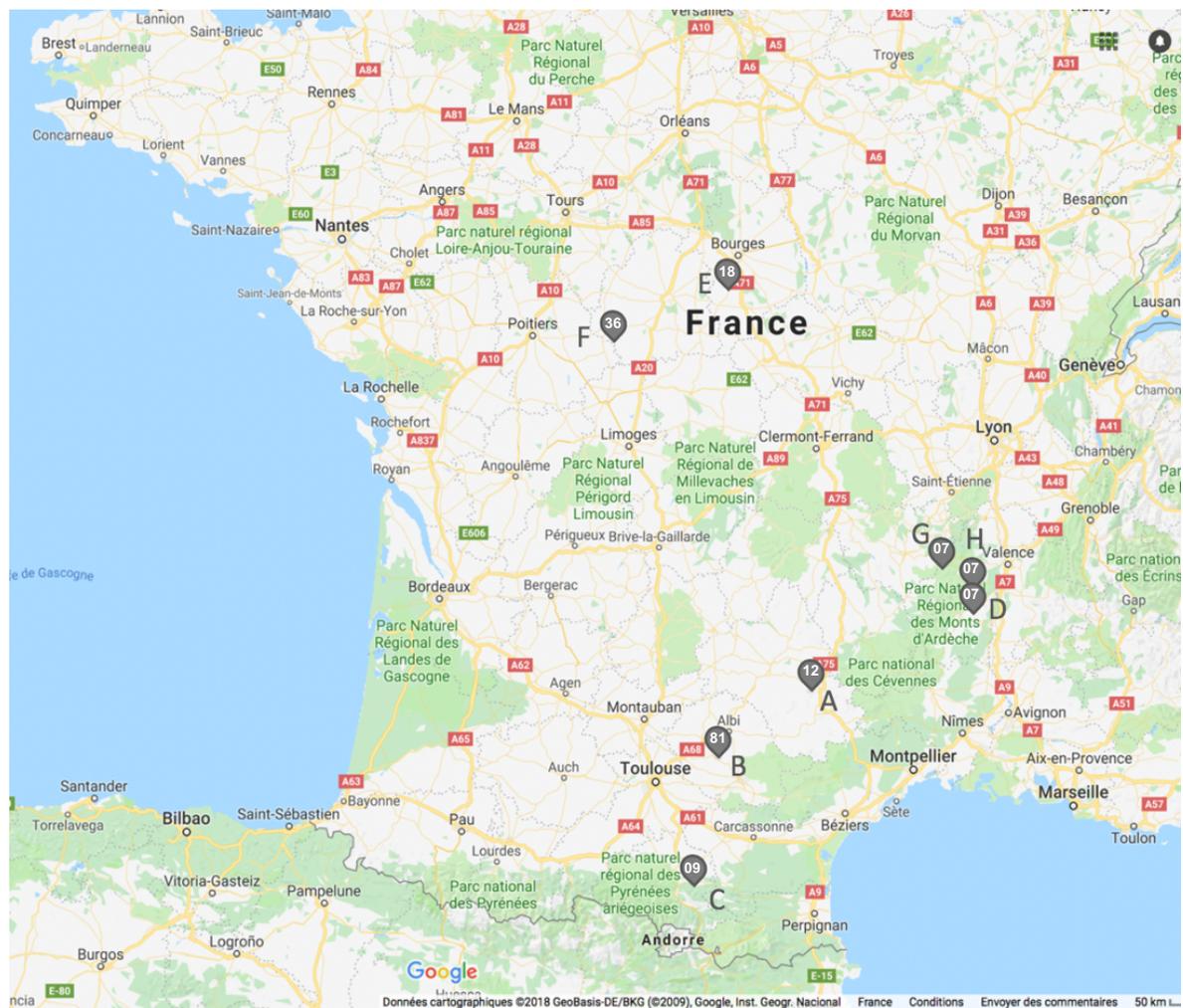


Figure 29: Carte de la répartition des élevages participants à l'étude.

Photographie : googlemap.fr

Ces différents cheptels, dont le taux de séroprévalence était relativement élevé ont été intégré au projet sur trois années différentes, 2017, 2018 et 2019 sur la base des résultats de la campagne de prophylaxie (2016-2017, 2017-2018, 2018-2019). Les sérologies individuelles, réalisées lors de ces campagnes par les différents laboratoires à l'aide du kit ID Screen® *Besnoitia* Indirect 2.0, ont permis d'identifier les individus séropositifs de plus de six mois. De plus, leur point commun est qu'au moins un cas clinique de besnoitiose a été déclaré dans les années précédentes.

- Élevage A

L'élevage A est un élevage laitier de vaches de race Prim'holstein où 32 bovins ont été inclus à l'étude. Le taux de séropositivité initial était de 42 % (24/57) en janvier 2017 avec deux cas cliniques diagnostiqués en septembre 2016.

- Élevage B

L'élevage B est un élevage produisant du veau lourd d'Aveyron de race Blonde d'Aquitaine où 79 animaux ont été prélevés sur la campagne de prophylaxie de 2016-2017. Ce cheptel a présenté un taux de séropositivité de 67 % chez les bovins de plus de 24 mois et 50 % pour les bovins entre 12 et 24 mois. Ainsi 49 bovins séropositifs ont été inclus au projet. De plus, six cas cliniques de besnoitiose ont été détectés entre septembre 2014 et automne 2016.

- Élevage C

L'élevage C est un élevage allaitant de race Limousine produisant des veaux sous la mère. Dans cet élevage, 32 bovins ont été prélevés pour la participation au projet. Cet élevage est celui qui présentait le plus fort taux de séropositivité de l'étude soit 92 %. De plus, cet élevage a été le plus affecté par la maladie : trois cas cliniques ont été déclarés entre 2015 et 2016 et ont été euthanasiés ou réformés suite à un traitement inefficace. En 2017, la situation s'est aggravée puisque huit génisses du troupeau de renouvellement, de moins d'un an, ont déclaré une forme clinique. Un traitement a alors été initié : dans un premier temps des sulfamides (Acti-methoxine®, Biove) à forte dose ont été administrés mais sans succès thérapeutique, relayé par un

traitement à base de spiramycine (Suanovil®, Merial) associé à un diurétique pour la réduction des oedèmes : hydrochlorothiazide et dexaméthasone (Diurizone®, Vetoquinol). Ce traitement a permis une réduction des signes cliniques mais le portage parasite a persisté.

- Élevage D

L'élevage D est un élevage allaitant de race Charolaise ayant intégré le projet en 2018 avec 34 bovins séropositifs, un taux de séropositivité de 51 % ainsi que des cas cliniques détectés depuis 2006.

- Élevage E

L'élevage E est un élevage laitier de bovins de race Prim'holstein dont l'effectif de bovins intégrés à l'étude en 2018 était de 161 avec un cheptel dont le taux de séropositivité est de 74 %.

- Élevage F

L'élevage F est un élevage allaitant avec 163 bovins étudiés pour un taux de séropositivité de 80 % et six cas cliniques déclarés par le passé.

- Élevage G

L'élevage G est un élevage laitier de race Montbéliarde avec un taux de séroprévalence de 52 % (28/54) en 2019. Après réforme de 3 individus, 25 bovins ont été prélevés par biopsies cutanées pour l'étude.

- Élevage H

Enfin, l'élevage H est également un élevage laitier de race Montbéliarde dont le statut négatif du cheptel était connu du fait d'un suivi sérologique depuis trois ans. Sur la période estivale de 2018, neuf animaux ont été révélés séropositifs avec quatre cas cliniques diagnostiqués. L'éleveur a choisi de réformer trois de ces individus or la

situation ne s'est pas améliorée car la séroprévalence a été évaluée à 88 % (21/24) en 2019. Ainsi 22 bovins ont été inclus au projet.

Le tableau suivant est un tableau récapitulatif des données initiales de chaque élevage de l'étude. L'effectif correspond au nombre d'individus séropositifs qui ont été prélevés pour biopsie cutanée et le taux de séroprévalence est celui obtenu d'après les résultats de prophylaxie de l'année 2016-2017 pour les élevages A, B et C ; 2017-2018 pour les élevages D, E, et F et de 2018-2019 pour les élevages G et H. Après discussion avec ces éleveurs, il s'avère que la conduite en deux lots séparés n'était pas réalisable pour des raisons tenant à la conduite d'élevage, notamment pour les laitiers, la disponibilité en parcelle ou encore en bâtiment.

Tableau 7: Tableau récapitulatif des données initiales des huit élevages étudiés.

Élevage	Atelier	Race	Effectif	Séroprévalence (%)	Cas cliniques
A (Aveyron 12)	Laitier	Prim'Holstein	32	42	2 (2016)
B (Tarn 81)	Veau d'Aveyron	Blonde d'Aquitaine	49	67 (> 2 ans) 50 (1-2 ans)	6 (2014-2016)
C (Ariège 09)	Veau sous la mère	Limousine	32	92	3 (2015-2017)
D (Ardèche 07)	Allaitant	Charolaise	34	51	Cas observés
E (Cher 18)	Laitier	Prim'Holstein	161	74	ND
F (Indre 36)	Allaitant	Charolaise	163	80	6
G (Ardèche 07)	Laitier	Montbéliarde	25	52	ND
H (Ardèche 07)	Laitier	Montbéliarde	22	88	4 (2018)

Légende : ND : données non communiquées

2. Les biopsies cutanées

Dans ce projet, un total de 518 biopsies cutanées a été réalisé. Le lieu de prélèvement était la base de la queue (Figure 31) comme cité précédemment sur la base des résultats de l'étude conduite par J. Le Mével (Le Mével, 2017).

Le protocole de prélèvement était le suivant (Figure 31).



1
Etape 1 : Localisation de la zone de prélèvement et désinfection à la Vétédine® solution.



2
Etape 2 : Ponction à l'aide du Biopsy Punch® (6-8mm)



3
Etape 3 : Extraction du fragment à la pince et au bistouri lame 23.



4
Etape 4 : Dépôt du prélèvement dans un tube Falcon 15 ml sans liquide de conservation.



5
Etape 5 : Application d'Aluspray® sur la zone de prélèvement.

Figure 30 : Étapes de prélèvement pour les biopsies cutanées.

Photographies : L.Bottari.

Les tubes contenant les prélèvements ont par la suite été acheminés directement au laboratoire de parasitologie de l'ENVT pour les élevages A, B, C et D ou envoyés par colis express pour les élevages E, F, G et H. Une fois réceptionnés, ils ont été conservés au congélateur à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les analyses ont été réalisées moins d'une semaine après réception des échantillons.

Enfin, pour les élevages A, B, C, D, E, F et H la réalisation des biopsies cutanées a été doublée par un prélèvement de sang sur tube sec (prélevé à la veine coccygienne) afin d'obtenir du sérum le même jour que la biopsie.

3. Analyse PCR temps réel (ou quantitative : qPCR)

Comme évoqué dans la partie précédente, l'ADN parasite de *B. besnoiti* peut être révélé par la réaction de polymérisation en chaîne de manière quantitative ou temps réel. Pour cela, il a fallu dans un premier temps extraire l'ADN de *B. besnoiti* de l'échantillon de peau prélevé. Une quantité de 50 mg d'échantillon de peau prélevé était nécessaire. L'extraction de l'ADN a été réalisée avec le kit QIAmp DNA Mini Kit®, commercialisé par Qiagen selon le protocole établi par le laboratoire de parasitologie de l'ENVT d'après les instructions du fabricant (Annexes).

Après extraction, l'ADN a été distribué à raison de 5 µl par cupule sur une plaque additionné de 20 µl de Mix (ADIAVET, Detection of *Besnoitia besnoiti* Ref : ADI451-200). Le thermocycleur utilisé pour la qPCR était le MX3005P Stratagène programmé de la manière suivante (Tableau 8) :

Tableau 8: Programme du thermocycleur MX3005P Stratagène utilisé pour la qPCR.

Nombre de cycles	1er cycle		45 cycles	
Température (°C)	50	95	95	60
Temps (mm :ss)	02 :00	10 :00	00 :30	01 :00

Ainsi, les résultats obtenus par échantillon ont été directement interprétés selon la valeur de Ct (Tableau 9). L'échantillon a été considéré comme « positif » si la valeur de Ct était inférieure ou égale à 36, l'ADN parasite est donc détecté de manière significative. Si le Ct était compris entre 36 et 40 inclus, l'échantillon était « douteux »

et il a été considéré que l'ADN du parasite était à la limite de détection, enfin au-delà de 40 ou « No Ct » l'échantillon était « négatif ».

Tableau 9: Tableau d'interprétation des valeurs de Ct obtenues en qPCR.

Valeur Ct	Ct ≤ 36	36 < Ct ≤ 40	40 < Ct ou No Ct
Interprétation	« Positif »	« Douteux »	« Négatif »

Ces paramètres de lecture et l'établissement de ces seuils de détection ont été fixés par le laboratoire de l'ENVT selon une gamme étalon de dilution allant de 1.10^5 à 1 tachyzoïte (Tableau 10). Ceci a donc permis de définir la valeur seuil de détection pour un Ct inférieur ou égal à 36.

Tableau 10: Gamme de dilution 105 à 1 tachyzoïte en qPCR d'après (UMR 1125 IHAP).

Nombre de tachyzoïtes	10^5	10^4	10^3	10^2	10	1
Ct	22,6	26,2	29,4	33,2	36,3	No Ct

4. Analyse sérologique par la méthode ELISA

L'analyse sérologique pour la détection des anticorps dirigés contre *B. besnoiti* a été réalisée en utilisant la trousse ELISA ID Screen® Besnoitia indirect 2.0 afin d'établir le statut des individus et la séroprévalence des cheptels étudiés. Pour les élevages A, B, et C, le laboratoire départemental vétérinaire de l'Ariège basé à Foix (LDV 09) a réalisé l'ensemble des tests sérologiques. Pour les autres élevages, ce sont respectivement les laboratoires départementaux, (LDV 07) de l'Ardèche pour les élevages D et H, (LDV 18) de l'Indre pour l'élevage E et (LDV 36) du Cher pour l'élevage F qui ont procédé aux analyses.

5. Analyse sérologique par la méthode Western Blot

C'est au laboratoire de parasitologie de l'ENVT qu'ont été réalisés les tests Western Blot de l'étude d'après la méthode décrite par Cortes et al. (Cortes et al., 2006b).

6. Suivi des élevages après analyse PCR temps réel.

Une fois les analyses réalisées dans les différents laboratoires, les résultats ont aussitôt été communiqués aux éleveurs afin qu'ils prennent leurs dispositions pour réformer le plus rapidement les animaux considérés comme « forts contaminateurs » ($Ct \leq 36$) ou tout au moins, les tenir à l'écart du reste du cheptel jusqu'à leur élimination.

Selon les élevages, la décision de réformer a été plus ou moins respectée en fonction des moyens et possibilités face à la situation rencontrée.

Pour l'élevage A, des analyses sérologiques ont été réalisées en mars 2018, septembre 2018 et février 2019 (respectivement onze, dix-sept et vingt-et-un mois après les analyses PCR temps réel) sur les individus séronégatifs restés au contact d'individus séropositifs afin d'évaluer les taux de séroconversions.

Pour l'élevage C, un suivi sérologique et un nouveau prélèvement de biopsies cutanées sur dix génisses de renouvellement initialement séropositives ont été réalisés en avril 2018 (soit douze mois après les premiers résultats de PCR temps réel).

Enfin, pour l'élevage D, un suivi sérologique similaire a été réalisé en octobre 2018 et mars 2019 (soit six et onze mois après la réalisation des biopsies cutanées). Les situations de ces élevages qui ont fait l'objet d'un suivi seront décrits dans la partie résultats.

Pour les élevages E, G et H, un suivi téléphonique a permis de connaître l'évolution de la situation selon la stratégie de réforme. Nous n'avons pas eu de nouvelles concernant l'élevage F.

7. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé à l'aide du logiciel R studio (1.2.1335, mars 2019) qui a permis les différents tests statistiques ainsi que la modélisation logistique multinomiale pour étudier l'influence de différents facteurs biologiques sur le résultat de la PCR temps réel (cf. partie III 1.3).

Le test de χ^2 d'homogénéité a été utilisé pour voir si la répartition des bovins en fonction de la classe de Ct était différente selon les élevages.

Les histogrammes obtenus pour montrer la répartition des bovins selon leur résultat de PCR temps réel (Ct) dans les différents élevages ont été modélisés à l'aide du tableur Excel (Microsoft Office 2016).

La corrélation de Spearman (rho de Spearman) a été utilisée pour étudier la relation entre les résultats de l'analyse PCR temps réel (Ct) et de la sérologie (DO).

Afin de tester si la population suivait une distribution normale selon les variables Ct et DO, le test de Shapiro-Wilk a été employé (rejet de l'hypothèse de normalité si p-value > 0,05).

Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour étudier la comparaison des médianes de Ct obtenues selon différentes classes de DO.

Enfin un test Wilcoxon-Mann-Whitney a permis de faire la comparaison pour les échantillons appariés, des résultats de sérologie et de PCR temps réel lors des deux périodes de prélèvements (mars 2017 et 2018) pour le suivi de l'élevage C.

III. Résultats

1. Situation sur l'ensemble des élevages

1.1 Répartition des bovins selon la classe de Ct en PCR temps réel.

Sur les 518 bovins prélevés, on remarque que seuls 75 d'entre eux (soit **14 %** de l'ensemble) ont présenté un signal PCR temps réel « positif » ($Ct \leq 36$) sur le fragment de peau prélevé à la base de la queue ; 92 (18 % de l'ensemble) ont obtenu un résultat « douteux » où l'ADN parasite est à la limite de détection ($36 < Ct \leq 40$) et 351 individus (68 %) étaient « négatifs ».

Cette **tendance générale de répartition** en trois grandes catégories selon les valeurs de Ct obtenues se retrouve dans les huit élevages enquêtés (Tableau 11). Or, il semblerait que les répartitions observées des bovins selon la classe de Ct diffère significativement selon les élevages A à H ($p\text{-value} = 2.8.10^{-6}$).

Tableau 11: Tableau de la répartition des bovins par cheptels et pour tous les élevages selon leur résultat de l'analyse PCR temps réel*.

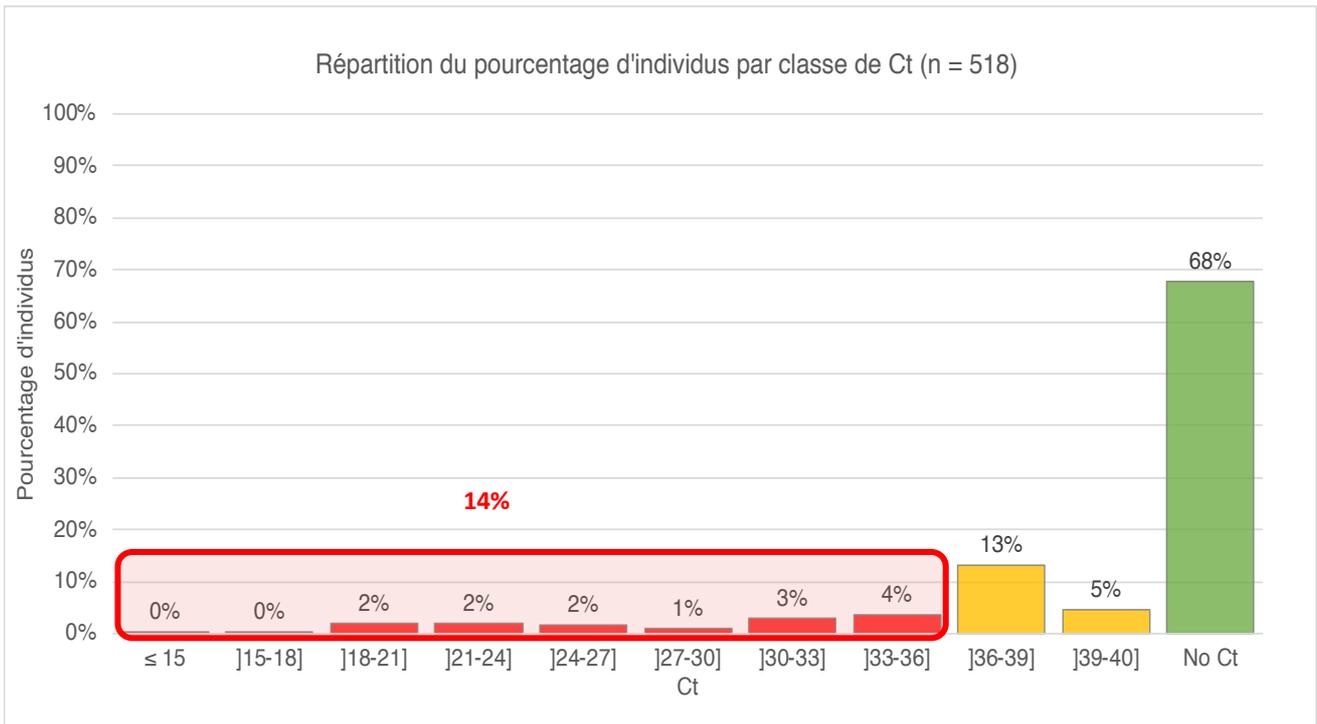
Élevage	n	Ct ≤ 36 « positif »	36 < Ct ≤ 40 « douteux »	NoCt « négatif »
A	32	8 (25)	9 (28)	15 (47)
B	49	6 (12)	12 (25)	31 (63)
C	32	6 (19)	3 (9)	23 (72)
D	34	3 (9)	1 (3)	30 (88)
E	161	16 (10)	14 (9)	131 (81)
F	163	24 (14)	42 (26)	97 (60)
G	25	7 (28)	9 (36)	9 (36)
H	22	5 (23)	2 (9)	15 (68)
TOUS	518	75 (14)	92 (18)	351 (68)

* Les données sont des effectifs (avec pourcentages arrondis à l'unité).

Afin de mieux préciser la répartition des individus, des classes de Ct ont été établies par pas de trois valeurs de Ct entre le minimum (Ct ≤ 15) et le résultat « négatif » (NoCt).

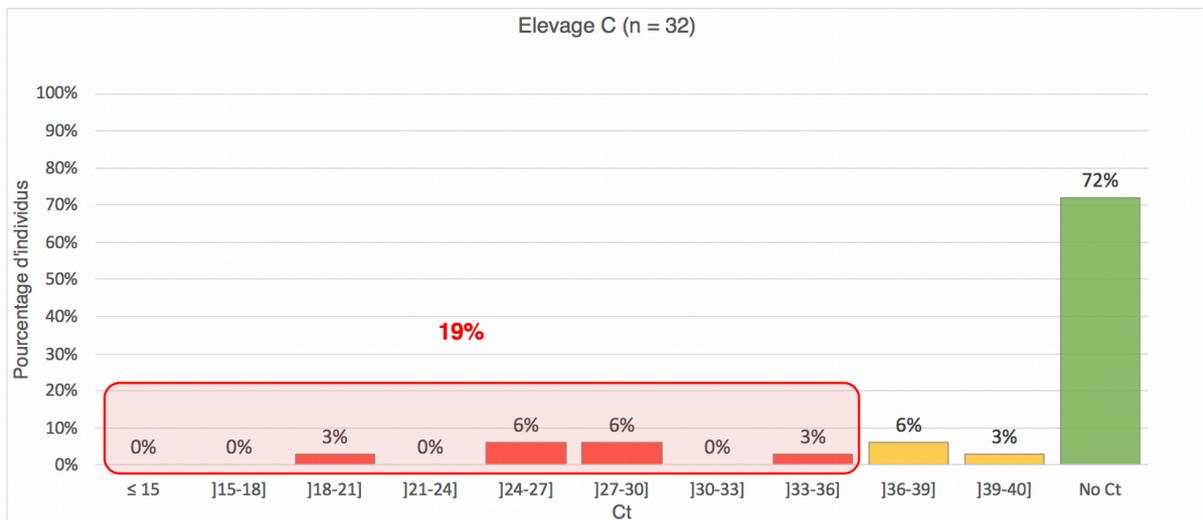
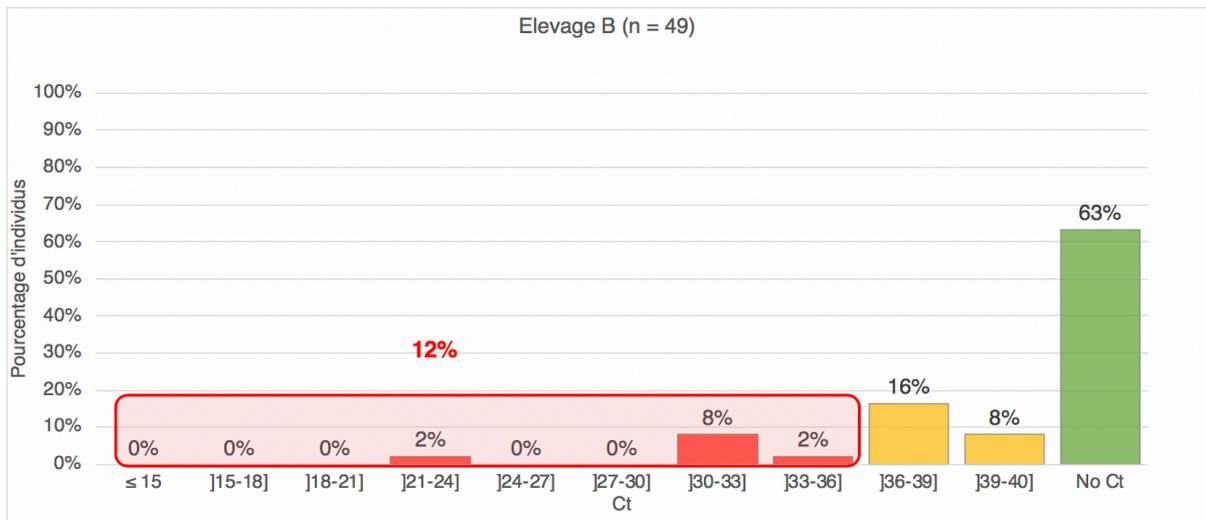
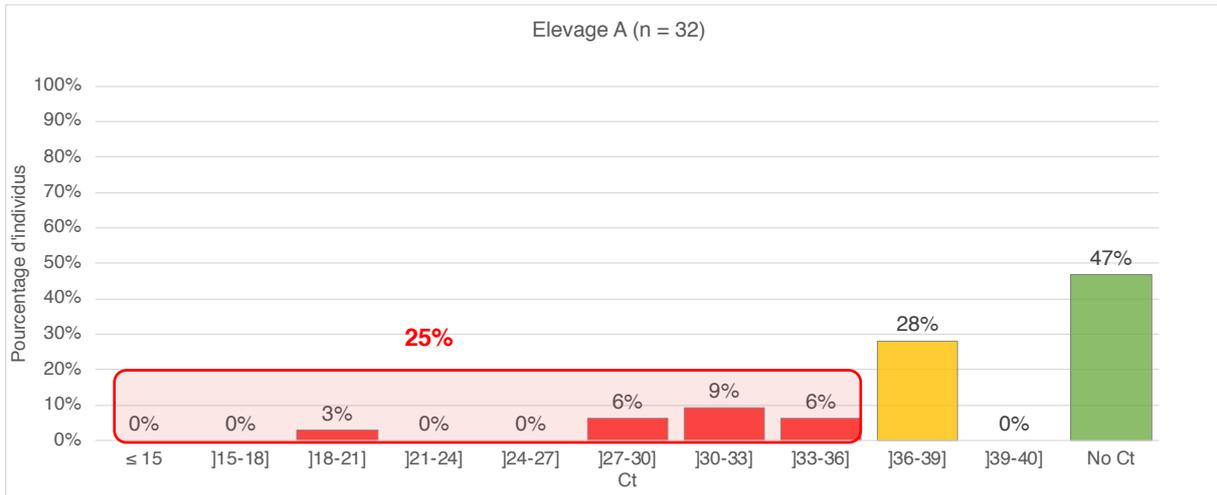
La proportion d'individus ayant une valeur de Ct inférieure ou égale à 36 varie de **9 à 28 %** selon les élevages (Figure 31) quelle que soit leur origine géographique, la taille du cheptel étudié ou l'ancienneté de la maladie au sein de l'élevage. Dans la même tendance que pour l'ensemble des élevages, dans six élevages sur huit le pourcentage d'individus ayant un résultat négatif est **supérieur à 60 %** (Élevage B, C, D, E, F et H) (Figure 32).

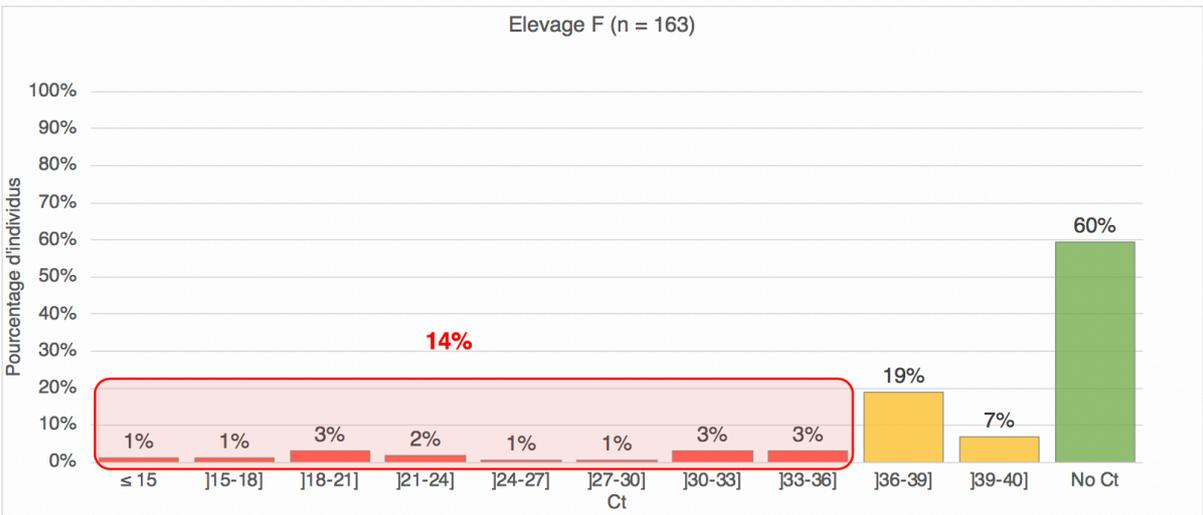
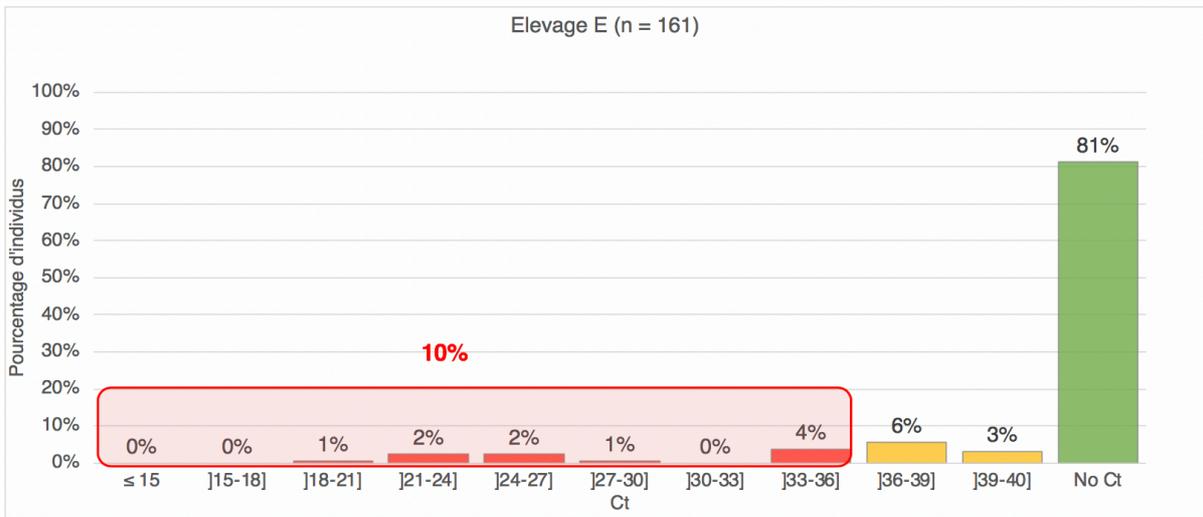
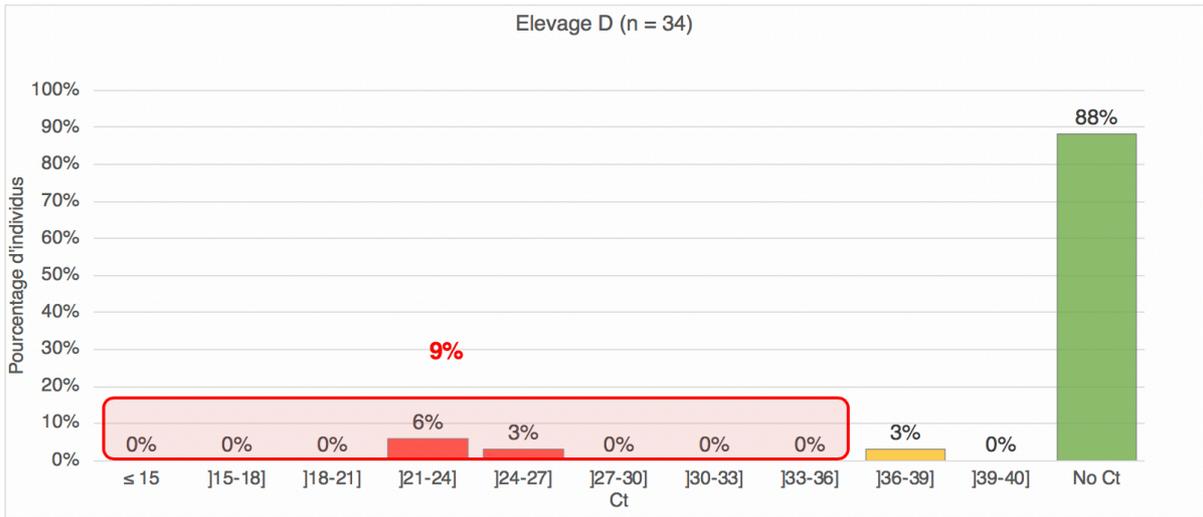
Seuls les élevages A et G présentent des résultats différents avec un taux respectivement de 47 et 37 % des individus ayant un résultat « négatif » et de 28 et 36 % avec un résultat « douteux ». Dans l'élevage G, dans la zone « douteuse » (36 < Ct ≤ 40) on obtient un pourcentage plus élevé des individus ayant un Ct proche du seuil de détection (36 < Ct ≤ 38) en rapport avec ceux ayant un Ct plus élevé, plus proche de la valeur négative (38 < Ct ≤ 40).

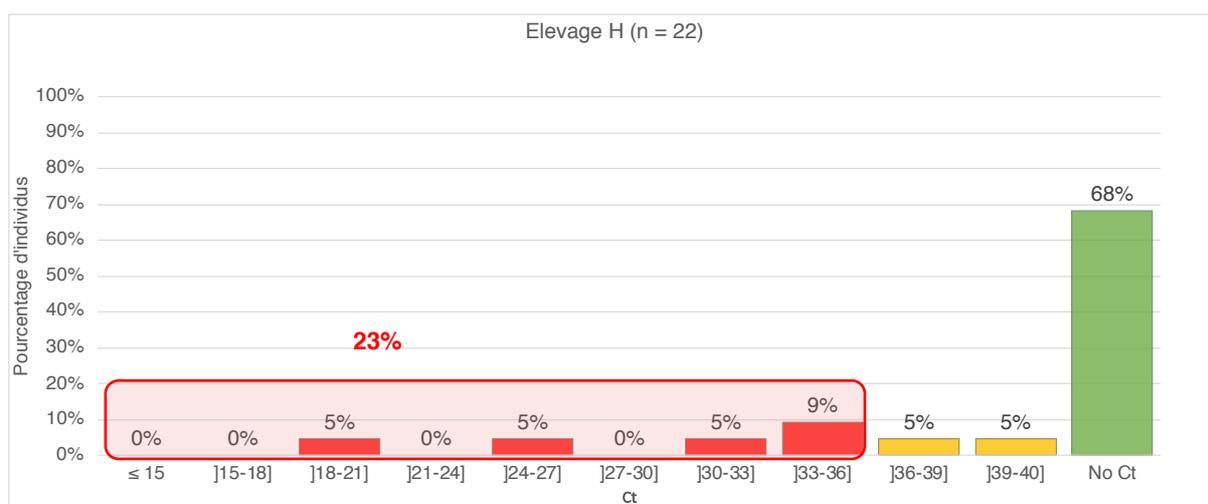
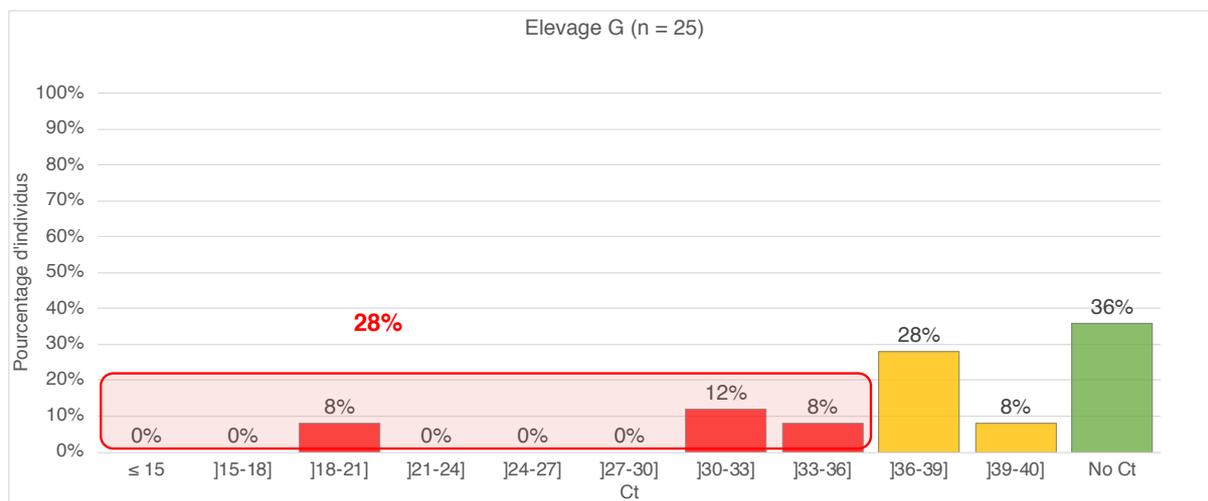


Légende : L'encadré rouge indique les individus dont le résultat PCR temps réel est positif ($Ct \leq 36$).

Figure 31 : Histogramme de la répartition du pourcentage d'individus par classe de Ct pour l'ensemble des élevages.







Légende : L'encadré rouge indique les individus dont le résultat PCR temps réel est positif ($Ct \leq 36$). Les pourcentages obtenus ont été arrondis à l'unité.

Figure 32: Histogrammes de la répartition des individus par classe de Ct pour les élevages A à H.

1.2 Étude de la corrélation entre le titre en anticorps (DO) et le résultat du signal PCR temps réel (Ct).

Pour évaluer la corrélation entre le titre en anticorps (DO) et le résultat obtenu en PCR temps réel (Ct), seuls les 147 individus des élevages A à D ont été pris en compte (par soucis d'un manque de données sur les autres individus des autres élevages ou d'analyses réalisées par des laboratoires différents). Pour les individus ayant obtenu un signal PCR négatif (NoCt) il a été attribué de manière arbitraire la valeur de Ct = 45.

Il semble donc y avoir une **faible corrélation** négative entre le titre en anticorps (DO) et le résultat du signal PCR (Ct) ($p\text{-value} = 0,0015$) avec un coefficient de corrélation de $\rho = -0,26$ (*spearman rank correlation*) (Figure 33).

Cette corrélation est certes statistiquement significative mais a peu de sens du fait du groupe d'individus NoCt (Ct = 45) avec des DO très variables. Or, la répartition graphique montre une certaine tendance : **toutes les vaches dont le Ct ≤ 30 ont obtenu des DO > 110** cependant l'inverse n'est pas vrai.

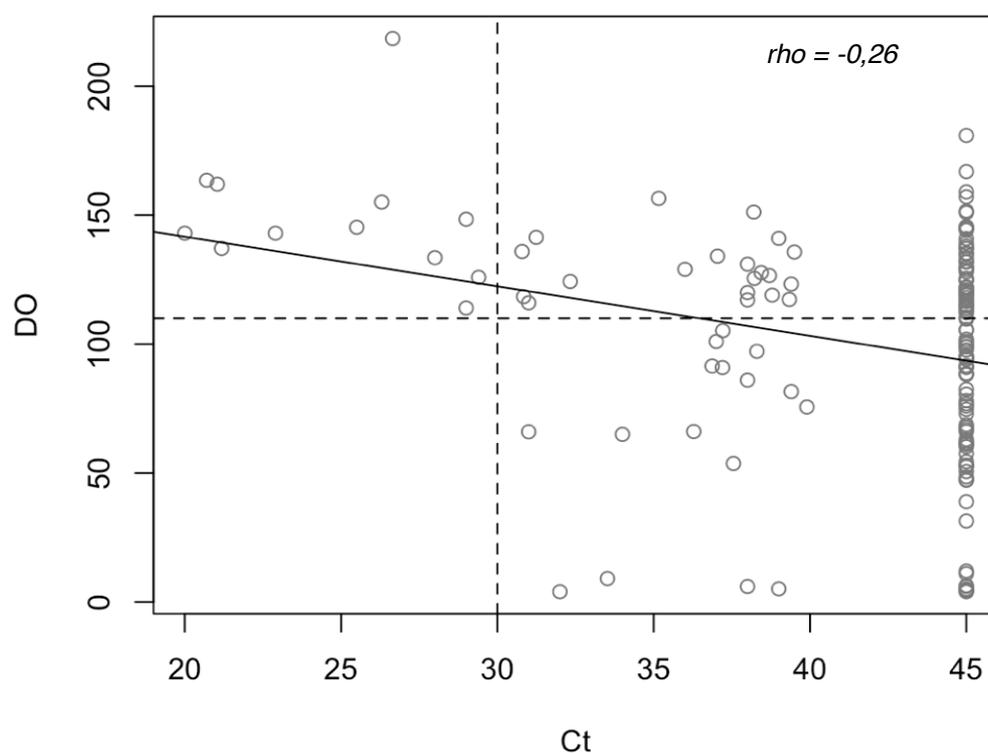


Figure 33: Graphique de la répartition des individus et corrélation linéaire selon le titre en anticorps (DO) et le résultat du signal PCR temps réel (Ct) pour 147 individus des élevages A à D.

1.3 Étude de l'influence de différents facteurs biologiques sur le résultat du signal PCR.

1.3.1 Définition du modèle final

Un modèle logistique multivarié a été créé afin d'estimer quels sont les effets de cinq facteurs : la provenance « Élevage » ; l'âge « Age » ; le résultat de l'analyse sérologique « DO » ; la présence de kystes scléreaux « KS » et l'existence ou non d'une phase clinique « Clinique », sur le résultat de la PCR temps réel « Ct ». Rappelons que l'objectif était de voir s'il existait un profil d'individu type qui pourrait avoir un résultat de Ct « positif » ou « douteux » au vu de l'âge, de la provenance mais surtout de son statut sérologique.

Au préalable une analyse univariée des variables quantitatives « Ct » et « DO » a été réalisée afin d'étudier la distribution des individus et de déterminer différentes classes retenues dans le modèle final avec un effectif suffisant d'individus (résultats présentés dans la partie 1.3.2).

Par une sélection pas à pas descendante (*backward selection*), les variables non significatives ont été retirées du modèle : les variables « KS » et « Clinique » ont ainsi été supprimées par manque d'effectifs pour les classes considérées.

Les interactions de chaque variable indépendante puis par paire, deux à deux, ont été testées mais seuls les effets de chaque variable ont été retenus pour une meilleure stabilité du modèle final.

Pour la modélisation logistique multinomiale, les 147 individus des élevages A, B, C et D ont été retenus. La variable à expliquer était le résultat PCR temps réel : « Ct », définie comme variable qualitative selon deux classes :

- Ct < 40 : « positif » prenant la valeur 1
- Ct ≥ 40 : « négatif » prenant la valeur 0

Les individus jugés « positifs » ($Ct \leq 36$) et « douteux » ($36 < Ct < 40$) ont été regroupés ensemble afin d'avoir un nombre suffisant d'individus par classe. Ce modèle a permis ainsi la comparaison des individus « négatifs » par rapport aux individus « positifs » et « douteux ».

Cette variable « Ct » a été étudiée en fonction de trois facteurs :

- la provenance de l'animal : variable « Élevage » : A, B, C ou D
- l'âge de l'animal : variable « Age » : génisse (≤ 24 mois) ou vache (> 24 mois)
- le résultat de la sérologie : variable « DO » avec 4 classes définies : $DO < 50$ (a) ; $[50-110[$ (b) ; $[110-140[$ (c) et $DO \geq 140$ (d).

Or pour avoir suffisamment d'individus dans chaque catégorie et que la modélisation statistique soit cohérente et exploitable, les individus ayant obtenu un résultat de sérologie $DO < 110$ (ab) et ceux dont la $DO \geq 110$ (cd) ont été groupés.

Afin d'en arriver à ce modèle qui présentait la meilleure stabilité, d'autres modèles ont été testés : un second modèle permettait de comparer uniquement les individus « positifs » et « négatifs » en PCR temps réel en excluant les bovins « douteux » ; un troisième s'intéressait à la comparaison entre les individus « douteux » et « positifs » enfin un dernier modèle permettait de comparer les individus « négatifs » et « douteux ». Pour l'ensemble de ces modèles, les résultats obtenus donnaient les mêmes conclusions que le modèle final mais les estimés et odds-ratios (OR) étaient trop élevés. Ceci étant lié à des effectifs trop faibles dans certaines classes notamment les individus « positifs » en PCR appartenant aux classes de DO faibles.

Le tableau suivant (Tableau 12) regroupe les effectifs et pourcentages pour chaque catégorie des variables permettant de comprendre le modèle final retenu :

Tableau 12: Tableau croisé des effectifs et pourcentages par catégorie des différentes variables (Ct ; élevage ; âge et classe de DO) du modèle logistique multinomial étudié*.

Variables		Ct < 40	Ct ≥ 40	Total
			48 (33)	99 (67)
Élevage	A	17 (12)	15 (10)	32 (22)
	B	18 (12)	31 (21)	49 (33)
	C	9 (6)	23 (16)	32 (22)
	D	4 (3)	30 (20)	34 (23)
Âge	> 24 mois	34 (23)	65 (44)	99 (67)
	≤ 24 mois	14 (10)	34 (23)	48 (33)
DO	< 110	16 (11)	55 (37)	71 (48)
	≥ 110	32 (22)	44 (30)	76 (52)

* Les données sont des effectifs (avec pourcentages arrondis à l'unité) pour un total de 147 individus retenus.

1.3.2 Résultats

- **Analyse univariée de la variable quantitative « Ct »**

Les principaux paramètres statistiques de cette variable ont été calculés et sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 13: Tableau des principales caractéristiques (minimum, 1e quartile (Q1), médiane, moyenne, 3e quartile (Q3), maximum, variance (Var) et écart-type (sd)) de la variable Ct.

Min	Q1	Médiane	Moyenne	Q3	Max	Var	sd
20,00	38,26	45,00	41,28	45,00	45,00	39,97	6,32

D'après l'histogramme représentant la répartition des 147 individus selon leur résultat en PCR temps réel (Figure 34), il y a toujours la même **tendance de distribution** : pour tous les élevages étudiés : 99 bovins (67 %) ont obtenu un signal « négatif » (NoCt) ; 26 (18 %) ont eu un résultat « douteux » et 22 (15 %) ont eu un résultat « positif ». La distribution ne suit pas une loi normale mais est plutôt **bimodale**.

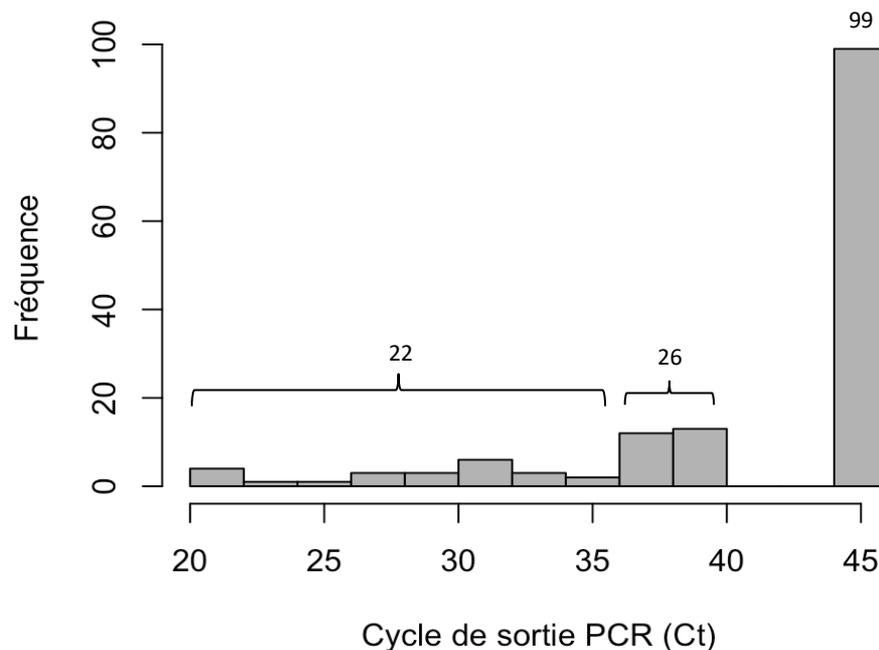


Figure 34: Histogramme représentatif de la distribution des 147 individus des élevages A à D selon leur résultat de PCR temps réel.

- **Analyse univariée de la variable quantitative « DO »**

Tableau 14: Tableau des principales caractéristiques (minimum, 1e quartile (Q1), médiane, moyenne, 3e quartile (Q3), maximum, variance (Var) et écart-type (sd)) de la variable DO

Min	Q1	Médiane	Moyenne	Q3	Max	Var	sd
4,00	73,85	112,90	100,75	131,40	218,50	1841,395	42,91

La répartition des individus selon la variable « DO » semble être **bimodale** : 14 % des individus (21/147) ont un résultat de sérologie « négatif » ou « faiblement positif » (DO < 50) (Figure 35). Pour l'ensemble des individus ayant obtenu un résultat de DO supérieur à 50, la distribution des individus semble être concentrée autour de la valeur moyenne de 100,75 (Tableau 14) avec une proportion importante des individus (plus de 50 %) ayant un résultat entre 100 et 150 (71/126).

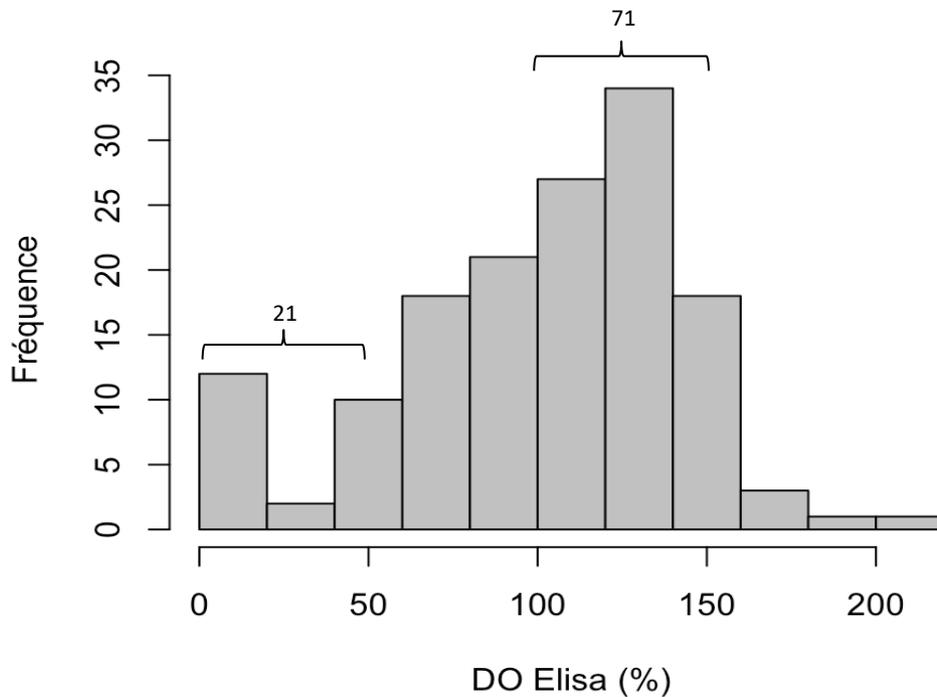


Figure 35: Histogramme représentatif de la distribution des 147 individus des élevages A à D selon leur résultat au test ELISA (%DO).

- **Comparaison du signal PCR temps réel selon les classes de DO**

Enfin, nous avons étudié la répartition des individus selon le résultat de PCR temps réel par classes de DO.

D'après la figure 36, pour les catégories de DO < 50 ; [50-100[; [100-140[la médiane de Ct des individus est égale à 45. Ceci est dû à la forte proportion des individus ayant obtenu un résultat de Ct négatif quelle que soit leur valeur de DO.

De manière significative il y a une tendance à ce que **les individus ayant un résultat de sérologie plus élevé (DO > 110) ait un signal PCR temps réel plus faible donc « douteux » ou « positif »** (*kruskal-wallis test, p-value = 0,007*).

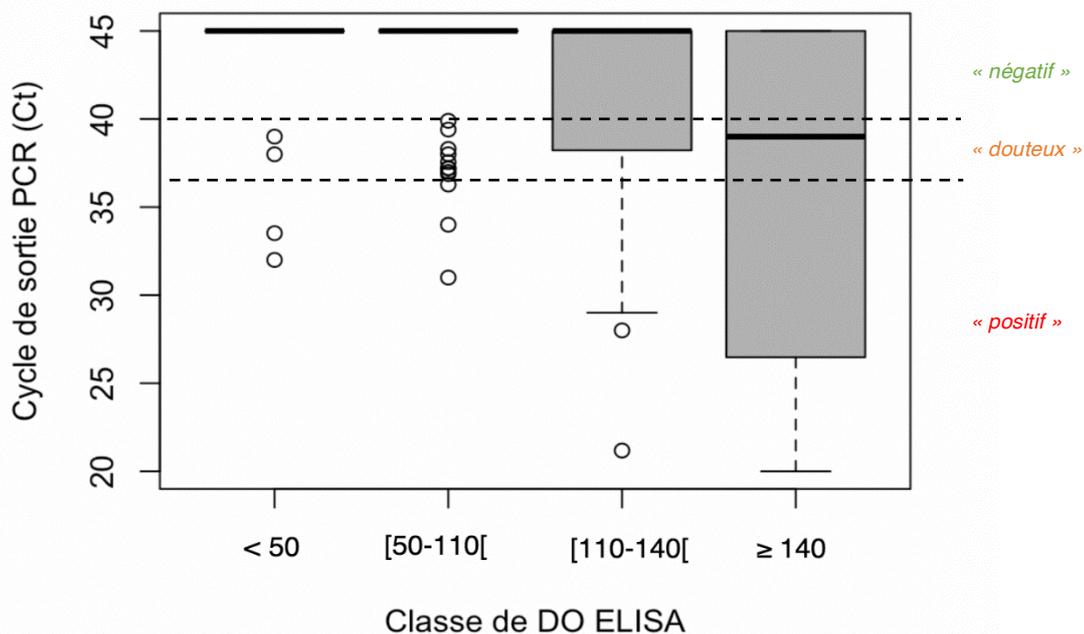


Figure 36: Diagramme boîte à moustache de la répartition des 147 individus selon leur résultat de PCR temps réel par classes de DO.

- **Résultat du modèle logistique multinomial final**

Tableau 15: Résultats de l'analyse de régression logistique multinomiale de la variable Ct (résultat de la PCR temps réel « positif » et « négatif ») en fonction de trois variables : l'élevage, l'âge et le résultat de la sérologie (DO).

Variable	OR (Odds Ratios)	IC 95%*	p-value †
Intercept	7,83	1,55-47,48	1,67.10 ⁻²
Élevage A	Référence	-	-
Élevage B	0,36	0,13-0,94	3,92.10 ⁻²
Élevage C	0,12	0,03-0,43	1,86.10 ⁻³
Élevage D	0,01	0,00-0,07	5,21.10 ⁻⁶
Age : génisse ≤ 24 mois	Référence	-	-
Age : vache > 24 mois	0,09	0,02-0,38	1,85.10 ⁻³
DO < 110	Référence	-	-
DO ≥ 110	2,60	1,18-5,93	1,98.10 ⁻²

* IC 95% : intervalle de confiance à 95%

† : seuil de significativité de p-value < 0,05

D'après le tableau des résultats (Tableau 15), les variables « Élevage », « Age » et « DO » ont un effet plus ou moins important sur la variable « Ct » (d'après la valeur des odds ratios (OR) qui sont exploitables car inférieure à 4).

De cette modélisation statistique, trois conclusions ont pu être émises :

- Qu'elle que soit la provenance de l'animal, il y a un **effet élevage qui est faiblement protecteur** ($0 < OR < 1$) sur la variable « Ct » ($OR = 0,36$ pour l'élevage A ; $OR = 0,12$ pour l'élevage B ; $OR = 0,01$ pour l'élevage C).
- Concernant la variable âge, pour une même valeur de DO (soit < 110 ou ≥ 110), **les vaches adultes sont significativement moins à risque d'avoir un signal PCR « positif » ou « douteux »** ($OR = 0,09$, $IC95\% : 0,02-0,38$, $p\text{-value} = 0,00185$) que les génisses.
- Enfin en ce qui concerne la variable « DO », **l'effet est plus important** sur la variable « Ct » (OR supérieur) que pour les autres variables. On peut également conclure que **les individus dont la sérologie est supérieure ou égale à 110 sont significativement plus à risque d'obtenir un résultat PCR « positif » ou « douteux »** ($OR = 2,60$, $IC95\% : 1,18-5,93$, $p\text{-value} = 0,0198$).

Ces résultats issus de la modélisation statistique sont à prendre avec précaution au vu du très faible nombre d'individus étudiés, mais permettent d'évaluer l'effet de ces trois facteurs sur la variable « Ct ».

2. Situation de certains élevages selon des stratégies de gestion différentes.

Après avoir fait une étude des résultats obtenus sur l'ensemble des élevages étudiés, nous nous sommes intéressés au suivi et à l'évolution de la situation de certains élevages selon des stratégies de gestion différentes.

Malgré l'engagement et la volonté d'adhérer au projet, mais aussi par faute de moyens ou selon la situation des cheptels, tous les éleveurs n'ont pas suivi les conseils prodigués suite aux résultats obtenus à l'échelle de leur troupeau. Pour les élevages B et E, aucune mesure n'a été mise en place et nous n'avons pas eu de nouvelles informations concernant la situation de l'élevage F.

Cependant, un état des lieux de la situation des élevages A, C et D pour lesquels nous avons eu un suivi plus précis sur une période allant d'un à trois ans a été réalisé. Pour les élevages G et H nous avons eu des nouvelles concernant la situation au sein des élevages par contact téléphonique.

2.1 Une stratégie de réforme rapide des individus « forts contaminateurs »

Plusieurs éleveurs de l'étude ont décidé d'adopter la stratégie de réforme rapide des individus jugés « forts contaminateurs ». En effet, suite aux résultats de l'analyse PCR temps réel sur la biopsie cutanée, il leur était conseillé de réformer les individus dont le signal PCR était inférieur ou égal à 36. Cette stratégie de réforme a été adoptée par les élevages A, D, G et H.

2.1.1 *Le suivi de l'élevage A*

L'élevage A est l'élevage pour lequel nous avons réalisé un suivi sur trois années consécutives 2017, 2018 et 2019 après les premiers prélèvements initiaux de mars 2017.

Un résumé de la situation de cet élevage est présenté sur la frise suivante (Figure 37) selon l'analyse des données obtenues (Tableau 16).

31 sérologies et 13 biopsies cutanées réalisées

Résultat sérologie ELISA :
- Maintien des titres en anticorps des individus séropositifs

Résultat PCR :
- 8/13 séropositifs sont restés PCR « négatif »
- 2/13 séropositifs sont passés de PCR « douteux » à « négatif »
- 2/13 séropositifs sont passés de PCR « négatif » à « douteux »
- 1/13 séronégatif est passé de PCR « positif » à « négatif » (n° 8146)

Séroprévalence initiale = 42%*

24/57 bovins adultes (> 24mois)

33 sérologies réalisées sur bovins séronégatifs au contact des séropositifs PCR « négatif »

Résultat ELISA :
- 3 nouvelles séroconversions (3/33)

Taux de séroconversion = 9%

Janvier 2017 Mars 2017 Avril 2017 **Mai 2017 Réforme de 7 bovins PCR « positif » séropositifs** Février 2018 Septembre 2018 Février 2019



Mai 2017 Réforme de 7 bovins PCR « positif » séropositifs



38 sérologies et biopsies cutanées réalisées (25 séropositives, 7 séronégatives, 6 statut inconnu) *

Résultat sérologie ELISA :
- 92% (23/25) des bovins sont restés séropositif
- 2/25 sont devenus séronégatif
- 2/7 ont séroconvertis
- 6 statut inconnu : 1 séropositif et 5 séronégatifs

Résultat PCR :
- 27% (7/26) séropositifs sont PCR « positif »

30 sérologies réalisées sur bovins séronégatifs au contact des séropositifs PCR « négatif »

Résultat ELISA :
- 1 séroconversion (1/30)

Taux de séroconversion = 3%

53 sérologies réalisées sur bovins séronégatifs et 2 sur bovins séropositifs

Résultat ELISA :
- pas de nouvelle séroconversion
- augmentation des titres en anticorps des bovins séropositifs (98,9 à 129,4 et 95,1 à 114,7)

Taux de séroconversion = 0%

* résultats issus de la campagne de prophylaxie de l'année 2016-2017

Figure 37: Frise événementielle du suivi des analyses et résultats obtenus pour l'élevage A de 2017 à 2019.

Tableau 16: Résultats des analyses sérologiques et PCR temps réel des 32 bovins aux différentes périodes de prélèvements de l'année 2017 de l'élevage A.

	Janv-17	Mars-17		Avr-17		Statut
n° BV	ELISA (DO)	ELISA (DO)	PCR (Ct)	ELISA (DO)	PCR (Ct)	
4001	116	97.9	31	92.3	NE	Réformée
4010	63	35.8	No Ct	33.3	NE	
8083	8	105,2	28	133.5	NE	Réformée
8084	91	80.4	No Ct	66.7	NoCt	
8087	141	127.9	39	159.2	NoCt	
8093	119	109	No Ct	107.8	NE	
8094	NE	116.9	No Ct	NE	NE	Réformée
8109	151	128.5	No Ct	153.9	NoCt	
8110	11	52,9	No Ct	98.9	NoCt	
8124	5	3.8	No Ct	5.6	NE	
8138	143	125.7	No Ct	117.1	38	
8139	131	119.6	38	135.5	NE	
8146	1	4.4	32	4	NoCt	
8148	95	130.2	No Ct	145.5	NoCt	
8149	91	5,7	39	5.1	NE	
8150	129	98	No Ct	120	38	
8151	66	41.8	31	28	NE	Réformée
8154	6	6.5	No Ct	7.2	NE	
8164	143	124.5	20	NE	NE	Réformée
8166	99	89	No Ct	96.1	NE	
8170	118	108.1	No Ct	119.1	NoCt	
8191	6	5.6	38	4.4	NE	
8206	86	114.7	38	94.5	NE	
8249	91	96.3	No Ct	87.6	NoCt	
9534	12	9.9	No Ct	10.4	NE	
9554	62	96.1	No Ct	96.6	NE	
9555	101	116	37	110.4	NoCt	
9563	129	128	36	129.2	NE	
9567	92	124.4	No Ct	151.2	NoCt	
9573	114	85.1	29	94.5	NE	Réformée
9574	65	32	34	46.2	NE	Réformée
9585	128	122,9	NoCt	129,4	NoCt	

Légende : en rouge sont les valeurs définissant le statut « positif » (DO > 30 pour l'ELISA et Ct ≤ 36 pour la PCR) ; en orange les valeurs PCR « douteux » (36 < Ct ≤ 40) ; surligné jaune : les séroconversions ; NE = Non effectuée.

La séroprévalence initiale était de 42 % (d'après les résultats de la campagne de prophylaxie 2016-2017). Les analyses sérologiques réalisées en mars et avril 2017 ont permis de mettre en évidence une **stabilité du statut des individus initialement séropositifs** avec un **maintien des titres en anticorps** ainsi que **deux séroconversions** sur la période de janvier à mars 2017 (Tableau 16).

Suite aux résultats obtenus en biopsie cutanée de mars 2017, l'éleveur a eu une réaction de réforme rapide de sept bovins en mai 2017, dans les deux semaines suivant l'obtention du résultat de l'analyse, afin de protéger son cheptel et surtout les

plus jeunes qui allaient intégrer le troupeau en lait séropositif. Il était donc intéressant de faire le suivi de ces individus séronégatifs laissés au contact des individus séropositifs mais PCR « négatifs » ou « douteux » qui ont été conservés.

La stratégie adoptée dans cet élevage de réforme rapide des individus dont le résultat de signal PCR était inférieur au seuil choisi ($Ct \leq 36$) a permis d'obtenir **un taux de séroconversion de seulement 3%** dix mois plus tard (entre mars 2017 et février 2018). Ce taux a légèrement augmenté sur la période de février à septembre 2018 s'élevant à 9% avec trois nouvelles séroconversions. Or, **aucune nouvelle séroconversion n'a été observée entre septembre 2018 et février 2019.**

Par manque de données concernant les individus testés il n'a pas été possible d'identifier un profil d'individu ayant fait une séroconversion d'une année sur l'autre (en termes d'âge, de phase clinique ou non et de kystes scléreaux observés), cependant le titre en anticorps de ces individus est resté stable sur les différentes périodes de prélèvement (données en Annexes).

Les analyses PCR réalisées en mars et avril 2017 ont mis en évidence un phénomène important concernant le statut d'un individu testé en PCR temps réel. D'après les résultats des treize bovins prélevés de nouveau en avril 2017 par biopsie cutanée à la base de la queue, au côté opposé à la zone de prélèvement de mars 2017, il semble qu'il y ait une stabilité de la valeur de Ct obtenue (Tableau 16) : huit individus sont restés « négatif » et quatre ont changés de statut (« douteux » à « négatif » ou inversement).

Le seul bovin qui a obtenu des résultats différents de la tendance est l'animal n° 8146. Cet animal a obtenu une seule fois un signal PCR « négatif » en mars 2017 avec un $Ct = 32$ alors qu'il était séronégatif à chaque prélèvement.

2.1.2 Le suivi des élevages D, G et H

Concernant l'élevage D, les individus catégorisés comme « forts contaminateurs » ont été séparés du reste du troupeau (dans un bâtiment isolé d'une distance de plus de 200m) en attendant d'être réformés. Au total **7 individus sur les 34 bovins étudiés**

ont été réformés et **aucune séroconversion** n'a été observée un an après les premières analyses (mars 2019).

Pour les élevages G et H, une réforme rapide de sept individus a été réalisée (en juin 2019) dans chacun des élevages et **aucun nouveau cas clinique** n'a été observé trois mois après réforme (Tableau 17).

Tableau 17: Tableau récapitulatif de la situation actuelle (septembre 2019) des élevages G et H.

	Séroprévalence Initiale (%)	% ind « positif » (Ct ≤ 36)	Nbre de reformes	Situation sept 2019 *
Élevage G (n=25)	52	28	7	Absence de nouveaux cas cliniques
Élevage H (n=22)	88	23	7	Absence de nouveaux cas cliniques

* informations recueillies par contact téléphonique

2.2 Le devenir du troupeau de renouvellement dans un cheptel contraint de vivre avec la maladie.

L'élevage C est celui dont la séroprévalence initiale était la plus élevée de tous les élevages de l'étude avec un taux de 92 % (24/26) en janvier 2017. Suite à de tels résultats, 32 bovins ont été prélevés pour être inclus à l'étude (biopsie cutanée et prise de sang) dont les 8 génisses ayant présenté une phase clinique en avril 2017. Au total, neuf bovins ont obtenu des résultats intéressants et ont fait l'objet du suivi pour l'étude (Tableau 18). Il s'est avéré que ces neuf animaux étaient les génisses de renouvellement (n° 14XX) :

- Six génisses se sont révélées positives en PCR temps réel (Ct ≤ 36) en mai 2017 avec des titres en anticorps élevés (5/6 avaient un titre en anticorps supérieur à 120 : n°1417, 1418, 1424, 1425 et 1427, *valeur en rouge*)
- Trois ont obtenu un résultat négatif en PCR (NoCt) (n° 1421, 1426 et 1432) mais une était séropositive (n° 1432, titre en anticorps de 145,5, *valeur en orange*)

Face à cette situation où **66 % du cheptel de renouvellement s'est avéré « positif » en PCR temps réel**, l'éleveur s'est retrouvé dans l'impossibilité de réformer ces individus et a choisi de les garder.

Lors du suivi sur ces mêmes individus un an plus tard (avril 2018) **tous les animaux étaient séropositifs** ($DO > 30$) avec **deux séroconversions** de génisses initialement négatives en PCR et en sérologie en mai 2017 (n°1421 et n°1426).

De plus, **le titre en anticorps de l'ensemble des individus testés est significativement plus élevé** (écart d'augmentation DO positif) que lors des analyses réalisées un an plus tôt (*test Wilcoxon-Mann-Whitney, p-value = 0,002*).

Tableau 18: Tableau des résultats des analyses PCR temps réel et sérologies du suivi des génisses de renouvellement de l'élevage C entre mai 2017 et avril 2018.

n° BV	Mai-17		Avr-18		Écart d'augmentation DO
	PCR (Ct)	ELISA (DO)	PCR (Ct)	ELISA (DO)	
1416	33,52	9,1	34,86	194	+ 184,9
1417	26,3	155,1	25,7	204	+ 48,9
1418	20,7	163,5	23,88	203	+ 39,5
1421	No Ct	4,5	No Ct	209	+ 204,5
1424	25,5	145,3	16,35	223	+ 77,7
1425	29,4	125,9	25,54	205	+ 79,1
1426	No Ct	4	No Ct	208	+ 204
1427	29	148,4	36,01	216	+ 67,6
1432	No Ct	145,5	35,07	187	+ 41,5

En ce qui concerne les résultats des biopsies cutanées, sur les six génisses qui avaient obtenu un résultat « positif » en mai 2017, cinq d'entre elles (83 %) ont toujours **un résultat « positif »** ($Ct \leq 36$) et une est passée du statut de « positif » à « douteuse » mais avec une valeur très proche du seuil de positivité (n° 1427, *valeur en orange, Ct = 36,01*). Sur les trois génisses qui s'étaient avérées négatives en PCR temps réel en mai 2017, l'une d'entre elle est devenue positive (n°1432) mais à la valeur limite du seuil ($Ct = 35,07$, *valeur en orange*) et avec une augmentation de son titre en anticorps (de 145,5 à 187%) enfin les deux autres sont restées négatives en PCR mais ce sont celles qui ont séroconverties (n°1421 et 1426). **Il n'y a pas de différences significatives concernant le résultat de PCR temps réel** entre les périodes de mai 2017 et d'avril 2018 (*test de Wilcoxon-Mann-Whitney, p-value = 0,62*).

Enfin, dans cet élevage, le lot de génisses d'un an avait été également prélevé pour analyse sérologique en avril 2018 et **toutes s'étaient révélées positives**.

Ainsi face à cette situation où l'éleveur est contraint de vivre avec la maladie, nous lui avons conseillé de traiter l'ensemble du troupeau (vaches et génisses) avec un antiparasitaire externe (Versatrine®) afin de lutter contre les insectes hématophages et de protéger les plus jeunes. Essayer de connaître la situation des élevages voisins par rapport à la maladie, notamment le statut des cheptels les plus proches, était également une recommandation que nous lui avons faite

IV. Discussion

Par cette étude, nous avons apporté certaines informations nous permettant de mieux comprendre la dynamique de l'infection à *B. besnoiti* chez un bovin.

1. Une tendance de répartition des bovins « forts contaminateurs » dans un cheptel à forte séroprévalence

Il existe une faible proportion de bovins séropositifs parmi lesquels on parvient à détecter l'ADN parasite de *B. besnoiti* de manière significative (Ct \leq 36) dans un prélèvement de peau à la base de la queue. Cette observation a été faite dans les huit élevages de notre étude, quelle que soit l'origine géographique, la taille ou l'ancienneté face à la maladie. Cependant une telle observation pourrait provenir d'un manque de sensibilité de notre méthode.

On pourrait se demander si la proportion de bovins séropositifs porteurs de kystes cutanés ne serait pas plus importante que celle que nous arrivons à détecter ? De ce fait, faut-il remettre en cause le kit commercial quantitative real-time PCR kit AdiaVet™ Besnoitia que nous avons utilisé ? Il semblerait que non puisque celui-ci permet la détection de l'ADN de 1 à 2 parasites (Esteban-Gil et al., 2014). Or, il est décrit de manière classique qu'un seul kyste peut contenir des milliers de bradyzoïtes. De plus, le traitement de l'échantillon avant extraction de l'ADN (par digestion du fragment de peau à l'aide de la protéinase K) permet de rompre la paroi du kyste et d'avoir accès

à l'ADN parasitaire. On peut alors dire qu'un résultat négatif sur nos échantillons testés indique qu'il n'y avait pas de kystes de *B. besnoiti* dans le prélèvement étudié.

Ainsi, avec une telle répartition, **il semblerait que cette notion d'individu qualifié de « super spreader » s'applique à la besnoitiose bovine** en retrouvant cette tendance de distribution : **un faible nombre d'individus abriterait une quantité importante de parasites et représenterait une source à fort potentiel de transmission pour le cheptel.**

2. Le choix de la valeur seuil pour la qualification d'un bovin « positif » à l'analyse PCR temps réel

Le choix de la valeur seuil pour un résultat jugé « positif » ($Ct \leq 36$) a été déterminé de manière arbitraire et selon les différentes études similaires de la littérature. Pour les individus jugés « douteux » ($36 < Ct \leq 40$), on peut remettre en cause ce statut attribué sur le résultat de la biopsie cutanée. En effet, le diagnostic par PCR reste une méthode d'une bonne sensibilité pour détecter l'ADN parasitaire, même en quantité très faible, mais pour ces individus faiblement infectés, il semblerait que le résultat ne soit pas répétable. Ainsi on pourrait dire que le statut de ces individus est plutôt « positif » que « douteux » mais on ne peut l'admettre avec certitude. Ceci remet en cause le fait de ne pas avoir pris en compte ces individus lors des décisions de réforme.

Or, même si la conclusion suivante est fondée sur un faible nombre d'individus et à deux dates de prélèvements relativement proches (un mois d'écart), le suivi des bovins de l'élevage A nous a permis de souligner le fait que **les résultats PCR obtenus pour un même individu sur deux prélèvements différents sont proches. Le statut de l'individu reste stable en PCR (« négatif » ou « douteux ») dans la majorité des cas.**

3. Une répartition hétérogène des kystes induisant des individus « faux négatifs » sur un unique prélèvement cutané.

On peut également évoquer la répartition des kystes et imaginer qu'ils soient répartis de manière très hétérogène dans la peau des bovins infectés. Ceci n'a pas été observé chez les bovins ayant fait une phase clinique qui présentaient des résultats

très « positifs » en PCR temps réel quelle que soit la zone de prélèvement de peau (Le Mével, 2017). Or d'après Lienard et al. (2012), lorsqu'au moins une des localisations cibles (base de la queue, encolure ou oreille) donne un résultat « positif » à l'analyse PCR chez un bovin séropositif asymptomatique, dans neuf cas sur dix on retrouve de l'ADN parasite à la base de la queue.

De ce fait, **on ne peut pas exclure qu'une petite fraction des bovins jugés « négatifs » en PCR temps réel lors de notre étude étaient porteurs de kystes dermiques à un autre endroit que celui prélevé.** C'est un des biais à admettre et un risque nous avons pris dans cette expérimentation car il était impossible de multiplier le nombre de prélèvements sur un même individu vigile le même jour. Le choix de la base de la queue est un compromis entre l'exigence d'une sensibilité d'analyse maximale et la faisabilité en situation réelle lors des prélèvements en élevage.

C'est une notion capitale à considérer qu'**on ne peut qualifier un individu de « non dangereux pour la transmission » sur le simple fait qu'il ait obtenu un résultat « négatif » à une seule analyse d'un fragment de peau à la base de la queue par PCR temps réel.**

4. Une faible corrélation entre le titre en anticorps et la richesse en ADN parasite dans le derme.

Nous avons évalué le lien entre le titre en anticorps d'un individu séropositif et son résultat PCR temps réel du fragment de peau. Schares et al (2011) avait remarqué une corrélation positive entre le titre en anticorps et la quantité d'ADN parasite détectée par PCR. De même, Frey et al (2013) ont chez un bovin ayant le plus haut taux d'anticorps, trouvé la plus grande charge d'ADN parasite.

Il semblerait en effet que les individus ayant obtenu des valeurs de Ct faibles en PCR temps réel, donc « positifs », possèdent des titres en anticorps plus élevés.

Cette information confirme l'idée qu'un individu « fort contaminateur » présente un résultat de sérologie élevé et permet de renforcer la relation entre l'importance de la charge parasite et la réponse en anticorps. Cependant ces conclusions fragiles sont fondées sur un nombre très limité d'individus pour lesquels nous disposions de ces deux informations.

Enfin, la modélisation statistique nous a permis d'étudier **l'influence de certains facteurs (la provenance, l'âge et le titre en anticorps) sur la charge parasitaire du bovin** (par son résultat d'analyse PCR) mais **elle ne nous a pas permis de déterminer avec certitude un profil type d'individu que l'on pourrait qualifier de « super-spreader »**. Une des limites de cette étude est de n'avoir pu recueillir toutes les informations sur chacun des individus inclus au projet afin d'obtenir un échantillon plus conséquent et de donner une meilleure fiabilité à nos résultats. Ceci pourrait être l'une des perspectives de ce projet.

5. Un suivi des élevages plus ou moins rigoureux et des succès variables

En ce qui concerne le suivi des élevages après la phase de prélèvements de biopsies cutanées, la motivation de poursuivre l'étude et surtout l'acceptation de nos conseils donnés aux éleveurs ont été différentes selon les élevages malgré leur engagement. Lorsque l'élimination ou la mise à l'écart des bovins considérés à risque de transmission a pu être réalisée dans les plus brefs délais (élevages A et D), **les incidences sérologiques étaient relativement faibles** six à dix-huit mois plus tard. **Ce résultat est très encourageant et montre l'efficacité de cette stratégie afin de diminuer la prévalence de la maladie au sein du cheptel.** Au contraire, dans les élevages B et C où aucune mesure n'a été prise, **les incidences sérologiques étaient beaucoup plus élevées.**

Néanmoins, au vu du faible nombre d'élevages inclus dans cette étude, **ces conclusions sont valables à l'échelle du projet mais ne peuvent être des conclusions générales.** De plus, ces solutions ont montré leur efficacité pour des élevages de taille variable et ayant bénéficié d'un soutien financier, mais **on ne peut affirmer obtenir un tel succès pour des cheptels dont l'effectif serait plus important que ceux de l'étude.** En effet ces stratégies de réforme ou de mise en lot étaient réalisables dans ce cas mais il ne faut pas négliger que ce sont des solutions coûteuses, qui demandent de l'investissement humain et un temps de travail supplémentaire. Cependant les cas d'éradication de foyers par la stratégie de réforme en Dordogne, dans les Pyrénées Atlantiques ou bien en Loire-Atlantique par la mise à

l'écart des bovins séropositifs (Le Mével, 2017) sont des exemples fort encourageants pour poursuivre dans cette voie.

Enfin, il est regrettable mais indépendant de notre volonté, que certains éleveurs n'aient pas poursuivi la démarche du projet en décidant de ne rien faire suite aux résultats obtenus.

Dans l'élevage C, nous avons réalisé un suivi précis des génisses dont la sérologie et le résultat de la PCR étaient fortement positifs aux deux périodes de prélèvement (mars 2017 et 2018). Ceci semble montrer, même si là encore il s'agit d'un très faible nombre d'individus, que **le statut de « fort contaminateur » persiste dans le temps** et renforce l'intérêt d'éliminer ces individus le plus rapidement possible. On peut supposer **une certaine pérennité du nombre de parasite au sein des kystes cutanés**. En revanche, il serait intéressant de suivre dans le temps les bovins séropositifs pour lesquels nous n'avions pas pu détecter d'ADN dans le prélèvement de peau. En admettant que la proportion de bovins séropositifs présentant des kystes dans leur peau est plutôt faible, cela a de grandes incidences sur notre compréhension de l'interaction entre un bovin et *B.besnoiti*. **Ainsi, on pourrait supposer qu'une grande majorité de bovins soit en mesure de contenir la multiplication du parasite une fois l'infection déclarée**. De ce fait ces animaux ayant fait leur séroconversion après avoir été exposés au parasite ne seraient pas ou très peu à risque de transmission aux autres individus du troupeau.

6. La biopsie cutanée, une technique à diffuser au plus grand nombre

Enfin en ce qui concerne la faisabilité de la biopsie cutanée pour l'analyse PCR de notre étude, par une bonne contention à la tête du bovin, tous les prélèvements ont été effectués avec un minimum de risque. Avec une bonne organisation, cette étude nous a permis d'accomplir des chantiers de prélèvements de 20 à 25 biopsies à l'heure de façon optimale. De plus, aucune complication septique n'a été observée sur l'ensemble des biopsies. **Ceci prouve que cette technique, facile à réaliser, à faible coût et nécessitant peu de matériel, peut être utilisée et vulgarisée aux praticiens qui souhaitent connaître le statut des bovins dans des cheptels infectés et à forte séroprévalence.**

CONCLUSION

La besnoitiose bovine, maladie aujourd'hui émergente en Europe, est au cœur des préoccupations des éleveurs bovins et des vétérinaires. Afin d'enrayer la propagation de cette maladie, il est urgent de mettre en place un plan d'assainissement des troupeaux infectés. Toutefois, peu de données relatives aux solutions d'assainissement des troupeaux fortement infectés sont actuellement disponibles dans la littérature.

Cette étude novatrice a permis de mettre en évidence des notions importantes sous réserve du faible nombre d'élevages étudiés. Dans un troupeau très infecté, la proportion de bovins où l'on parvient à détecter l'ADN de *B. besnoiti* de façon certaine par une analyse PCR temps réel d'une biopsie cutanée prélevée à la base de la queue est faible (entre 9 et 28% dans cette étude). Ceci est valable quelle que soit l'origine géographique de l'élevage, la taille du cheptel ou encore l'ancienneté de la maladie au sein du troupeau.

Concernant les stratégies d'assainissement, l'élimination ou la mise à l'écart rapide de ces animaux, qualifiés de « forts contamineurs » avant la saison d'activité des vecteurs potentiels (stomoxes et taons) a permis de limiter considérablement les incidences sérologiques dans les six à dix-huit mois plus tard. Ceci tendrait à prouver que par ce biais, il est possible de limiter les nouvelles contaminations dans un troupeau et de parvenir, à terme, à enrayer la maladie.

Cependant, ces résultats méritent d'être consolidés par de nouvelles études contenant plus d'élevages et d'individus. Une des perspectives de ce projet serait de pouvoir affiner le profil d'individu que l'on qualifie de « super spreader » que ce soit sur son statut sérologique, son âge, son sexe ou encore l'existence d'une phase clinique face à l'exposition au parasite.

De plus, lors d'une seconde phase de ce projet, l'établissement d'un contrat avec l'éleveur sera réalisé. Celui-ci s'engagerait à éliminer le plus rapidement possible ses bovins « forts contamineurs » en échange de la réalisation des analyses et du suivi dans le temps du troupeau par le GDS. Enfin, il serait également intéressant d'étudier, de manière expérimentale, si ces bovins « à risque » représentent une source pérenne

de parasites dans le temps. Ceci permettrait d'enrichir d'avantage les connaissances actuelles sur la relation entre l'espèce bovine et *B. besnoiti*.

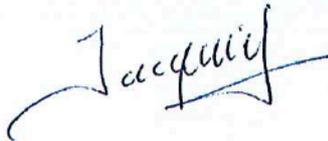
A l'heure actuelle, le panel diagnostique de la besnoitiose bovine s'étoffe progressivement sur notre territoire. Les praticiens disposent désormais d'un outil sur la matrice lait et de la PCR temps réel pour la détection de bovins asymptomatiques « forts contamineurs » par biopsie cutanée. Cette voie de dépistage paraît très prometteuse en vue de l'élimination sélective des individus reconnus comme réservoirs majeurs de cette maladie incurable et en pleine expansion, dans un contexte d'aide et de soutien aux éleveurs bovins.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

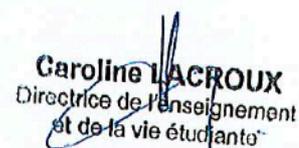
Je soussigné, Philippe JACQUIET, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de Leslie BOTTARI intitulée « La besnoitiose bovine : utilisation de la biopsie cutanée comme un outil diagnostique des individus forts contaminateurs et stratégie d'assainissement des troupeaux à forte séroprévalence » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 11/10/2019
Professeur Philippe JACQUIET
Enseignant-chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

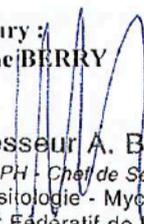


Vu :
Le Directeur par intérim de l'Ecole
Nationale Vétérinaire de Toulouse
Frédéric BOUSQUET

par délégation,


Caroline LACROUX
Directrice de l'enseignement
et de la vie étudiante

Vu :
Le Président du jury :
Professeur Antoine BERRY


Professeur A. BERRY
PU-PH - Chef de Service
Parasitologie - Mycologie
Institut Fédératif de Biologie
Place du Dr Baylac - TSA 40031
31059 TOULOUSE Cedex 9

Vu et autorisation de l'impression :
Présidente de l'Université Paul Sabatier
Madame Régine ANDRE-OBRECHT

La Présidente de l'Université Paul Sabatier,
par délégation,
Le Vice-Président de la CFVU

Richard GUILLET

Mme Leslie BOTTARI
a été admis(e) sur concours en : 2014
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 18/07/2018
a validé son année d'approfondissement le : 16/07/2019
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



BIBLIOGRAPHIE

ALVAREZ-GARCIA G., FREY C., ORTEGA-MORA L.M., SCHARES G., 2013, A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends in Parasitology* Vol. 29 No 8, pp. 407-415

ALVAREZ-GARCIA G., GARCIA-LUNAR P., GUTIERREZ-EXPOSITO D., SHKAP V., ORTEGA-MORA L.M., 2014, Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection cattle, *Parasitology* Vol. 141, Special Issue 11, pp. 1419-1435.

ALZIEU JP, 1991, La besnoitiose bovine ou anasarque des bovins, *Bulletin des GTV* 6, pp. 157-161.

ALZIEU JP., DORCHIES P., SCHELCHER F., GOTTSEIN B., 2007a, L'extension de la besnoitiose bovine en France, *Le point vétérinaire* n°38, pp. 37-43.

ALZIEU JP., CORTES H., GOTTSEIN B., JACQUIET P., DORCHIES P., SCHELCHER F., L'HOSTIS MB., 2007b, La besnoitiose bovine : actualités épidémiologiques et diagnostiques, *Bulletin des GTV Hors-série parasitisme des bovins*, pp. 41-49.

ALZIEU JP., JACQUIET P, 2009, Actualités sur la transmission et le diagnostic de la besnoitiose bovine. *Le point vétérinaire* n°40 (301), pp. 16-19.

ALZIEU JP., JACQUIET P., LIENARD E., 2010, L'inexorable progression de la besnoitiose bovine en France : actualités cliniques, épidémiologiques et diagnostiques. *Recueil Journées Nationales GTV, LILLE 2010*, pp. 921-926.

ALZIEU JP, JACQUIET P, LIENARD E., GRISEZ C., PREVOT F., 2011. Réémergence de la besnoitiose bovine : démarche diagnostique et possibilités de contrôle. *Bulletin des GTV* n°58, pp. 71-85.

ALZIEU JP., JACQUIET P., 2012, La besnoitiose bovine : du constat de son émergence à la nécessité de son contrôle. *Le point vétérinaire numéro spécial parasitologie interne des ruminants* n°43, pp. 106-112.

ALZIEU JP., JACQUIET P., et al., 2015, Quelles stratégies possibles pour éviter l'introduction de la besnoitiose dans des cheptels sains ? *Recueil Journées Nationales GTV, NANTES 2015*, pp. 509-518.

ALZIEU JP., JACQUIET P., et coll. 2016, La besnoitiose bovine : actualités physio-pathogéniques, cliniques et épidémiologiques, *Bulletin des GTV* n°84, pp. 67-78.

ALZIEU JP., JACQUIET P., et coll. 2017, La besnoitiose bovine : moyens diagnostic et stratégies possibles de contrôle, *Bulletin des GTV* n°85 pp. 63-70.

ALZIEU JP., JACQUIET P., et coll. 2019, Peau et lait : apport de nouvelles données sur ces matrices dans le dépistage de la besnoitiose bovine, *Recueil Journées Nationales GTV, Nantes 2019*, pp. 289-298.

ARNAL MC, GUTTIEREZ-EXPOSITO D., MARTINEZ-DURAN D., REGIDOR-CERILLO J., REVILLA M., FERNANDEZ DE LUCO D., JIMENEZ-MELENDZ A., ORTEGA-MORA L., ALVAREZ-GARCIA G., 2017. Systemic Besnoitiosis in a juvenile Roe Deer (*Capreolus capreolus*). *Transboundary and Emerging Diseases* Vol. 64, Issue 5, e8-e14.

BARROS ATM., FOIL LD., 2007, The influence of distance on movement of tabanids (Diptera: Tabanidae) between horses, *Veterinary Parasitology* Vol.144, Issue 3-4, pp. 380-384.

- BASSO W., SCHARES G., GOLLNICK NS., RUTTEN M., DEPLAZES P., 2011. Exploring the life cycle of *Besnoitia besnoiti* – Experimental infection of putative definitive and intermediate host species. *Veterinary Parasitology* Vol.178, Issue 3-4, pp. 223-234.
- BASSO W., LESSER M., GRIMM F., HILBE M., SYDLER T., TRÖSCH L., OCHS H., BRAUN U., DEPLAZES P., 2013, Bovine besnoitiosis in Switzerland: Imported cases and local transmission, *Veterinary Parasitology* Vol.198, pp.265-273.
- BIGALKE RD., JANSEN BC., 1968. New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and investigations. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* Vol. 35, pp. 3-138.
- BIGALKE RD., BASSON PA., MCCULLY RM., BOSMAN PP and SCHOEMAN JH., 1974, Studies in cattle on the development of a live vaccine against bovine besnoitiosis, *Diseases of Cattle in the Tropics. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, Vol 6. Springer, Dordrecht.
- BORDES F., 2009, Étude de cas : Besnoitiose bovine sur un troupeau de bovins, *Nouveau praticien vétérinaire, élevages et santé*, Vol. 2 (11), pp. 65-69.
- BOUBET B., 2018, La besnoitiose, un premier cas clinique confirmé en Creuse, *La Creuse Agricole et Rurale*, n°2212 déc. 2018.
- CORTES HC., LEITÃO A., VIDAL R., VILA-VIÇOSA MJ., FERREIRA ML., CAEIRO V., HJERPE CA., 2005, Besnoitiosis in bulls in Portugal, *Veterinary Record* Vol. 157, Issue 9, pp. 262-264.
- CORTES HC., REIS Y., WAAP H., SOARES H., MARQUES I., PEREIRA DA FONSECA I., FAZENDEIRO I., FERREIRA ML., CAEIRO V., SHKAP V., HEMPHILL A., LEITÃO A., 2006a, Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal. *Veterinary Parasitology* Vol.141, Issue 3-4, pp.226–233.
- CORTES HC., NUNES S., REIS Y., STAUBLI D., VIDAL R., SAGER H., LEITÃO A., GOTTSEIN B., 2006b, Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western blot. *Veterinary Parasitology* Vol.141, Issue 3-4, pp.216–225.
- CORTES H., LEITÃO A., GOTTSEIN B., HEMPHILL A., 2014, A review on bovine besnoitiosis: a disease with economic impact in herd health management, caused by *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges, 1916). *Parasitology*, Vol.141, Issue 11, pp. 1406-1417.
- DIESING L, HEYDORN A.O, MATUSCHKA F.R., BAUER C., PIPANO E., DE WAAL DT., POTGIETER FT., 1998. *Besnoitia besnoiti*: Studies on the definitive host and experimental infections in cattle, *Parasitology Research* Vol.75, Issue 2, pp.114-117.
- DORCHIES P., DUNCAN J., LOSSON B., ALZIEU JP., 2012, *Parasitologie Clinique des bovins*, Med'Com Edition.
- DUBEY JP., SREEKUMAR C., LINDSAY DS., HILL D., ROSENTHAL BM., VENTURINI L., VENTURINI MC., GREINER EC., 2003, *Besnoitia oryctofelisi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from domestic rabbits. *Parasitology* Vol.126, Issue 6, pp. 521-539.
- DUBOISSET C., 2013, Etude rétrospective d'un foyer de besnoitiose bovine dans le département de l'Ardèche : aspects économiques, Thèse de Doctorat vétérinaire, Lyon, 88p.
- EFSA (2010), Bovine besnoitiosis : an emerging disease in Europe. *The European Food Safety Authority Journal*, 8, 1499-1514.

ESTEBAN-GIL A., GRISEZ C., PREVOT F., FLORENTIN S., DECAUDIN A., PICARD-HAGEN N., BERTHELOT X., RONSIN P., ALZIEU JP., MAROIS M., CORBOZ N., PEGLION M., VILARDELL C., LIENARD E., BOUHSIRA E., CASTILLO JA., FRANC M., JACQUIET P., 2014, No detection of *Besnoitia besnoiti* DNA in the semen of chronically infected bulls. *Parasitology Research* Vol.113, Issue 6, pp. 2355-2362.

ESTEBAN-GIL A., JACQUIET P., FLORENTIN S., DECAUDIN A., BERTHELOT X., RONSIN P., GRISEZ C., PREVOT F., ALZIEU JP., MAROIS M., CORBOZ N., PEGLION M., VILARDELL C., LIENARD E., BOUHSIRA E., CASTILLO JA., FRANC M., PICARD-HAGEN N., 2016, Does bovine besnoitiosis affect the sexual function of chronically infected bulls? *Theriogenology* Vol.86, Issue 5, pp. 1325-1332.

ESTEBAN-GIL A., CALVETE C., CASASUS I., SANZ A., FERRER J., PERIS MP., MARCENSERIAL JM., CASTILLO JA., 2017, Epidemiological patterns of bovine besnoitiosis in an endemic beef herd reared under extensive conditions, *Veterinary Parasitology* Vol. 236 pp. 14-21.

ESQUERRE E., 2015, La besnoitiose : synthèse méthodique épidémiologique et étude de l'évolution épidémiologique en région PACA, Thèse de Doctorat Vétérinaire, Lyon, 129p.

EUZEBY J., 1987, Protozoologie médicale compare. Les protozooses des animaux et leurs relations avec les protozooses de l'Homme (avec études des arthropodes hématophages vecteurs de protozoaires). Volume II. Myxozoa – Microspora – Acetosporea - Apicomplexa 1. Coccidioses (sensu lato). Fondation Marcel Mérieux.

FERNANDEZ-GARCIA A., ALVAREZ-GARCIA G., RISCO-CASTILLO V., AGUADO-MARTINEZ A., MARUGAN-HERNANDEZ V., ORTEGA-MORA LM., 2009b, Pattern of recognition of *Besnoitia besnoiti* tachyzoite and bradyzoite antigens by naturally infected cattle. *Veterinary Parasitology* Vol. 164, Issue 2-4, pp. 104–110.

FERNANDEZ-GARCIA A., ALVAREZ-GARCIA G., RISCO-CASTILLO V., AGUADO-MARTINEZ A., MARCEN JM., ROJO-MONTEJO S., CASTILLO JA., ORTEGA-MORA LM., 2010, Development and use of an indirect ELISA in an outbreak of bovine besnoitiosis in Spain. *Veterinary Records* Vol.166, pp.818–822.

FERRIE J., 1984, La besnoitiose bovine : revue bibliographique – Observations personnelles, Thèse de Doctorat Vétérinaire, Toulouse, 288p.

FOUQUET C., 2009, La besnoitiose bovine : suivi épidémiologique de l'épizootie de la région PACA, Thèse de Doctorat Vétérinaire, Lyon, 105p.

FRANC M., GOURREAU J.M, FERRIE J., 1987. La besnoitiose bovine. *Le point vétérinaire* n°19, pp. 445-455.

FRANC M., CADIERGUES MC., 1999, La besnoitiose bovine : attitude diagnostique et thérapeutique, *Bulletin des GTV* n°2, pp. 119-124.

FREY CF., GUTIERREZ-EXPOSITO D. ORTEGA-MORA LM., BENAVIDES J., MARCEN JM., CASTILLO JA., CASASUS I., SANZ A., GARCIA-LUNAR P., ESTEBAN-GIL A., ALVAREZ-GARCIA G., 2013, Chronic bovine besnoitiosis : intra-organ parasite distribution, parasite loads and parasite-associated lesions in subclinical cases, *Veterinary Parasitology* Vol.197, Issue 1-2, pp. 95-103.

GARCÍA-LUNAR P., ORTEGA-MORA L.M., SCHARES G., GOLLNICK NS., JACQUIET P., GRISEZ C., PREVOT F., FREY CF., GOTTSEIN B., ALVAREZ-GARCIA G., 2013, An inter-laboratory comparative study of serological tools employed in the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection in bovines. *Transboundary and Emerging Diseases* Vol.60, Issue 1, pp. 59–68.

- GILLES, J., DAVID, J.-F., DUVALLET, G., DE LA ROCQUE, S. et TILLARD, E., 2007. Efficiency of traps for *Stomoxys calcitrans* and *Stomoxys niger niger* on Reunion Island. Medical and Veterinary Entomology. mars 2007. Vol. 21, n° 1, pp. 65-69.
- GOLDMAN M., PIPANO E., 1983, Serological studies on bovine besnoitiosis in Israel. Tropical Animal Health Production Vol.15, Issue 1, pp. 32–38.
- GOLLNICK N., SCHARR J., SCHARES G., LANGENMAYER MC., 2015, Natural *Besnoitia besnoiti* infections in cattle: chronology of disease progression. BMC Veterinary research, 11: 35.
- GOTTSTEIN B., HENTRICH B., WYSS R., THUR B., BRUCKNER L., MULLER N., KAUFMANN H., WALDVOGEL A., 1999, Molecular and immunodiagnostic studies of bovine neosporosis in Switzerland, Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde Vol.141, Issue 2, pp. 59-68.
- GRIMEAU V., 2012, Étude de populations de diptères potentiellement vecteurs de *Besnoitia besnoiti* en Pays de la Loire, Thèse de Doctorat Vétérinaire, Nantes, 98p.
- GUTTIÉREZ-EXPÓSITO D., ORTEGA-MORA LM., GARCIA-LUNAR P., ROJO-MONTEJO S., ZABALA J., SERRANO M., ALVAREZ-GARCIA G., 2015a, Clinical and serological dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in three endemically infected beef cattle herds, Transboundary and Emerging Diseases, Vol.64, Issue 2, pp. 538-546.
- GUTTIÉREZ-EXPÓSITO D., DE LUCO DF., et al, 2015b, Wild ruminants as sentinels of endemic bovine besnoitiosis and first report of *Besnoitia besnoiti* infection in roe deer. In: 3rd Apicomplexa in Farm Animals Symposium, Edinburgh, 30th June – 3rd July.
- GUTTIÉREZ-EXPÓSITO D., ARNAL MC., MARTINEZ-DURAN D., REGIDOR-CERILLO J., REVILLA M., FERNANDEZ DE LUCO DL., JIMENEZ-MELENDZ A., CALERO-BERNAL R., HABELA MA., GARCIA-BOCANEGRA I., ARENAS-MONTES A., ORTEGA-MORA LM., ALVAREZ-GARCIA G., 2016. The role of wild ruminants as reservoirs of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle, Veterinary Parasitology Vol. 223, pp. 7-13.
- HOLLANDER AL., WRIGHT RE. et al., 1980, Impact of Tabanids on Cattle: Blood meal size and preferred feeding sites, Journal of Economic Entomology Vol.73, Issue 3, pp. 431-433.
- HORNOK S, FEDAK A, BASKA F, HOFMAN-LEHMANN R, BASSO W, 2014. Bovine besnoitiosis emerging in Central-Eastern Europe, Hungary. Parasites and vectors, pp. 7-20.
- JACQUIET P. LIENARD E., FRANC M., 2010, Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects, Veterinary Parasitology Vol.174, Issue 1-2, pp. 30-36.
- JACQUIET P., ALZIEU JP. et al, 2012, Dynamique de la transmission de la besnoitiose bovine à *Besnoitia besnoiti* entre troupeaux et au sein de troupeaux infectés, Recueil Journées Nationales, GTV Nantes, pp. 535-540.
- JACQUIET P., ROUET D., BOUHSIRA E., SALEM A., LIENARD E., FRANC M., 2014, Population dynamics of *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera Muscidae) in southwestern France, Revue de Médecine Vétérinaire, Vol. 165, Issue 9-10, pp. 267-271.
- JANITSCHKE K., DE VOS A., ET BIGALKE R., 1984, Serodiagnosis of bovine besnoitiosis by ELISA and immunofluorescence tests. Onderstepoort Journal Veterinary Research Vol.51, Issue 4, pp. 239–243.
- LANGENMAYER MC., SCHARR JC., SAUTER-LOUIS C., SCHARES G., GOLLNICK NS., 2015, Natural *Besnoitia besnoiti* infections in cattle: hematological alterations and changes in serum chemistry and enzyme activities, BMC Veterinary Research pp. 11-32.

- LEGRAND P., 2003, La besnoitiose bovine en Ariège, Thèse de Doctorat Vétérinaire, Toulouse, 87p.
- LENFANT F., 2013. Mise au point d'une technique de diagnostic par immunofluorescence indirecte de la besnoitiose bovine a *Besnoitia besnoiti*, Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 127p.
- LIENARD E., SALEM A. GRISEZ C., PREVOT F., BERGEAUD JP., FRANC M., GOTTSEIN B., ALZIEU JP., LAGALISSE Y., JACQUIET P., 2011, A longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infections and seasonal abundance of *Stomoxys calcitrans* in a cattle farm of southwest France, *Veterinary Parasitology* Vol.177, Issue 1-2, pp. 20-27.
- LIENARD, E., 2012. Blurred epidemiology on bovine besnoitiosis: DNA detection in skin among seropositive animals. In: International Meeting on Apicomplexan Parasites in Farm Animals. ApiCowPlexa Symposium. Lisbon. 2012.
- LIENARD E., FONCLARA E. et al., 2013, Experimental and natural *Besnoitia besnoiti* infections in cattle. 24th International conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Perth, Australia, 25-29 August 2013.
- LIENARD E., POP L., PREVOT F., GRISEZ C., MALLET V., RAYMOND-LETRON I., BOUHSIRA E., FRANC M., JACQUIET P., 2015, Experimental infections of rabbits with proliferative and latent stages of *Besnoitia besnoiti*, *Parasitology Research* Vol.114 pp. 3815-3826.
- LLOYD-SMITH, J.O., SCHREIBER, S.J., KOPP, P.E. & GETZ, W.M., 2005, Superspreading and the effect of individual variation on disease emergence. *Nature*, Vol. 438, pp. 355–359.
- MILLAN J., SOBRINO R., RODRIGUEZ A., OLEAGA A., GORTAZAR C., SCHARES G., 2012. Large-scale serosurvey of *Besnoitia besnoiti* in free-living carnivores in Spain, *Veterinary Parasitology* Vol.190, Issue 1-2, pp. 241-245.
- MUNOZ-CARO T., SILVA LM., RITTER C., TAUBERT A., HERMOSILLA C., 2014a, *Besnoitia besnoiti* tachyzoites induce monocyte extracellular trap formation, *Parasitology Research* Vol.113, Issue 11, pp. 4189-4197.
- MUNOZ-CARO T., HERMOSILLA C, SILVA LM., CORTES H., TAUBERT A., 2014b, Neutrophil extracellular traps as innate immune reaction against the emerging apicomplexan parasite *Besnoitia besnoiti*, *PLoS One* Vol. 9, Issue 3, e91415.
- NEUMAN M., 1972, Serological survey of *Besnoitia besnoiti* (Marotel 1912) infection in Israel by immunofluorescence. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe B* Vol. 19, Issue 5, pp. 391-396.
- NOBEL TA., NEUMANN M., KLOPFER U., PERL S., 1997, Kystes de *Besnoitia besnoiti* dans les organes génitaux de la vache, *Bulletin de l'académie vétérinaire de France* n°50, pp. 569-574.
- POLS JW., 1960, Studies on bovine besnoitiosis with special reference to the aetiology, *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* Vol. 28, number 3, pp. 265-356.
- PHELPS RJ., HOLLOWAY MTP., 1990, Alighting sites of female Tabanidae (Diptera) at Rekomitjie, Zimbabwe, *Medical and Veterinary Entomology* 4.
- PRESLEY SM., WRIGHT RE., 1986, Field test of pyrethroid ear tags, sprays and a Pour-On formulation for control of horse flies on cattle. *Journal of Agricultural Entomology*, Vol.3, Issue 4, pp. 369-373.
- REISSERT-OPPERMANN S., BAUER B., STEUBER S., CLAUSEN PH., 2019, Insecticide resistance in stable flies (*Stomoxys calcitrans*) on dairy farms in Germany, *Parasitology Research*, Vol. 118, Issue 9, pp 2499–2507.

- ROSTAHER A., MUELLER R.S., MAJZOUB M., SHARES G., GOLLNICK NS., 2010, Bovine besnoitiosis in Germany. *Veterinary Dermatology* Vol.21, Issue 4, pp. 329–334.
- RYAN EG, LEE A, CARTY C, O'SHAUGUNESSY J, KELLY P, CASSIDY JP, SHEEMAN M, JOHNSON A, DE WAAL T, 2016. Bovine besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) in an Irish dairy herd, *Veterinary Record* 178, 608.
- SANNUSI A., 1991, A simple field diagnostic smear test for bovine besnoitiosis, *Veterinary Parasitology* Vol. 39, Issue 1-2, pp. 185-188.
- SAHUN S., 1998, Les besnoitioses bovines en France : mise au point d'un test ELISA et enquête sur le terrain, Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 113p.
- SALEM A., BOUHSIRA E. LIENARD E., BOUSQUET-MELOU A., JACQUIET P., FRANC M., 2012, Suceptibility of two European strains of *Stomoxys calcitrans* (L.) to Cypermethrin, Deltamethrin, Fenvalerate, λ -cyhalothrin, Permethrin and Phoxim, *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* Vol.10, pp.249-257.
- SCHARES G., BASSO W., MAJZOUB M., CORTES HC., ROSTAHER A., SELMAIR J., HERMANN S., CONRATHS FJ., GOLLNICK NS., 2009, First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. *Veterinary Parasitology* Vol. 163, number 4, pp. 315–322.
- SCHARES G., BASSO W., MAJZOUB M., ROSTAHER A., SCHARR JC., LANGENMAYER MC., SELMAIR J., DUBEY JP., CORTES HC., GOLLNICK NS., 2010, Comparative evaluation of immunofluorescent antibody and new immunoblot tests for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites and bradyzoites in bovine sera, *Veterinary Parasitology* Vol.171, Issue 1-2, pp. 32–40.
- SCHARES G., BASSO W., MAJZOUB M., ROSTAHER A., SCHARR JC., LANGENMAYER MC., SELMAIR J., DUBEY JP., CORTES HC., CONRATHS FJ., HAUPT T., PURRO M., RAEBER A., BUHOLZER P., GOLLNICK NS., 2011a, Evaluation of a commercial ELISA for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti*. *Veterinary Parasitology* Vol.175, Issue 1-2, pp. 52–59.
- SCHARES G., MAKSIMOV A., BASSO W., MORE G., DUBEY JP., ROSENTHAL B., MAJZOUB M., ROSTAHER A., SELMAIR J., LANGENMAYER MC., SCHARR JC., CONRATHS FJ., GOLLNICK NS., 2011b, Quantitative real time polymerase chain reaction assays for the sensitive detection of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle, *Veterinary Parasitology* Vol.178, pp. 208-216.
- SCHARES G., LANGENMAYER MC., SCHARR JC., MINKE L., MAKSIMOV P., MAKSIMOV A., SCHARES S., BARWALD A., BASSO W., DUBEY JP., CONRATHS FJ., GOLLNICK NS., 2013, Novel tools for the diagnosis and differentiation of acute and chronic bovine besnoitiosis, *International Journal for Parasitology* Vol.43, Issue 2, pp. 143-154.
- SCHARES G., LANGENMAYER M., MAJZOUB M., SCHARR JC., GENTILE A., MAKSIMOV A., SCHARES S., CONRATHS FJ., GOLLNICK NS., 2016, Naturally acquired bovine besnoitiosis: Differential distribution of parasites in the skin of chronically infected cattle, *Veterinary Parasitology* Vol.216, pp.101-107.
- SCHOFIELD S. and TORR SJ., 2002, A comparison of the feeding behaviour of tsetse and stable flies, *Medical and Veterinary Entomology* Vol.16, Issue 2, pp.177-185.
- SHARIF S., JACQUIET P., PREVOT F., GRISEZ C., BOUHSIRA E., FRANC M., LIENARD E., 2017, Assessment of persistence of *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) bradyzoites in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), *Revue de Médecine Vétérinaire*, Vol.168, Issue 7-9, pp. 197-203.

- SHKAP V., UNGAR-WARON H., PIPANO E., GREENBLATT C., 1984, Enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in cattle. Tropical Animal Health Production Vol. 16, Issue 4, pp. 233–238.
- SHKAP V., RESKE A., PIPANO E., FISH L., BASZLER T., 2002, Immunological relationship between *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*. Veterinary Parasitology Vol.106, Issue 1, pp. 35–43.
- TAINCHUM K., SHUKRI S., DUVALLET G., ETIENNE L., JACQUIET P., 2018, Phenotypic susceptibility to pyrethroids and organophosphate of wild *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) populations in southwestern France, Parasitology Research, Vol.117, Issue 12, p. 4027–4032
- TAYLOR DB., BERKEBILE D., 2006. Comparative efficiency of six stable fly (Diptera: Muscidae) traps. Journal of Economic Entomology, Vol. 99, Issue 4, pp. 1415-1419.
- TAYLOR DB, FRIESEN K, ZHU JJ., SIEVERT K., 2012, Efficacy of Cyromazine to control immature stable flies (Diptera: Muscidae) developing in winter hay feeding sites. Journal of Economic Entomology, Vol.105, Issue 2, pp. 726-731.
- THOMAS C., 2007, La besnoitiose bovine, données bibliographiques, Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 134p.
- VANDERWAAL KL., EZENWA VO., 2016, Heterogeneity in pathogen transmission: mechanisms and methodology, Functional Ecology Vol. 30, Issue 10, pp. 1606-1622.
- WAAP H., CARDOSO R., MARCELINO E., MALTA J., CORTES H., LEITAO A., 2011, A modified agglutination test for the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection. Veterinary Parasitology Vol.178, Issue 3-4, pp. 217–222.
- WILSON, K., BJORNSTAD, O.N., DOBSON AP., MERLER S., POGLAYEN G., RANDOLPH SE., READ AF., SKORPING A., 2002, Heterogeneities in macroparasite infections: patterns and processes. Ecology of Wildlife Diseases (eds P.J. Hudson, A. Rizzoli, B. Grenfell, H. Heesterbeek & A.P. Dobson), pp. 6–44. Oxford University Press, Oxford, UK.
- WOOLHOUSE, M.E.J., DYE, C., ETARD JF., SMITH T., CHARLWOOD JD., GARNETT GP., HAGAN P., HII JLK., NDHLOVU PD., QUINNELL RJ., WATTS CH., CHANDIWANA SK., ANDERSON RM., 1997, Heterogeneities in the transmission of infectious agents: implications for the design of control programs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Vol. 94, Issue 1, pp. 338–342.

Protocole d'extraction d'ADN de *B. besnoiti* (ENVT).

PEAU/ORGANE

Préparation de l'échantillon	Dans un microtube, prélever 0,05g de peau lacérée
Lyse N°1	Ajouter 180 µl de « Buffer ATL » + 20 µl de protéinase K Vortexer
Incubation N°1	Incuber 1 nuit au bain-marie ou bloc chauffant à 56°C
Lyse N°2	Ajouter 200 µl de « Buffer AL » Vortexer
Incubation N°2	Incuber 10 minutes au bain-marie ou bloc chauffant à 70°C
Transfert sur colonne et fixation à la membrane	Ajouter 210 µl d' éthanol (96-100 %) . Vortexer 15 secondes (centrifuger brièvement pour faire tomber les gouttes si nécessaire).
	Centrifuger 1 min à 1000 g Transférer la totalité du surnageant sur une colonne Centrifuger 1 minute 10 000 g
Lavage N°1	Changer de tube collecteur Ajouter 500 µl de « Buffer AW1 » Centrifuger 1 minute 10 000g
Lavage N°2	Changer de tube collecteur Ajouter 500 µl de « Buffer AW2 » Centrifuger 3 minutes 10 000g
Séchage de la colonne	Changer de tube collecteur Centrifuger 1 minute à 10 000 g
Élution	Transférer la colonne sur un microtube de 1,5 ml Déposer 200 µl de « Buffer AE » Incuber 1 minute à température ambiante Centrifuger 1 minute à 10 000 g
Conservation	Boucher les tubes, les identifier et les conserver à +2/8°C si l'analyse est réalisée dans les 24 h qui suivent. Pour une conservation à plus long terme, stocker les tubes à -20°C +/-5°C.

Données brutes obtenues pour l'ensemble des élevages de l'étude A à H

Elevage A

N° BV	Identification	Age	Kyste scléroux	Clinique oui/non	janv-17 ELISA	mars-17 PCR ELISA	avr-17 PCR ELISA	mai-17 PCR	févr-18 ELISA	mars-18 PCR ELISA	WB	sept-18 ELISA	fev 2019 ELISA		
1	8138	> 24 mois	oui	non	143	No Ct 125.7	38 117.1	ND							
2	8150	> 24 mois	oui	non	129	No Ct 98	38 120	ND							
3	9585	> 24 mois	oui	non	128	No Ct 122.9	NoCt 129.4	ND							
4	8170	> 24 mois	oui	non	118	No Ct 108.1	NoCt 119.1	ND							
5	8149	> 24 mois	oui	non	91	No Ct 96.3	NoCt 87.6	ND							
6	8148	> 24 mois	oui	non	95	No Ct 130.2	NoCt 145.5	ND							
7	8084	> 24 mois	oui	non	91	No Ct 80.4	NoCt 66.7	ND							
8	8154	> 24 mois	non	non	6	No Ct 6.5	ND 7.2	ND				1,54	2,2		
9	8166	> 24 mois	non	non	99	No Ct 89	ND 96.1	ND							
10	8094	> 24 mois	oui	oui	ND	No Ct 116.9	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé			
11	8093	> 24 mois	non	non	119	No Ct 109	ND 107.8	ND							
12	8124	> 24 mois	non	non	5	No Ct 3.8	ND 5.6	ND 0,8							
13	9554	> 24 mois	oui	non	62	No Ct 96.1	ND 96.6	ND							
14	9534	> 24 mois	non	non	12	No Ct 9.9	ND 10.4	ND							
15	8109	> 24 mois	oui	non	151	No Ct 128.5	NoCt 153.9	ND							
16	8164	> 24 mois	oui	oui	143	20 124.5	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé			
17	4001	> 24 mois	non	non	116	31 97.9	ND 92.3	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé			
18	9574	> 24 mois	non	non	65	34 etesté	ND 46.2	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé			
19	9563	> 24 mois	non	non	129	36 128	ND 129.2	ND							
20	8151	> 24 mois	non	non	66	31 41.8	ND 1	retesté Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé			
21	9573	> 24 mois	non	non	114	29 85.1	ND 94.5	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé			
22	9567	> 24 mois	oui	non	92	No Ct 124.4	NoCt 151.2	38,2							
23	8083	> 24 mois	oui	non	8	28 retesté	ND 133.5	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé	Réformé Réformé			
24	9555	> 24 mois	oui	non	101	37 116	NoCt 110.4	ND							
25	8087	> 24 mois	oui	non	141	39 127.9	NoCt 159.2	ND							
26	8146	> 24 mois	non	non	1	32 4.4	NoCt 4	ND							
27	8149	> 24 mois	non	non	91	39 retesté	ND 5.1	ND			36,97	2,1	Négatif	2,2	4,5
28	4010	> 24 mois	oui	non	63	No Ct 35.8	ND 9	Retesté						77,58	
29	8110	> 24 mois	non	non	11	No Ct retesté	NoCt 98.9	ND							129,4
30	8139	> 24 mois	oui	non	131	38 119.6	ND 135.5	ND							
31	8191	> 24 mois	non	non	6	38 5.6	ND 4.4	ND							
32	8206	> 24 mois	non	non	86	38 114.7	ND 94.5	ND							
33	711				Neg	ND 6	ND ND	ND							
34	1333				ND	ND 6.2	ND ND	ND							4,8
35	286				ND	ND 6	ND ND	ND							
36	289				ND	ND 4.6	ND ND	ND							3,6
37	288				ND	ND 4.4	ND ND	ND							5
38	1332				ND	ND 7.6	ND ND	ND							-0,7
39	6425				ND	ND ND	ND	131.8	No Ct						
40	3563														
41	7646														
42	0567 (T)														
43	282				8										
44	283				7										
45	284				5										
46	285				4										
47	567				2										
48	1337														
49	1338														
50	1341														
51	1343														
52	1347														
53	2439 (T)														
54	3468														
55	3564														
56	3568														
57	6619														
58	6620														
59	6621														
60	6623														
61	6624														
62	6626														
63	7642														
64	7648														
65	7650														
66	8126				6										
67	8189														
68	8193				4										
69	8208				6										
70	8219				8										
71	8220				7										
72	8222				14										
73	8223				6										
74	9242				5										
75	9245				5										
76	9246				4										
77	9248				4										
78	9252				3										
79	9253				6										
80	9263				13										
81	9264				9										
82	9265				1										
83	9266				10										
84	9267				7										
85	9268				8										
86	9271				10										
87	9272				3										
88	1363														
89	2390														
90	1369														
91	2385														
92	1367														
93	1365														
94	1352														
95	1353														
96	1360														
97	1362														
98	1354														
99	1364														
100	3417														

Elevage B

N° BV	Identification	Age	Kystes scléreaux	Clinique	mai-17	
					PCR	ELISA
1	853	> 24 mois	non	non	No Ct	145,4
2	936	> 24 mois	non	non	No Ct	60,2
3	1573	> 24 mois	non	non	39,34	117,3
4	1584	> 24 mois	non	non	No Ct	140,9
5	1727	> 24 mois	non	non	No Ct	94,3
6	1880	> 24 mois	oui	non	30,79	135,9
7	1892	> 24 mois	non	non	36,28	66,1
8	1875	> 24 mois	non	non	No Ct	131,8
9	1961	> 24 mois	non	non	No Ct	57,6
10	2389	> 24 mois	non	non	37,21	105,2
11	2558	> 24 mois	non	non	No Ct	144,8
12	2564	> 24 mois	non	non	No Ct	99
13	2700	> 24 mois	oui	non	36,87	91,5
14	2970	> 24 mois	non	non	37,04	134,1
15	3214	> 24 mois	non	non	31,24	141,4
16	3226	> 24 mois	non	non	No Ct	74,7
17	3515	> 24 mois	non	non	No Ct	88,6
18	3636	> 24 mois	non	non	No Ct	54,4
19	3637	> 24 mois	non	non	No Ct	88,2
20	4100	> 24 mois	non	non	No Ct	61,1
21	4127	> 24 mois	non	non	No Ct	82,5
22	4133	> 24 mois	oui	non	30,84	118,4
23	5684	> 24 mois	oui	non	39,9	75,6
24	5685	> 24 mois	non	non	No Ct	151,6
25	5690	> 24 mois	oui	non	32,33	124,3
26	5692	> 24 mois	oui	non	37,2	90,9
27	5693	> 24 mois	oui	non	No Ct	137,1
28	5702	> 24 mois	oui	non	22,9	143
29	5709	< 24 mois	oui	non	No Ct	80,6
30	5713	< 24 mois	non	non	38,44	127,7
31	5879	> 24 mois	oui	non	No Ct	125,5
32	6765	> 24 mois	non	non	No Ct	101
33	6767	> 24 mois	non	non	No Ct	129,8
34	6785	< 24 mois	non	non	38,79	119
35	6789	< 24 mois	oui	non	39,4	123,3
36	6810	< 24 mois	non	non	38,22	125,5
37	7348	> 24 mois	non	non	No Ct	138
38	7922	> 24 mois	non	non	No Ct	52,9
39	8210	> 24 mois	oui	oui	35,16	156,5
40	8231	> 24 mois	non	non	No Ct	101,9
41	8756	> 24 mois	oui	non	No Ct	112,9
42	8892	> 24 mois	non	non	No Ct	129,8
43	9621	> 24 mois	non	non	No Ct	120,1
44	9650	> 24 mois	non	non	39,4	81,6
45	9869	> 24 mois	oui	oui	No Ct	128,9
46	9872	> 24 mois	non	non	No Ct	95,4
47	9890	> 24 mois	non	non	No Ct	121,9
48	9902	> 24 mois	oui	non	No Ct	115,2
49	9977	> 24 mois	non	non	No Ct	73

Elevage C

N° BV	Identification	Age	Kyste scléreaux	Clinique oui/non	PCR		% DO ELISA		WB
					mai-17	avr-18			
1	6149	> 24 mois	non	non	No Ct	88,4			
2	1425	< 24 mois	oui	oui	29,4	125,9	25,54	205	NA
3	5116	> 24 mois	non	non	38,7	126,6			
4	2674	> 24 mois	non	non	No Ct	133,4			
5	5679	> 24 mois	oui	non	No Ct	66,9			
6	1417	< 24 mois	oui	oui	26,3	155,1	25,7	204	NA
7	1427	< 24 mois	oui	oui	29	148,4	36,01	216	NA
8	1235	> 24 mois	oui	non	No Ct	135,3			
9	2675	> 24 mois	non	non	No Ct	114,7			
10	1432	< 24 mois	oui	oui	No Ct	145,5	35,07	187	NA
12	5111	> 24 mois	non	non	No Ct	105,6			
13	3619	> 24 mois	non	non	No Ct	122,2			
14	3607	> 24 mois	non	non	39,5	135,7			
15	1054	> 24 mois	oui	non	No Ct	137,1			
16	1230	> 24 mois	non	non	No Ct	112,2			
17	8308	> 24 mois	non	non	38,3	97,2			
18	6133	> 24 mois	non	non	No Ct	47,2			
19	6143	> 24 mois	non	non	No Ct	53			
20	1053	> 24 mois	non	non	No Ct	105,4			
21	1424	< 24 mois	oui	oui	25,5	145,3	16,35	223	NA
22	6144	> 24 mois	non	non	No Ct	120,3			
23	2686	> 24 mois	non	non	No Ct	119,2			
24	2682	> 24 mois	non	non	No Ct	50,6			
25	2669	> 24 mois	non	non	No Ct	47,4			
26	7183	> 24 mois	oui	non	No Ct	144,2			
27	6131	> 24 mois	non	non	No Ct	134,9			
28	1426	< 24 mois	non	non	No Ct	4	NP	208	Positif
29	6708	> 24 mois	non	non	No Ct	4,2	NP	164	Positif
30	1416	< 24 mois	non	non	33,52	9,1	34,86	194	NA
31	1421	< 24 mois	non	non	No Ct	4,5	NP	209	Positif
32	1418	< 24 mois	oui	non	20,7	163,5	23,88	203	Positif

Elevage D

N° BV	Identification	avr-18		
		PCR	ELISA	Devenir
1	O740	26,65	218,5	
2	O741	No Ct	159	
3	O742	No Ct	52,5	
4	O743	No Ct	109,7	
5	O747	21,04	162	
6	O751	No Ct	76	réforme
7	O756	No Ct	116,5	
8	O760	No Ct	76,9	
9	1890	No Ct	67,8	
10	2910	No Ct	38,9	réforme
11	2914	No Ct	31,4	
12	2920	No Ct	78,1	
13	3940	21,18	137,1	réforme
14	3952	No Ct	124,7	
15	3956	No Ct	180,9	
16	4457	No Ct	139,2	
17	4462	No Ct	95,1	
18	6470	No Ct	91,7	réforme
19	6471	No Ct	113,8	
20	6479	No Ct	66,1	
21	6493	No Ct	94,1	
22	6501	No Ct	61,3	
23	6800	No Ct	48,5	
24	6806	No Ct	124,8	
25	6808	No Ct	157,1	
26	6809	No Ct	110,4	
27	6811	No Ct	115,1	réforme
28	6815	No Ct	166,9	
29	6828	No Ct	132	
30	6835	No Ct	100,1	
31	8812	No Ct	68,7	réforme
32	8820	37,55	53,7	
33	8821	No Ct	97,7	réforme
34	4455	No Ct	6,3	

N° BV	Identification	avr-18	
		PCR	ELISA
1	FR 1822 133 230	No Ct	
2	FR 1822 133 235	No Ct	
3	FR 1824 067 207	No Ct	
4	FR 1825 086 104	No Ct	
5	FR 1825 086 123	No Ct	
6	FR 1825 086 124	No Ct	
7	FR 1826 059 681	28,55	
8	FR 1826 059 682	No Ct	
9	FR 1826 802 142	No Ct	
10	FR 1826 802 146	No Ct	
11	FR 1826 811 824	No Ct	
12	FR 1826 811 844	39,98	
13	FR 1826 811 848	No Ct	
14	FR 1826 811 850	No Ct	
15	FR 1826 811 851	33,63	
16	FR 1826 811 865	No Ct	
17	FR 1826 811 871	No Ct	
18	FR 1826 823 001	No Ct	
19	FR 1826 823 002	No Ct	
20	FR 1826 823 013	No Ct	
21	FR 1826 823 027	No Ct	
22	FR 1826 823 029	No Ct	
23	FR 1826 830 319	No Ct	
24	FR 1826 830 321	No Ct	
25	FR 1826 830 322	No Ct	
26	FR 1826 830 325	No Ct	
27	FR 1826 830 334	No Ct	
28	FR 1826 830 362	No Ct	
29	FR 1826 830 366	No Ct	
30	FR 2312 858 516	No Ct	
31	FR 4132 011 718	No Ct	
32	FR 4145 011 257	No Ct	
33	FR 4145 052 438	No Ct	
34	FR1822133213	NoCt	121
35	FR1824067213	NoCt	109,8
36	FR1824067218	NoCt	71,9
37	FR1824067243	NoCt	62,6
38	FR1826059685	NoCt	45,4
39	FR1826059693	NoCt	64,9
40	FR1826802135	NoCt	83,4
41	FR1826802139	NoCt	114,4
42	FR1826802141	NoCt	66,6
43	FR1826802144	40	129
44	FR1826802145	NoCt	92,2
45	FR1826802148	NoCt	38,6
46	FR1826802149	NoCt	36,2
47	FR1826802161	NoCt	75,2
48	FR1826802163	NoCt	75,3
49	FR1826802172	NoCt	55,8
50	FR1826807851	38,72	127,4
51	FR1826807875	NoCt	149,8
52	FR1826807898	NoCt	171,7
53	FR1826807900	NoCt	154,8
54	FR1826807931	NoCt	115,1
55	FR1826807932	NoCt	53,5
56	FR1826811825	33,16	94,6
57	FR1826811837	38,49	69,1
58	FR1826811838	NoCt	85
59	FR1826811840	NoCt	96,5
60	FR1826811852	NoCt	105,5
61	FR1826823003	NoCt	121,5
62	FR1826823009	NoCt	139,5
63	FR1826823017	NoCt	101,1
64	FR1826823034	NoCt	45,3
65	FR1826825484	24,56	117,7
66	FR1826825492	NoCt	133,9
67	FR1826825497	39,19	118,3
68	FR1826825499	NoCt	169,9
69	FR1826825502	NoCt	55,7
70	FR1826825503	24,88	111,3
71	FR1826825504	NoCt	62,7
72	FR1826825512	41,12	126,9
73	FR1826825514	NoCt	54
74	FR1826825515	NoCt	130,1
75	FR1826825518	NoCt	157,1
76	FR1826825521	NoCt	86,3
77	FR1826825526	NoCt	83,2
78	FR1826825529	NoCt	112,5
79	FR1826825533	NoCt	81,5
80	FR1826825541	NoCt	129,3

81	FR1826825549	38,83	98,2
82	FR1826825552	NoCt	112,5
83	FR1826825563	NoCt	132,2
84	FR1826825572	NoCt	36,2
85	FR1826825575	NoCt	139,2
86	FR1826825585	NoCt	169,7
87	FR1826825588	NoCt	110,1
88	FR1826825589	NoCt	72,9
89	FR1826825591	NoCt	185,5
90	FR1826825593	38,86	178,5
91	FR1826830332	NoCt	60,5
92	FR1826834842	NoCt	104,2
93	FR1826834843	NoCt	78,7
94	FR1826834845	NoCt	66,9
95	FR1826834846	NoCt	151,1
96	FR1826834848	23,32	181,4
97	FR1826834849	NoCt	101,9
98	FR1826834855	NoCt	40,4
99	FR1826834861	38,58	105,3
100	FR1826834862	NoCt	40,8
101	FR1826834864	NoCt	118,1
102	FR1826834865	NoCt	69,8
103	FR1826834866	NoCt	143,8
104	FR1826834880	34,96	97,1
105	FR1826834893	NoCt	92,7
106	FR1826834896	23,8	140,1
107	FR1826834908	39,49	156,1
108	FR1826834913	38,49	110,6
109	FR1826834936	NoCt	117,7
110	FR1826834953	39,66	64,7
111	FR1826834955	NoCt	149,1
112	FR1826834964	NoCt	53,3
113	FR1826834970	NoCt	141,5
114	FR1826834972	NoCt	112,4
115	FR1826834977	NoCt	111,3
116	FR1826834978	NoCt	156,9
117	FR1826834981	NoCt	153,2
118	FR1826834983	25,57	112,7
119	FR1826834987	NoCt	117,9
120	FR1826846039	24,47	138,4
121	FR1826846042	NoCt	161,6
122	FR1826846046	21,76	171,8
123	FR1826846047	34,22	175,9
124	FR1826846053	NoCt	159,9
125	FR1826846054	NoCt	125,3
126	FR1826846060	NoCt	141,1
127	FR1826846064	NoCt	148,5
128	FR1826846065	NoCt	99,5
129	FR1826846067	NoCt	117,9
130	FR1826846072	NoCt	106,3
131	FR1826846079	NoCt	168,6
132	FR1826846080	NoCt	148,8
133	FR1826846081	NoCt	160
134	FR1826846083	NoCt	148,2
135	FR1826846087	35,03	168,9
136	FR1826846088	NoCt	147
137	FR1826846093	NoCt	167,1
138	FR1826846096	35,61	175,4
139	FR1826846097	36,34	148,8
140	FR1826846099	22,09	145
141	FR1826846100	NoCt	147,1
142	FR1826846102	NoCt	151,2
143	FR1826846103	NoCt	101
144	FR1826846105	NoCt	89,8
145	FR1826846106	NoCt	156,9
146	FR1826846111	36,76	171,7
147	FR1826846113	NoCt	50,2
148	FR1826846115	NoCt	152,3
149	FR1826846120	NoCt	147,8
150	FR1826846121	NoCt	89,9
151	FR1826846125	NoCt	113,6
152	FR1826846128	NoCt	44,8
153	FR1826846129	NoCt	146,7
154	FR1826846136	NoCt	153,6
155	FR1826846140	NoCt	138,7
156	FR1826846142	NoCt	130,1
157	FR1826846143	36,8	152,7
158	FR1826846147	NoCt	133,3
159	FR1826846150	20,51	134
160	FR3617106609	NoCt	37,9
161	FR3617668207	NoCt	96,4

Elevage F

N° BV	Identification	Age	avr-18	
			PCR	ELISA
1	FR8721680927	> 24 mois	30,46	146,07
2	FR8710311351	> 24 mois	NoCt	74,313
3	FR8721711356	> 24 mois	NoCt	136,482
4	FR2312873691	> 24 mois	20,43	170,23
5	FR 3617035236	> 24 mois	NoCt	167,778
6	FR 3617035300	> 24 mois	38,62	153,372
7	FR 3617035305	> 24 mois	20,68	165,537
8	FR 3617035306	> 24 mois	NoCt	141,765
9	FR 3617035308	> 24 mois	37,33	5,359
10	FR 3617036102	> 24 mois	NoCt	137,394
11	FR 3617036125	> 24 mois	NoCt	163,017
12	FR 3617036126	> 24 mois	NoCt	115,373
13	FR 3617036206	> 24 mois	NoCt	131,83
14	FR 3617036211	> 24 mois	39,87	75,562
15	FR 3617037831	> 24 mois	NoCt	143,399
16	FR 3617037832	> 24 mois	NoCt	104,496
17	FR 3617037835	> 24 mois	NoCt	42,422
18	FR 3617037837	> 24 mois	30,29	141,117
19	FR 3617037857	> 24 mois	33,55	167,368
20	FR 3617037861	> 24 mois	NoCt	144,888
21	FR 3617037879	> 24 mois	26,6	171,646
22	FR 3617037884	> 24 mois	19,44	154,575
23	FR 3617037886	> 24 mois	38,62	156,091
24	FR 3617038854	> 24 mois	37,3	153,203
25	FR 3617038858	> 24 mois	NoCt	130,094
26	FR 3617038870	> 24 mois	NoCt	152,68
27	FR 3617038871	> 24 mois	NoCt	130,749
28	FR 3617038878	> 24 mois	NoCt	134,735
29	FR 3617038901	> 24 mois	NoCt	106,928
30	FR 3617038907	> 24 mois	37,84	144,495
31	FR 3617038944	> 24 mois	NoCt	146,701
32	FR 3617038948	> 24 mois	17,81	170,945
33	FR 3617038952	> 24 mois	27,95	151,503
34	FR 3617038953	> 24 mois	NoCt	77,199
35	FR 3617038954	> 24 mois	NoCt	89,92
36	FR 3617038958	> 24 mois	NoCt	147,974
37	FR 3618016787	> 24 mois	NoCt	8,86
38	FR 3618016804	> 24 mois	NoCt	148,454
39	FR 3618016806	> 24 mois	21,21	110,738
40	FR 3618016826	< 24 mois	39,16	118,875
41	FR 3618016842	< 24 mois	37,66	145,37
42	FR 3618016846	< 24 mois	NoCt	184,977
43	FR 3618016847			
44	FR 3618016849	< 24 mois	NoCt	72,057
45	FR 3618016850	< 24 mois	38,38	119,749
46	FR 3618016852	< 24 mois	NoCt	188,91
47	FR 3618016855	< 24 mois	39,07	121,442
48	FR 3618016857	< 24 mois	NoCt	135,427
49	FR 3618016858	< 24 mois	38,74	197,432
50	FR 3618016864	< 24 mois	NoCt	124,556
51	FR 3618021625	> 24 mois	NoCt	166,28
52	FR 3618021632	> 24 mois	NoCt	139,666
53	FR 3618021634	> 24 mois	36,55	142,614
54	FR 3618021635	> 24 mois	39,01	90,21
55	FR 3618021700	> 24 mois	NoCt	103,046
56	FR 3618021701	> 24 mois	39,13	126,189
57	FR 3618021713	> 24 mois	38,92	133,616
58	FR 3618021714	> 24 mois	NoCt	27,231
59	FR 3618021717	> 24 mois	NoCt	160,769
60	FR 3618021718	> 24 mois	38,96	117,621
61	FR 3618021720	> 24 mois	38,58	124,656
62	FR 3618022732	> 24 mois	NoCt	114,794
63	FR 3618022734	> 24 mois	38,15	132,026
64	FR 3618022738	> 24 mois	NoCt	124,365
65	FR 3618022744	> 24 mois	36,63	118,306
66	FR 3618022748	> 24 mois	NoCt	175,852
67	FR 3618022752	> 24 mois	38,29	76,07
68	FR 3618022758	> 24 mois	32,37	141,765
69	FR 3618022774	> 24 mois	NoCt	118,419
70	FR 3618022775	> 24 mois	NoCt	132,899
71	FR 3618022818	> 24 mois	NoCt	118,762
72	FR 3618022819	> 24 mois	38,55	64,756
73	FR 3618022821	> 24 mois	NoCt	89,381
74	FR 3618022824	> 24 mois	NoCt	122,541
75	FR 3618022826	> 24 mois	NoCt	133,987
76	FR 3618022827	> 24 mois	NoCt	112,763
77	FR 3618022837	> 24 mois	38,97	98,622
78	FR 3618022838	> 24 mois	37,44	145,948
79	FR 3618022843	> 24 mois	36,12	91,922
80	FR 3618023834	> 24 mois	38,45	146,12
81	FR 3618023842	> 24 mois	39,35	120,391
82	FR 3618023852	> 24 mois	NoCt	117,984

83	FR 3618023857	> 24 mois	NoCt	109,577
84	FR 3618023858	> 24 mois	NoCt	143,713
85	FR 3618023860	> 24 mois	NoCt	119,281
86	FR 3618023872	> 24 mois	NoCt	133,333
87	FR 3618023879	> 24 mois	NoCt	85,359
88	FR 3618023937	> 24 mois	NoCt	131,336
89	FR 3618023941	> 24 mois	NoCt	150,336
90	FR 3618023942	> 24 mois	30,05	171,961
91	FR 3618023943	> 24 mois	38,53	138,762
92	FR 3618023944	> 24 mois	NoCt	164,28
93	FR 3618023955	> 24 mois	NoCt	142,804
94	FR 3618023961	> 24 mois	34,57	172,418
95	FR 3618024405	> 24 mois	NoCt	129,02
96	FR 3618024406	> 24 mois	14,93	187,962
97	FR 3618024417	> 24 mois	38,43	128,693
98	FR 3618024426	> 24 mois	38,42	156,78
99	FR 3618024427	> 24 mois	30,72	161,765
100	FR 3618024428	> 24 mois	NoCt	103,464
101	FR 3618024434	> 24 mois	NoCt	93,529
102	FR 3618024435	> 24 mois	18,67	176,142
103	FR 3618024439	> 24 mois	NoCt	92,704
104	FR 3618024442	> 24 mois	NoCt	181,363
105	FR 3618024480	> 24 mois	NoCt	159,881
106	FR 3618024482	> 24 mois	NoCt	154,884
107	FR 3618024483	> 24 mois	20,48	167,752
108	FR 3618024490	> 24 mois	NoCt	125,727
109	FR 3618024491	> 24 mois	NoCt	175,019
110	FR 3618024492	> 24 mois	39,58	155,034
111	FR 3618024496	> 24 mois	36,59	148,469
112	FR 3618024500	> 24 mois	NoCt	30,392
113	FR 3618024501	> 24 mois	34,43	179,115
114	FR 3618024502	> 24 mois	NoCt	130,293
115	FR 3618024505	> 24 mois	NoCt	97,688
116	FR 3618025170	> 24 mois	NoCt	122,521
117	FR 3618025174	> 24 mois	33,65	108,203
118	FR 3618025175	> 24 mois	21,8	166,443
119	FR 3618025178	> 24 mois	34,16	117,451
120	FR 3618025181	> 24 mois	NoCt	138,852
121	FR 3618025188	> 24 mois	NoCt	144,966
122	FR 3618025205	> 24 mois	37,45	142,953
123	FR 3618025237	> 24 mois	37,68	105,798
124	FR 3618025258	> 24 mois	NoCt	148,993
125	FR 3618025262	> 24 mois	NoCt	94,444
126	FR 3618025266	> 24 mois	NoCt	134,072
127	FR 3618025267	> 24 mois	NoCt	188,218
128	FR 3618025269	> 24 mois	17,41	144,146
129	FR 3618025270	> 24 mois	NoCt	130,749
130	FR 3618025278	> 24 mois	NoCt	144,519
131	FR 3618025287	> 24 mois	NoCt	61,298
132	FR 3618025290	> 24 mois	NoCt	174,422
133	FR 3618025291	> 24 mois	37,98	150
134	FR 3618039270	> 24 mois	NoCt	144,365
135	FR 3618039271	> 24 mois	22,24	162,219
136	FR 3618039272	> 24 mois	NoCt	122,671
137	FR 3618039279	> 24 mois	39,12	157,843
138	FR 3618039289	> 24 mois	NoCt	108,013
139	FR 3618039366	> 24 mois	NoCt	101,015
140	FR 3618039367	> 24 mois	NoCt	93,66
141	FR 3618039372	> 24 mois	NoCt	70,619
142	FR 3618257646		39,23	
143	FR 3618257648		NoCt	
144	FR 3618257667		NoCt	
145	FR 3618257668		36,39	
146	FR 3618257670		NoCt	
147	FR 3618257671		NoCt	
148	FR 3618257673		36,71	
149	FR 3618257678		39,24	
150	FR 3618480235	> 24 mois	NoCt	118,235
151	FR 3618480236	> 24 mois	NoCt	141,042
152	FR 3618480238	> 24 mois	NoCt	121,042
153	FR 3618480241	> 24 mois	NoCt	3,626
154	FR 3618770781	> 24 mois	NoCt	163,959
155	FR 3618770783	> 24 mois	NoCt	171,211
156	FR 3618770795	> 24 mois	NoCt	166,86
157	FR 3618770804	> 24 mois	38,23	94,658
158	FR 3618770809	> 24 mois	39,22	76,221
159	FR 3618770811	> 24 mois	36,72	64,235
160	FR 3618770814	> 24 mois	NoCt	76,156
161	FR 3618770821	> 24 mois	NoCt	135,315
162	FR 3618770839	> 24 mois	NoCt	132,876
163	FR3618025191	> 24 mois	NoCt	121,042

Elevage G

N° BV	Identification	Kystes scléreaux	juin-19
			PCR
1	2281	oui	NoCt
2	3196	non	NoCt
3	3197	non	NoCt
4	3201	non	39,98
5	3208	non	37,59
6	3212	oui	NoCt
7	3214	non	NoCt
8	3218	non	30,92
9	3918	oui	18,32
10	3921	oui	33,91
11	3926	oui	20,07
12	4032	non	NoCt
13	4033	non	32,96
14	4034	non	NoCt
15	4035	non	38,9
16	4041	non	37,62
17	4043	non	37,4
18	5033	non	33,94
19	5039	non	39,35
20	5053	non	36,99
21	5055	non	37,67
22	5058	non	NoCt
23	5061	non	NoCt
24	5062	non	36,64
25	9296	non	32,78

Elevage H

N° BV	Identification	Age	Kystes scléreaux	Clinique	juin-19		
					PCR	ELISA	Devenir
1	866	> 24 mois	non	non	NoCt	56,8	
2	910	> 24 mois	non	non	NoCt	105,4	
3	914	> 24 mois	non	non	NoCt	103,4	
4	919	> 24 mois	non	non	NoCt	127,1	
5	922	> 24 mois	non	non	NoCt	53,7	
6	927	> 24 mois	non	non	NoCt	128,9	
7	932	> 24 mois	non	non	34,78	233,3	réforme
8	3130	> 24 mois	non	non	NoCt	121	
9	3138	> 24 mois	non	non	NoCt	165,4	
10	3145	> 24 mois	non	non	35,35	89,3	réforme
11	4262	> 24 mois	non	non	25,73	88,1	réforme
12	4263	> 24 mois	non	non	20,15	254,8	réforme
13	4972	> 24 mois	non	non	NoCt	137,7	
14	4980	> 24 mois	non	non	NoCt	185,1	
15	6108	> 24 mois	non	non	NoCt	84,3	réforme
16	7110	> 24 mois	non	non	31,94	254,5	
17	7130	> 24 mois	non	non	NoCt	143,5	
18	7591	> 24 mois	non	non	36,42	131,9	réforme
19	7599	> 24 mois	non	non	NoCt	140,5	
20	7612	> 24 mois	non	non	NoCt	140,6	
21	8770	> 24 mois	non	non	39,04	181,6	réforme
22	3146	> 24 mois	non	non	NoCt		

TITRE: LA BESNOITIOSE BOVINE : UTILISATION DE LA BIOPSIE CUTANEE COMME UN OUTIL DE DIAGNOSTIC DES INDIVIDUS FORTS CONTAMINATEURS ET STRATEGIE D'ASSAINISSEMENT DES TROUPEAUX A FORTE SEROPREVALENCE.

RESUME:

La besnoitiose bovine est une maladie parasitaire vectorielle émergente en France et en Europe. Son expansion massive au sein d'un troupeau est due à la transmission mécanique du protozoaire *Besnoitia besnoiti* entre un bovin « contaminateur » et un bovin sain, assurée par les insectes hématophages. Ne disposant à ce jour d'aucun traitement, vaccin ou de moyens efficaces de lutte contre les vecteurs, il est nécessaire de dépister les individus séropositifs « bons donateurs » de parasite pour les réformer en priorité. Dans cette étude réalisée dans huit cheptels dont la séroprévalence était très élevée (supérieure à 70%), il semblerait qu'il y ait une certaine tendance de répartition des bovins avec une faible proportion (de 9 à 28%) d'individus séropositifs ayant un taux d'ADN parasitaire significativement détectable ($Ct \leq 36$) à l'analyse PCR temps réel sur biopsie cutanée à la base de la queue. L'élimination ou la mise à l'écart rapide de ces animaux a permis de limiter considérablement les incidences sérologiques ce qui tendrait à prouver qu'il est possible par ce biais, d'éviter de nouvelles contaminations dans un troupeau. A contrario, les élevages n'ayant pris aucune mesure ont des incidences sérologiques qui sont restées très élevées. L'utilisation de la biopsie cutanée associée à l'analyse PCR temps réel semblerait être un outil de diagnostic prometteur et utilisable en pratique, permettant de détecter et classer les individus séropositifs selon leur richesse en parasite pour pouvoir réformer en priorité les plus « forts contaminateurs » dans un objectif d'assainissement des cheptels à forte séroprévalence.

MOTS-CLES: *BESNOITIA BESNOITI*, BIOPSIES CUTANEEES, PCR TEMPS REEL, ADN, SEROPOSITIF, ASSAINISSEMENT

TITLE: BOVINE BESNOITIOSIS : USE OF SKIN BIOPSY AS A DIAGNOSIS TOOL FOR STRONG CONTAMINATORS AND STABILIZATION STRATEGY FOR HIGH SEROPREVALENCE CATTLE FARMS.

ABSTRACT:

Bovine besnoitiosis is an emerging vectorial parasitic disease in France and Europe. The massive expansion in bovine population caused by mechanical transmission of the protozoan *Besnoitia besnoiti* among a "contaminator" cattle and healthy cattle, provides by hematophagous-insects. Currently, without any treatment, vaccine or effective means to reduce vector's transmission, it is necessary to detect seropositive individual "good donor" of parasite and reform it in priority. In this study performed in eight cattle farms with high seroprevalence (more than 70%), it seems like a particular trend distribution with low proportion (from 9 to 28%) of seropositive individuals with a significative detectable rate of parasitic ADN ($Ct \leq 36$) in PCR real-time on skin biopsy in base of tail. Efficient elimination or separation of these animals allowed to limit considerably serologic incidence which would tend to prove by this means to avoid new contaminations in the farm. On the contrary, the farms did not take measures remains with high serologic incidence. Use of skin biopsy combined with PCR real-time analysis seems to be a promising diagnosis tool and useful in practice, to detect and sequence seropositive individuals depending on parasitic abundance to reform in priority the "super spreader" with the aim of stabilization in high seroprevalence cattle farms.

KEYWORDS: *BESNOITIA BESNOITI*, SKIN BIOPSY, PCR REAL-TIME, DNA, SEROPOSITIVE, STABILIZATION