

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES ANNEXES	8
LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES	9
CORRESPONDANCES ENTRE LES NOMS FRANÇAIS, ANGLAIS ET LATIN DES MAMMIFÈRES MARINS CITÉS	10
INTRODUCTION	11
PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES MAMMIFÈRES MARINS ET LEURS INFECTIONS PARASITAIRES À <i>TOXOPLASMA GONDII</i>, <i>NEOSPORA CANINUM</i>, <i>SARCOCYSTIS SPP.</i> ET <i>TRICHINELLA SPP.</i>	13
1 PRESENTATION DES MAMMIFERES MARINS	13
1.1 LES CETACES	15
1.1.1 <i>Caractères anatomiques et physiologiques généraux</i>	15
1.1.1.1 Morphologie externe	15
1.1.1.2 Anatomie	17
1.1.1.2.1 Squelette	17
1.1.1.2.1.1 Crâne	17
1.1.1.2.1.2 Colonne vertébrale.....	18
1.1.1.2.1.3 Côtes	18
1.1.1.2.1.4 Sternum.....	19
1.1.1.2.1.5 Ceinture scapulaire et membre antérieur.....	19
1.1.1.2.1.6 Ceinture pelvienne et membre postérieur.....	19
1.1.1.2.2 Musculature	19
1.1.1.2.3 Appareil digestif	20
1.1.1.2.3.1 Cavité buccale	20
1.1.1.2.3.2 Pharynx	20
1.1.1.2.3.3 Œsophage	20
1.1.1.2.3.4 Estomac.....	20
1.1.1.2.3.5 Intestin et glandes annexes.....	21
1.1.1.2.4 Appareil respiratoire	22
1.1.1.2.4.1 L'évent.....	22
1.1.1.2.4.2 Larynx.....	22
1.1.1.2.4.3 Trachée	23
1.1.1.2.4.4 Poumons	23
1.1.1.2.5 Appareil circulatoire.....	24
1.1.1.2.5.1 Le cœur	24
1.1.1.2.5.2 Le système vasculaire.....	24
1.1.1.2.6 Appareil génital	25
1.1.1.2.6.1 Appareil génital mâle	25
1.1.1.2.6.2 Appareil génital femelle	25
1.1.1.2.7 Appareil urinaire	26
1.1.1.2.8 Système nerveux et organes des sens.....	27
1.1.1.2.8.1 L'encéphale	27
1.1.1.2.8.2 Les organes des sens	27
1.1.1.2.8.2.1 Le toucher	27
1.1.1.2.8.2.2 L'odorat et le goût	27
1.1.1.2.8.2.3 La vue.....	27
1.1.1.2.8.2.4 L'ouïe	28
1.1.1.2.8.2.5 L'écholocalisation.....	28
1.1.2 <i>Biologie, écologie et rapports avec l'Homme</i>	30
1.1.2.1 Habitat et répartition.....	30

1.1.2.2	Reproduction et croissance	30
1.1.2.3	Alimentation	31
1.1.2.4	Vie sociale : le groupe et la communication	31
1.1.2.5	Adaptations à la vie aquatique	32
1.1.2.5.1	Locomotion et hydrodynamisme	32
1.1.2.5.2	La plongée	33
1.1.2.5.3	La thermorégulation	33
1.1.2.6	Exploitation et conservation	34
1.1.3	Monographies	35
1.1.3.1	Les delphinidés	35
1.1.3.1.1	Le dauphin commun (<i>Delphinus delphis</i> Linné, 1758)	35
1.1.3.1.1.1	Description	36
1.1.3.1.1.2	Habitat et populations	36
1.1.3.1.1.3	Reproduction et croissance	37
1.1.3.1.1.4	Alimentation	37
1.1.3.1.1.5	Organisation sociale, comportement et activités	37
1.1.3.1.2	Le dauphin bleu et blanc ou dauphin rayé (<i>Stenella coeruleoalba</i> Meyen, 1833)	38
1.1.3.1.2.1	Description	38
1.1.3.1.2.2	Habitat et populations	39
1.1.3.1.2.3	Reproduction et croissance	40
1.1.3.1.2.4	Alimentation	40
1.1.3.1.2.5	Organisation sociale, comportement et activités	41
1.1.3.1.3	Le grand dauphin (<i>Tursiops truncatus</i> Montagu, 1821)	42
1.1.3.1.3.1	Description	42
1.1.3.1.3.2	Habitat et populations	43
1.1.3.1.3.3	Reproduction et croissance	44
1.1.3.1.3.4	Alimentation	44
1.1.3.1.3.5	Organisation sociale, comportement et activités	44
1.1.3.1.4	Le dauphin de Risso (<i>Grampus griseus</i> Cuvier, 1812)	46
1.1.3.1.4.1	Description	46
1.1.3.1.4.2	Habitat et populations	47
1.1.3.1.4.3	Reproduction et croissance	47
1.1.3.1.4.4	Alimentation	48
1.1.3.1.4.5	Organisation sociale, comportement et activités	48
1.1.3.2	Les phocoenidés	49
1.1.3.2.1	Le marsouin commun (<i>Phocoena phocoena</i> Linnaeus, 1758)	49
1.1.3.2.1.1	Description	49
1.1.3.2.1.2	Habitat et populations	50
1.1.3.2.1.3	Reproduction et croissance	50
1.1.3.2.1.4	Alimentation	51
1.1.3.2.1.5	Organisation sociale, comportement et activités	51
1.2	LES PINNIPÈDES	53
1.2.1	Caractères anatomiques et physiologiques généraux	53
1.2.1.1	Morphologie externe	53
1.2.1.2	Anatomie	54
1.2.1.2.1	Squelette	54
1.2.1.2.1.1	Crâne	54
1.2.1.2.1.2	Colonne vertébrale, côtes et sternum	54
1.2.1.2.1.3	Membres	55
1.2.1.2.1.4	Pelvis	55
1.2.1.2.2	Musculature et locomotion	55
1.2.1.2.3	Appareil digestif	56
1.2.1.2.3.1	Cavité buccale	56
1.2.1.2.3.2	Tube digestif et glandes annexes	56
1.2.1.2.4	Appareil respiratoire	57
1.2.1.2.5	Appareil circulatoire	57
1.2.1.2.6	Appareil génital	58
1.2.1.2.6.1	Appareil génital mâle	58
1.2.1.2.6.2	Appareil génital femelle	58
1.2.1.2.7	Appareil urinaire	58
1.2.1.2.8	Système nerveux et organes des sens	58
1.2.1.2.8.1	Encéphale	58
1.2.1.2.8.2	Organes des sens	59

1.2.1.2.8.2.1	La vue.....	59
1.2.1.2.8.2.2	L'ouïe.....	59
1.2.1.2.8.2.3	L'odorat.....	59
1.2.1.2.8.2.4	Les vibrisses.....	59
1.2.2	Biologie, écologie et rapports avec l'Homme.....	60
1.2.2.1	Habitat et répartition.....	60
1.2.2.2	Reproduction et croissance.....	60
1.2.2.3	Alimentation.....	61
1.2.2.4	Adaptations cardio-respiratoires à la plongée.....	62
1.2.2.5	Prédateurs.....	63
1.2.3	Monographies.....	64
1.2.3.1	Le phoque gris (<i>Halichoerus grypus</i> Fabricius, 1791).....	64
1.2.3.1.1	Description.....	65
1.2.3.1.2	Habitat et répartition.....	66
1.2.3.1.3	Reproduction et croissance.....	67
1.2.3.1.4	Alimentation.....	68
1.2.3.1.5	Organisation sociale, comportement et activités.....	68
1.2.3.2	Le phoque veau-marin (<i>Phoca vitulina</i> Linné, 1758).....	69
1.2.3.2.1	Description.....	69
1.2.3.2.2	Habitat et répartition.....	70
1.2.3.2.3	Reproduction.....	71
1.2.3.2.4	Alimentation.....	72
1.2.3.2.5	Organisation sociale, comportement et activités.....	72
2	RAPPELS SUR LES PARASITES ETUDIÉS : <i>TOXOPLASMA GONDII</i>, <i>NEOSPORA CANINUM</i>, <i>SARCOCYSTIS</i>	
SPP. ET <i>TRICHINELLA</i> SPP.....		73
2.1	CARACTERES GENERAUX DES PROTOZOAIRES.....	73
2.2	<i>TOXOPLASMA GONDII</i>	74
2.2.1	Importance de la toxoplasmose.....	74
2.2.2	Présentation du parasite.....	75
2.2.2.1	Les oocystes.....	75
2.2.2.2	Les tachyzoïtes.....	76
2.2.2.3	Les bradyzoïtes.....	76
2.2.3	Cycles parasitaires et modes d'infection.....	78
2.2.3.1	Les différents modes de contamination.....	78
2.2.3.2	Cycle HI-HD.....	78
2.2.3.3	Cycle HD-HD.....	80
2.2.3.4	Cycle HI-HI.....	80
2.2.4	Circulation mondiale des génotypes de <i>T. gondii</i>	81
2.2.5	Pathologie.....	82
2.2.5.1	Symptômes.....	82
2.2.5.2	Lésions.....	83
2.2.5.3	Action antigénique.....	83
2.2.6	Diagnostic de laboratoire.....	83
2.2.6.1	Diagnostic indirect.....	83
2.2.6.2	Diagnostic direct.....	84
2.2.6.2.1	Histologie.....	84
2.2.6.2.2	Culture cellulaire.....	84
2.2.6.2.3	Biologie moléculaire.....	85
2.2.6.2.4	Bio-essai.....	85
2.2.7	La toxoplasmose chez les humains.....	86
2.3	<i>NEOSPORA CANINUM</i>	88
2.3.1	Présentation du parasite.....	88
2.3.2	Description des différentes formes du parasite.....	88
2.3.3	Cycle parasitaire et modes d'infection.....	89
2.3.3.1	Transmission horizontale.....	89
2.3.3.2	Transmission verticale.....	89
2.3.3.2.1	Transmission transplacentaire exogène.....	89
2.3.3.2.2	Transmission transplacentaire endogène.....	89
2.3.4	Pathologie.....	90
2.3.4.1	Symptômes.....	90

2.3.4.2	Lésions	91
2.3.5	<i>Diagnostic de laboratoire</i>	91
2.3.5.1	Diagnostic indirect	91
2.3.5.2	Diagnostic direct	92
2.3.5.2.1	Histologie	92
2.3.5.2.2	Immuno-histochimie	92
2.3.5.2.3	Bio-essai et culture cellulaire	92
2.3.5.2.4	PCR	93
2.3.6	<i>Transmission aux humains</i>	93
2.4	<i>SARCOCYSTIS SPP.</i>	94
2.4.1	<i>Présentation du parasite</i>	94
2.4.2	<i>Description des formes infectantes du parasite</i>	94
2.4.2.1	Les oocystes	94
2.4.2.2	Les bradyzoïtes	94
2.4.3	<i>Cycle parasitaire et modes d'infection</i>	95
2.4.4	<i>Pathologie</i>	97
2.4.4.1	Symptômes	97
2.4.4.2	Lésions	97
2.4.5	<i>Diagnostic de laboratoire</i>	98
2.4.6	<i>Transmission aux humains</i>	98
2.5	CARACTERES GENERAUX DES HELMINTHES	99
2.6	<i>TRICHINELLA SPP.</i>	99
2.6.1	<i>Importance de la trichinellose</i>	99
2.6.2	<i>Position systématique</i>	99
2.6.3	<i>Répartition et espèces affectées</i>	100
2.6.4	<i>Cycle parasitaire et modes d'infection</i>	100
2.6.5	<i>Épidémiologie</i>	103
2.6.5.1	Cycle sauvage	103
2.6.5.2	Cycle domestique	103
2.6.6	<i>Pathologie</i>	103
2.6.6.1	Symptômes	103
2.6.6.2	Lésions	104
2.6.7	<i>Diagnostic de laboratoire</i>	104
2.6.7.1	Diagnostic direct	104
2.6.7.2	Diagnostic indirect	105
2.6.8	<i>La trichinellose humaine</i>	105
3	ÉTAT DES LIEUX DE CES INFECTIONS PARASITAIRES CHEZ LES MAMMIFERES MARINS	107
3.1	LES INFECTIONS A <i>T. GONDII</i> CHEZ LES MAMMIFERES MARINS	107
3.1.1	<i>Les cas rapportés de toxoplasmose chez des mammifères marins</i>	107
3.1.1.1	Descriptions chez les Cétacés et chez les Pinnipèdes	107
3.1.1.2	Signes cliniques observés lors de toxoplasmose chez les mammifères marins	109
3.1.1.3	Lésions observées à l'autopsie	109
3.1.1.4	Lésions observées à l'examen microscopique	109
3.1.1.5	Lésions observées chez le fœtus lors d'infection transplacentaire	110
3.1.1.6	Cas particulier des loutres de mer de Californie (<i>Enhydra lutris nereis</i>)	110
3.1.2	<i>Les enquêtes sérologiques</i>	111
3.1.2.1	Méthodes de diagnostic sérologique utilisables chez les mammifères marins	111
3.1.2.2	Enquêtes sérologiques chez les loutres de mer de Californie	112
3.1.2.3	Enquêtes sérologiques chez les Pinnipèdes	113
3.1.2.4	Enquêtes sérologiques chez les cétacés	115
3.1.3	<i>Le génotypage des souches chez les mammifères marins</i>	117
3.1.3.1	Chez les loutres de mer	117
3.1.3.2	Chez les phoques et les dauphins	117
3.1.3.3	Émergence du type I chez les mammifères marins ?	118
3.1.4	<i>Modes de contamination chez les mammifères marins</i>	118
3.1.4.1	Le rejet des oocystes dans l'eau de mer	118
3.1.4.2	Etude expérimentale de la survie des oocystes dans l'eau de mer	119
3.1.4.3	Etude expérimentale de la survie des oocystes dans les mollusques	120
3.1.4.3.1	Les huitres	120

3.1.4.3.2	Les moules.....	121
3.1.4.4	Etude expérimentale de la survie des oocystes dans les poissons	121
3.1.4.5	Infection expérimentale de phoques gris	122
3.1.4.6	Contamination transplacentaire.....	122
3.1.4.7	Bilan sur la contamination	123
3.2	LES INFECTIONS A <i>NEOSPORA CANINUM</i> CHEZ LES MAMMIFERES MARINS	124
3.3	LES INFECTIONS A <i>SARCOCYSTIS</i> SPP. CHEZ LES MAMMIFERES MARINS	125
3.3.1	<i>Infections à S. neurona chez les mammifères marins</i>	125
3.3.1.1	Présentation de <i>S. neurona</i>	125
3.3.1.2	Identification de <i>S. neurona</i> chez les mammifères marins.....	125
3.3.1.3	Prévalence des parasites <i>T. gondii</i> et <i>S. neurona</i> lors d'encéphalite chez les mammifères marins	126
3.3.1.4	Signes cliniques observés chez les mammifères marins	127
3.3.1.5	Mode de contamination des mammifères marins.....	129
3.3.2	<i>Infections à Sarcocystis spp. chez les mammifères marins</i>	129
3.4	LES INFECTIONS A <i>TRICHINELLA</i> SPP. CHEZ LES MAMMIFERES MARINS	130
3.4.1	<i>Espèces hôtes du parasite en Arctique</i>	130
3.4.2	<i>Susceptibilité des phoques à l'infection par T. nativa</i>	130
3.4.2.1	Infection expérimentale	130
3.4.2.2	Infection naturelle	131
3.4.3	<i>Modes de contamination des mammifères marins</i>	131
3.4.4	<i>Risque zoonotique</i>	132
DEUXIÈME PARTIE : ENQUÊTE SUR LA PRÉVALENCE DES INFECTIONS PARASITAIRES À TOXOPLASMA GONDII ET TRICHINELLA SPP. CHEZ LES MAMMIFÈRES MARINS ECHOUÉS SUR LES CÔTES FRANÇAISES ET ROUMAINES		133
1	MATERIEL ET METHODES	133
1.1	ECHANTILLONS ANALYSES	133
1.1.1	<i>Pré-requis : étude chez des chats</i>	133
1.1.2	<i>Collecte des échantillons de mammifères marins</i>	134
1.1.2.1	Le RNE (Réseau National Échouage) en France.....	134
1.1.2.2	Oceanic Club à Constanța, en Roumanie	136
1.1.3	<i>Échantillons analysés</i>	136
1.2	TECHNIQUES UTILISEES.....	137
1.2.1	<i>Laboratoire d'analyse des résultats</i>	137
1.2.2	<i>Recherche de la présence de Toxoplasma gondii</i>	138
1.2.2.1	L'ADHS, description de la méthode	138
1.2.2.2	Digestion enzymatique trypsique	138
1.2.2.3	Extraction d'ADN	139
1.2.2.4	La PCR quantitative en temps réel.....	139
1.2.2.4.1	Présentation de la technique	139
1.2.2.4.2	Application de la PCR en temps réel à la recherche de kystes de toxoplasmes	142
1.2.3	<i>Recherche de la présence de Trichinella spp. par digestion artificielle pepsique</i>	143
2	RESULTATS	145
2.1	RECHERCHE DE <i>T. GONDII</i>	145
2.1.1	<i>Pré-requis chez les chats</i>	145
2.1.2	<i>Prélèvements français</i>	147
2.1.2.1	Provenant d'Océanopolis, Brest	147
2.1.2.2	Provenant du CRMM de La Rochelle	150
2.1.3	<i>Prélèvements roumains</i>	152
2.2	RECHERCHE DE <i>TRICHINELLA</i> SPP.	154
3	DISCUSSION	155
CONCLUSION		165
BIBLIOGRAPHIE		167
ANNEXE.....		175

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. CARACTERISATION DU SEXE PAR L'EXAMEN DE LA REGION GENITALE CHEZ LE DAUPHIN (SOURY, 1996)	17
FIGURE 2. LES DIFFERENTES CAVITES STOMACALES DU DAUPHIN (<i>STENELLA SP.</i>) (MACE, 2003)	21
FIGURE 3. CLOISONNEMENT DES VOIES RESPIRATOIRES ET DIGESTIVES CHEZ LE DAUPHIN (MACE, 2003)	23
FIGURE 4. LOCALISATION DES <i>RETIA MIRABILIA</i> CHEZ LE DAUPHIN (MACE, 2003)	24
FIGURE 5. COUPE PARASAGITTALE SCHEMATIQUE DE MAMELLE DE CETACE (MACE, 2003)	26
FIGURE 6. DISPOSITION DES SACS AERIENS CHEZ LE DAUPHIN (PONCELET, 1999).....	29
FIGURE 7. ÉMISSION ET RECEPTION DES SONS CHEZ LE DAUPHIN (PONCELET, 1999)	29
FIGURE 8. <i>DELPHINUS DELPHIS</i> (ROBINEAU, 2005)	35
FIGURE 9. REPARTITION MONDIALE DU DAUPHIN COMMUN (SOCIETY FOR MARINE MAMMALOGY, 2012)	36
FIGURE 10. <i>STENELLA COERULEOALBA</i> (ROBINEAU, 2005)	38
FIGURE 11. COMPARAISON DE LA MORPHOLOGIE EXTERNE DES DAUPHINS COMMUN ET BLEU ET BLANC (RIDGWAY ET HARRISON, 1994).....	39
FIGURE 12. REPARTITION MONDIALE DU DAUPHIN BLEU ET BLANC (SOCIETY FOR MARINE MAMMALOGY, 2012).....	40
FIGURE 13. <i>TURSIOPS TRUNCATUS</i> (ROBINEAU, 2005)	42
FIGURE 14. REPARTITION MONDIALE DU GRAND DAUPHIN (SOCIETY FOR MARINE MAMMALOGY, 2012).....	43
FIGURE 15. <i>GRAMPUS GRISEUS</i> (ROBINEAU, 2005)	46
FIGURE 16. REPARTITION MONDIALE DU DAUPHIN DE RISSO (SOCIETY FOR MARINE MAMMALOGY, 2012)	47
FIGURE 17. <i>PHOCOENA PHOCOENA</i> (ROBINEAU, 2005)	49
FIGURE 18. REPARTITION DU MARSOUIN COMMUN (SOCIETY FOR MARINE MAMMALOGY, 2012)	50
FIGURE 19. SQUELETTE DE PHOQUE (<i>PHOCA VITULINA</i>), D'APRES BLAINVILLE (ROBINEAU, 2004)	54
FIGURE 20. PATTES ANTERIEURE (A DROITE) ET POSTERIEURE (A GAUCHE) DROITES D'UN PHOQUE GRIS (ROBINEAU, 2004)	55
FIGURE 21. <i>HALICHOERUS GRYPUS</i> , MALE ADULTE (ROBINEAU, 2004).....	64
FIGURE 22. PROFILS D'UN PHOQUE GRIS MALE ADULTE (A) ET D'UNE FEMELLE ADULTE (B) ; VUE DE FACE D'UN NOUVEAU-NE (C) (RIDGWAY ET HARRISON, 1981).....	65
FIGURE 23. REPARTITION DE <i>HALICHOERUS GRYPUS</i> (SOCIETY FOR MARINE MAMMALOGY, 2012)	66
FIGURE 24. <i>PHOCA VITULINA</i> ADULTE (ROBINEAU, 2004).....	69
FIGURE 25. MORPHOLOGIE DE LA TETE DU PHOQUE VEAU-MARIN (A GAUCHE) ET DU PHOQUE GRIS (A DROITE) (ROBINEAU, 2004)	70
FIGURE 26. REPARTITION DU PHOQUE VEAU-MARIN (SOCIETY FOR MARINE MAMMALOGY, 2012).....	71
FIGURE 27. CLASSIFICATION SIMPLIFIEE DES GENRES <i>TOXOPLASMA</i> , <i>NEOSPORA</i> ET <i>SARCOCYSTIS</i> (D'APRES BUSSIERAS ET CHERMETTE, 1992).....	74
FIGURE 28. OOCYSTE SPORULE : DEUX SPOROXYSTES RENFERMANT CHACUN QUATRE SPOROZOÏTES (EUZEBY, 1993).....	75
FIGURE 29. REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN TACHYZOÏTE (A GAUCHE) ET D'UN BRADYZOÏTE (A DROITE) DE <i>T. GONDII</i> (DUBEY, 2010)	76
FIGURE 30. KYSTE A BRADYZOÏTES OBSERVE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION CHEZ UNE SOURIS, 6 MOIS POST-INFECTION (SAMUEL, PYBUS, ET KOCAN, 2001).....	77
FIGURE 31. RUPTURE DE LA PAROI D'UN KYSTE ET LIBERATION DE CENTAINES DE BRADYZOÏTES DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> SOUS L'ACTION DES SUCS DIGESTIFS (AFSSA, 2005).....	79
FIGURE 32. SCHEMA DU CYCLE DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> , D'APRES DUBEY ET BEATTY, 1988 (AFSSA, 2005)	80
FIGURE 33. CYCLE DE <i>T. GONDII</i> CHEZ LE CHAT (DUBEY, 2010).....	81
FIGURE 34. SCHEMA DU CYCLE DE <i>NEOSPORA CANINUM</i> (DUBEY ET AL., 2007B)	90
FIGURE 35. CYCLE PARASITAIRE DE <i>SARCOCYSTIS CRUZI</i> (SAMUEL ET AL., 2001).....	95
FIGURE 36. COMPARAISON DE LA REPRODUCTION ASEUEE PAR ENDODYOGENIE POUR <i>TOXOPLASMA</i> ET PAR ENDOPOLYGENIE POUR <i>SARCOCYSTIS</i> (STRIEPEN ET AL., 2007)	96
FIGURE 37. STADES INFECTIEUX DE <i>T. SPIRALIS</i> (PHOTOS ANSES)	102
FIGURE 38. CYCLE PARASITAIRE DE <i>T. SPIRALIS</i> (ZOCEVIC ET AL., 2010).....	102
FIGURE 39. SCHEMA DU CYCLE DE <i>T. GONDII</i> CHEZ LES MAMMIFERES MARINS (MILLER, 2007)	123
FIGURE 40. COMPARAISON D'IMAGES TYPIQUES DE <i>T. GONDII</i> ET <i>S. NEURONA</i> OBSERVES EN HISTOPATHOLOGIE ET EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION (TEM) (MILLER, 2007)	128
FIGURE 41. LES ASSOCIATIONS DU RESEAU NATIONAL ÉCHOUEGE (GARLETTI, 2004)	135
FIGURE 42. HYDROLYSE DE SONDAS (POITRAS ET HOUDE, 2002).....	141
FIGURE 43. MODELE GRAPHIQUE DE LA PCR EN TEMPS REEL (POITRAS ET HOUDE, 2002).....	142
FIGURE 44. TECHNIQUE DE DIGESTION ARTIFICIELLE PEPSIQUE (D'APRES DOCUMENTS DE L'ANSES).....	144

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. CLASSIFICATION DETAILLEE DES MAMMIFERES MARINS, D'APRES OCEANOPOLIS (2006)	14
TABLEAU 2. RESUME DES PRINCIPAUX CAS CLINIQUES RAPPORTES DE TOXOPLASMOSE CHEZ LES MAMMIFERES MARINS (D'APRES DUBEY ET AL., 2003)	108
TABLEAU 3. PRINCIPALES ENQUETES DE SEROPREVALENCE REALISEES CHEZ DES PINNIPEDES	113
TABLEAU 4. PRINCIPALES ENQUETES DE SEROPREVALENCE REALISEES CHEZ DES CETACES.....	115
TABLEAU 5. NOMBRE D'INDIVIDUS OBTENUS, ESPECES ET CENTRES DE COLLECTE	137
TABLEAU 6. RESULTATS DE L'ADHS POUR LES CHATS	145
TABLEAU 7. RESULTATS DE LA PCR POUR LES CHATS	145
TABLEAU 8. RESULTAT DETAILLE DES ANALYSES EFFECTUEES CHEZ LES CHATS DE L'ENVA.....	146
TABLEAU 9. MISE EN PARALLELE DES RESULTATS OBTENUS PAR ADHS ET PCR CHEZ LES CHATS	147
TABLEAU 10. RESULTATS DE L'ADHS POUR LES PRELEVEMENTS PROVENANT D'OCEANOPOLIS	148
TABLEAU 11. RESULTATS DE LA PCR POUR LES PRELEVEMENTS PROVENANT D'OCEANOPOLIS	148
TABLEAU 12. DETAIL DES RESULTATS DES DEUX TECHNIQUES EFFECTUEES SUR LES ECHANTILLONS PROVENANT D'OCEANOPOLIS, BREST	149
TABLEAU 13. RESULTATS DE L'ADHS POUR LES PRELEVEMENTS PROVENANT DU CRMM.....	150
TABLEAU 14. RESULTATS DE LA PCR POUR LES PRELEVEMENTS PROVENANT DU CRMM.....	150
TABLEAU 16. MISE EN PARALLELE DES RESULTATS OBTENUS PAR ADHS ET PCR POUR LES MAMMIFERES MARINS PROVENANT DU CRMM DE LA ROCHELLE	151
TABLEAU 17. RESULTATS DE L'ADHS POUR LES ORGANES DE MAMMIFERES MARINS DE ROUMANIE ANALYSES INDIVIDUELLEMENT	152
TABLEAU 18. RESULTATS DE LA PCR POUR LES PRELEVEMENTS ROUMAINS.....	153
TABLEAU 19. RESULTATS DETAILLES POUR LES DEUX METHODES POUR LES ECHANTILLONS DE MAMMIFERES MARINS DE MER NOIRE	153
TABLEAU 20. MISE EN PARALLELE DES RESULTATS OBTENUS PAR ADHS ET PCR CHEZ LES MAMMIFERES MARINS DE ROUMANIE ...	154
TABLEAU 21. RESULTATS DE L'ADHS TOXOPLASMOSE EN FONCTION DES ESPECES DE MAMMIFERES MARINS ET POURCENTAGE TOTAL DANS CHAQUE CATEGORIE	156
TABLEAU 22. RESULTATS DE LA PCR TOXOPLASMOSE EN FONCTION DES ESPECES DE MAMMIFERES MARINS ET POURCENTAGE TOTAL DANS CHAQUE CATEGORIE	158
TABLEAU 23. MISE EN PARALLELE DES RESULTATS GLOBAUX D'ADHS ET DE PCR CHEZ LES MAMMIFERES MARINS	161
TABLEAU 24. COMPARAISON DES RESULTATS D'ADHS ENTRE FRANCE ET ROUMANIE SUR LES MAMMIFERES MARINS.....	163
TABLEAU 25. COMPARAISON DES RESULTATS DE PCR ENTRE FRANCE ET ROUMANIE SUR LES MAMMIFERES MARINS	164

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'ADHS.....	175
ANNEXE 2. LA DIGESTION TRYPSIQUE	176
ANNEXE 3. RECHERCHE DE LARVES DE <i>TRICHINELLA</i> PAR DIGESTION ARTIFICIELLE	177
ANNEXE 4. ÉCHOUAGES DE CETACES SUR LES COTES ROUMAINES (PHOTOS PERSONNELLES)	180
ANNEXE 5. AUTOPSIES DE CETACES EN ROUMANIE ET DE PHOQUE A OCEANOPOLIS (PHOTOS PERSONNELLES)	181
ANNEXE 6. TECHNIQUES DE LABORATOIRE : ADHS ET DIGESTION TRYPSIQUE (PHOTOS PERSONNELLES)	182

LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES

2-ME : 2 Mercaptoéthanol
ADHS : Agglutination Directe de Haute Sensibilité
ADN : Acide désoxyribonucléique
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN : Acide ribonucléique
BABS : Borate Albumine Buffer Saline
CBI : Commission Baleinière Internationale
CITES : Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction
CMNF : Coordination Mammalogique du Nord de la France
Cp : Crossing point (équivalent du Ct)
CRMM : Centre de Recherche sur les mammifères Marins
Ct : Cycle threshold (cycle seuil)
DTT : Dithioérythritol
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Dosage immuno-enzymatique sur support solide)
EPM : Equine Protozoal Myeloencephalitis (encéphalomyélite équine)
GCEM : Groupe d'Etude des cétacés de Méditerranée
GMN : Groupe Mammalogique Normand
HD : Hôte définitif
HI : Hôte intermédiaire
IFAT : Indirect fluorescent antibody test (Immunofluorescence indirecte)
IgG : Immunoglobuline G
IgM : Immunoglobuline M
IHAT : Indirect Hemagglutination Test (Test d'hémagglutination indirecte)
INRA : Institut national de la recherche agronomique
LAT : Latex Agglutination Test (Test d'agglutination au latex)
MAT : Modified Agglutination Test (Agglutination Directe Modifiée)
Mb : Mégabase
mIC : Muscle inter-costal
NE : Non Effectué
pb : Paires de bases
PBS : Phosphate Buffered Saline (Tampon Phosphate Salin)
PCB : PolyChloroBiphényles
PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
PI : Post Infection
ppt : Parts per trillion (parties par millions)
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction)
RNE : Réseau National Échouage
RPM : Rotations par minute
TEM : Transmission Electron Microscopy (Microscopie électronique en transmission)
UMR BIPAR : Unité Mixte de Recherche de Biologie moléculaire et immunologie parasitaires et fongiques
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

CORRESPONDANCES ENTRE LES NOMS FRANÇAIS, ANGLAIS ET LATIN DES MAMMIFÈRES MARINS CITÉS

Noms français	Noms anglais	Noms latin
Baleine à bosse	Humpback whale	<i>Megaptera novaeangliae</i>
Baleine bleue	Blue whale	<i>Balaenoptera musculus</i>
Baleine de Minke	Minke whale	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>
Baleine pygmée	Pygmy right whale	<i>Caperea marginata</i>
Bélouga	Beluga whale	<i>Delphinapterus leucas</i>
Cachalot ou grand cachalot	Sperm whale	<i>Physeter macrocephalus</i>
Dauphin à long bec	Spinner dolphin	<i>Stenella longirostris</i>
Dauphin bleu et blanc	Striped dolphin	<i>Stenella coeruleoalba</i>
Dauphin commun	Common dolphin	<i>Delphinus delphis</i>
Dauphin de Commerson	Commerson's dolphin	<i>Cephalorhynchus commersoni</i>
Dauphin de Risso	Risso's dolphin	<i>Grampus griseus</i>
Éléphant de mer	Elephant seal	<i>Mirounga leonina</i>
Globicéphale commun ou noir	Long-finned pilot whale	<i>Globicephala melas</i>
Grand dauphin	Bottlenose dolphin	<i>Tursiops truncatus</i>
Lamantin des Caraïbes	West Indian manatee	<i>Trichechus manatus</i>
Léopard de mer	Leopard seal	<i>Hydrurga leptonyx</i>
Lion de mer de Californie	California sea lion	<i>Zalophus californianus</i>
Loutre de mer	Sea otter	<i>Enhydra lutris</i>
Marsoin commun	Harbour porpoise	<i>Phocoena phocoena</i>
Morse	Walrus	<i>Odobenus rosmarus</i>
Narval	Narwhal	<i>Monodon monoceros</i>
Orque	Killer whale	<i>Orcinus orca</i>
Otarie à fourrure antarctique ou otarie de Kerguelen	Antarctic fur seal	<i>Arctocephalus gazella</i>
Otarie à fourrure du nord	Northern fur seal	<i>Callorhinus ursinus</i>
Ours blanc ou ours polaire	Polar bear	<i>Ursus maritimus</i>
Phoque à capuchon	Hooded seal	<i>Cystophora cristata</i>
Phoque à ruban	Ribbon seal	<i>Phoca fasciata</i>
Phoque annelé ou marbré	Ringed seal	<i>Phoca (Pusa) hispida</i>
Phoque barbu	Bearded seal	<i>Erignathus barbatus</i>
Phoque commun ou veau-marin	Harbor seal	<i>Phoca vitulina</i>
Phoque crabier	Crabeater seal	<i>Lobodon carcinophaga</i>
Phoque de Weddell	Weddell seal	<i>Leptonychotes weddellii</i>
Phoque du Groenland	Harp seal	<i>Phoca groenlandica</i>
Phoque gris	Grey seal	<i>Halichoerus grypus</i>
Phoque moine	Monk seal	<i>Monachus sp.</i>
Phoque veau-marin tacheté	Spotted seal	<i>Phoca largha</i>

INTRODUCTION

Les relations entre la santé des humains, des animaux et de l'environnement dans lequel ils vivent sont bien connues. Partout dans le monde, les organismes marins sont de plus en plus contaminés par des parasites et d'autres maux propres aux animaux domestiques terrestres. Parasites, champignons, virus et bactéries passent plus facilement de la terre à la mer à cause de l'action de l'homme qui bétonne ou assèche des zones marécageuses ayant joué le rôle de filtre naturel et pratique une agriculture intensive.

Le concept des organismes marins sentinelles fournit une approche d'évaluation de la santé de l'écosystème aquatique. Ces sentinelles servent de signal d'alarme précoce lors d'impacts négatifs sur leur santé, que ce soit à l'échelle individuelle ou de la population. On peut ainsi caractériser ces impacts qui, pour certains d'entre eux, ont des retombées directes sur la santé de l'Homme, pour qui la mer est un lieu de vacances, un lieu de travail, ou encore une source de nourriture, tandis que d'autres sont les indicateurs d'un syndrome de détresse environnementale.

Les mammifères marins sont des sentinelles de premier choix pour l'étude des maladies infectieuses émergentes ou ré-émergentes ou pour l'effet des toxiques libérés dans l'environnement *via* les activités humaines, tels les polychlorobiphényles (PCB). En effet, la plupart de ces espèces ont de longues espérances de vie, vivent souvent près des côtes et partagent donc le même environnement que les humains, peuvent se nourrir des mêmes invertébrés (moules, huitres, etc.) et constituent d'importantes réserves adipeuses qui accumulent les produits chimiques et toxiques. M. Trites, directeur de l'unité de recherche sur les mammifères marins au Centre de la pêche à l'Université de la Colombie-Britannique, compare les animaux morts échoués sur les côtes à des "canaris de mines de charbon" (qui avertissaient par leur mort de la présence de gaz) (Fondation GoodPlanet, 2012). En conséquence, la recherche sur ces espèces est un domaine porteur (Stewart *et al.*, 2008; Bossart, 2011).

Par ailleurs, la viande de mammifères marins est susceptible d'être consommée par les humains et la recherche sur les zoonoses que ces animaux peuvent transmettre est très importante. Certaines populations sont particulièrement exposées, comme les Inuits, pour qui ces animaux constituent un aliment de base (Simon *et al.*, 2011). Cependant, ce ne sont pas les seules populations susceptibles de se contaminer *via* l'ingestion de viande de mammifères marins. Selon Robards et Reeves (2011) qui synthétisent les connaissances actuelles concernant la consommation de mammifères marins par les humains dans le monde depuis 1970 jusqu'en 2009, l'utilisation de ces ressources est mondialement répandue. Depuis 1990, des individus provenant d'au moins 114 pays ont consommé au moins une ou plusieurs espèces parmi 87 espèces de mammifères marins (soit environ 2/3 du total des mammifères marins peuplant notre planète). La chasse aux grands cétacés a disparu suite à la création de la Commission baleinière internationale (CBI) en 1946, mais en contrepartie, la capture des mammifères marins de plus petite taille s'est accrue dans de nombreuses régions côtières et est actuellement considérée comme une menace majeure pesant sur ces espèces. Ces pratiques ne sont pas toujours intentionnelles : dans certains cas, ce sont les espèces échouées ou qui meurent accidentellement dans les filets de pêche qui sont ensuite consommées, mais dans d'autres cas, l'intention est clairement de chasser ces espèces en vue de la consommation humaine. Les pays capturant plusieurs milliers d'individus chaque année sont le Japon, de loin le plus gros consommateur (32 espèces différentes), suivi par plusieurs pays couvrant les régions arctiques (Canada, Danemark, Russie, États-Unis d'Amérique), puis les Iles Féroé,

l'Australie et les Iles Salomon (centaines à quelques milliers d'individus). De plus, actuellement, certains pays d'Amérique du Sud, d'Afrique de l'Ouest et d'Asie se mettent à consommer des mammifères marins, particulièrement de petits cétacés emprisonnés dans leurs filets de pêche, à des niveaux comparables aux Iles Féroé. La France n'est pas indemne de ces pratiques, les mammifères marins emprisonnés dans les filets n'étant parfois pas relâchés, mais consommés. Ceci reste cependant des pratiques individuelles et non diffusées à grande échelle comme dans d'autres États.

Le cas de la toxoplasmose est particulièrement intéressant chez les Inuits du Nunavik au Québec. Une étude a évalué que 60 % de cette population est séropositive (Messier *et al.*, 2009). Ce pourcentage est relativement élevé car les Félidés sont quasiment absents de la région. En comparaison, les taux de séropositivité chez les Indiens Cris, voisins des Inuits du Nunavik et qui partagent le même écosystème et les mêmes sources d'eau, sont autour de 5 à 10 % (Lévesque *et al.*, 2007; Campagna *et al.*, 2011). L'ingestion d'eau non traitée ne peut être mise en cause pour expliquer ces séropositivités et c'est donc aux habitudes alimentaires qu'il faut s'intéresser. La consommation de viande de phoque peu cuite a été identifiée comme facteur de risque (Tryland *et al.*, 2011). De la même manière, des cas d'infections à *Trichinella nativa* ont été identifiés en Arctique suite à la consommation de viande de divers mammifères marins tels que les morses, phoques ou ours blancs.

De plus, de récents épisodes de toxoplasmose humaine aiguë, associés à des sources d'eau contaminée en Amérique du Nord ont fait prendre conscience du risque de transmission du parasite *via* l'eau. Ainsi, une épidémie de toxoplasmose à Vancouver en 1995 a été reliée à la contamination d'un réservoir d'eau potable par les oocystes libérés par un chat (Bowie *et al.*, 1997). Le milieu marin est soumis aux mêmes risques de contamination. Une cause probable de contamination par *Toxoplasma gondii* serait le lessivage des sols par les eaux de pluie. Les oocystes libérés sur le sol par les chats, hôtes définitifs du parasite, atteignent ainsi le milieu marin et peuvent être concentrés par les mollusques filtreurs. Le rejet des eaux usées municipales et des bateaux dans la mer conduit également à une accumulation d'oocystes dans le milieu marin. La contamination des mammifères marins est par conséquent le reflet de la pollution marine par les oocystes de *T. gondii* et ces animaux pourraient jouer un rôle de sentinelle dans le cadre de la santé publique. D'autres protozoaires, *Neospora caninum* et *Sarcocystis* spp. sont également décrits chez les mammifères marins, le plus souvent en lien avec *T. gondii*.

L'objectif de cette thèse est tout d'abord, dans une première partie bibliographique, de rappeler les éléments de biologie et d'écologie se rapportant aux mammifères marins et aux parasites étudiés, puis d'effectuer la synthèse bibliographique des connaissances accumulées au cours des dernières décennies sur les infections à *T. gondii*, *N. caninum*, *Sarcocystis* spp. et *Trichinella* spp. chez ces animaux, afin d'étudier leurs séroprévalences, leurs conséquences cliniques et les modes de transmission de ces parasites terrestres à l'origine jusqu'au milieu marin. La partie expérimentale de notre thèse a pour objet la recherche du parasite *T. gondii* chez les mammifères marins échoués sur les côtes françaises et roumaines, par sérologie (ADHS) et biologie moléculaire (PCR). Disposant des prélèvements de mammifères marins, il nous a semblé intéressant d'étendre notre étude à la recherche de *Trichinella* spp. malgré l'absence de description du parasite chez des mammifères marins ailleurs qu'en Arctique.

À notre connaissance, cette étude est la première du genre en France et en Roumanie (seule l'étude de Cabezon *et al.* (2011) s'est intéressée aux phoques gris de Molène) et permet de donner une idée de l'infestation parasitaire des eaux françaises et roumaines par *Toxoplasma gondii* et *Trichinella* spp.

PREMIÈRE PARTIE :

**SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE DES
CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES
MAMMIFÈRES MARINS ET LEURS INFECTIONS
PARASITAIRES À *TOXOPLASMA GONDII*,
NEOSPORA CANINUM, *SARCOCYSTIS* SPP. ET
TRICHINELLA SPP.**

1 Présentation des mammifères marins

Les mammifères marins sont d'anciens mammifères terrestres. Leur retour vers le milieu marin les a conduits à utiliser et exploiter de nouvelles niches écologiques (habitat et nourriture). L'adaptation de ces animaux au milieu marin a débuté il y a 60 millions d'années. Ils possèdent toutes les caractéristiques des mammifères, mais s'en distinguent par leur apparence et leurs stratégies de survie (Océanopolis, 2006).

Les mammifères marins comptent environ 124 espèces dans le monde (soit quasiment 3 % des 4500 espèces décrites de mammifères).

Ils sont répartis dans trois ordres (The Marine Mammal Center, 2012) (tableau 1) :

- les **carnivores** : pinnipèdes (phoques, morses et otaries), mustelidae (loutres de mer) et ursidae (Ours polaires) ;
- les **cétacés**, divisés en deux sous-ordres : mysticètes (cétacés à fanons : rorquals, baleines, etc.) et odontocètes (cétacés à dents : dauphins, cachalots, marsouins, orques, globicéphales, etc.) ;
- les **siréniens** (lamantins et dugongs).

Les cétacés et les siréniens sont des mammifères totalement aquatiques, tandis que les carnivores dépendent à la fois du milieu terrestre et du milieu aquatique.

Il ne s'agit pas d'un ensemble taxinomique bien précis : les baleines et les dauphins sont davantage apparentés aux hippopotames et aux ruminants (artiodactyles) qu'aux autres mammifères marins, les siréniens aux éléphants, tandis que les morses, phoques, loutres de mer et otaries sont apparentés aux ours.

Les espèces les plus susceptibles d'être rencontrées dans les eaux françaises métropolitaines appartiennent aux odontocètes (dauphin commun, grand dauphin, dauphin bleu et blanc, marsouin commun, dauphin de Risso, globicéphale noir, cachalot et orque), aux mysticètes (rorqual commun et petit rorqual) et aux pinnipèdes (phoque gris et phoque veau-marin) (Van Canneyt *et al.*, 2011).

En Mer Noire, seules trois espèces d'odontocètes sont présentes (dauphin commun, grand dauphin et marsouin commun).

Tableau 1. Classification détaillée des mammifères marins, d'après Océanopolis (2006)

Sous-Ordres	Familles	Genres	Nombre d'espèces ^a
Ordre des Cétacés			
Odontocètes	<i>Delphinidae</i> ^{b,c}	Dauphins, globicéphales, orque	36
	<i>Iniidae</i>	Inia	2
	<i>Kogidae</i>	Cachalots	2
	<i>Lipotidae</i>	Dauphin de rivière	1
	<i>Monodontidae</i>	Narval et béluga	2
	<i>Phocoenidae</i> ^{b,c}	Marsouins	6
	<i>Physeteridae</i> ^b	Cachalot	1
	<i>Platanistidae</i>	Dauphins de rivière	2
	<i>Pontoporiidae</i>	Dauphin fluvial	1
	<i>Ziphiidae</i>	Baleines à bec	19
Mysticètes	<i>Balaenidae</i>	Baleines	3
	<i>Balaenopteridae</i> ^b	Rorquals	7
	<i>Eschrichtiidae</i>	Baleine grise	1
	<i>Neobalaenidae</i>	Baleine pygmée	1
Ordre des Carnivores			
Pinnipèdes	<i>Odobenidae</i>	Morse	1
	<i>Otariidae</i>	otaries, Lions de mer	14
	<i>Phocidae</i> ^b	phoques, Éléphant de mer, Léopard de mer	19
« Autres »	<i>Mustelidae</i>	Loutres de mer	1
	<i>Ursidae</i>	Ours blanc	1
Ordre des Siréniens			
	<i>Trichechidae</i>	Lamantins	3
	<i>Dugongidae</i>	Dugong	1

^a Il est difficile de déterminer le nombre exact d'espèces de cétacés car les scientifiques ne sont pas unanimes à ce sujet, certaines espèces considérées comme distinctes par certains étant regroupées dans une même espèce par d'autres.

^b Familles présentes dans les eaux françaises métropolitaines

^c Familles présentes en Mer Noire

Dans ce travail bibliographique, nous avons choisi de nous consacrer uniquement aux dauphins, marsouins et phoques peuplant les eaux métropolitaines et roumaines car ce sont les espèces les plus susceptibles d'être incluses dans notre étude expérimentale.

1.1 Les cétacés

Le mot cétacé vient du latin *cet* qui signifie « grand animal » et du grec *ketos* qui signifie « monstre marin ». Il y a actuellement 79 espèces répertoriées dans deux sous-ordres : les mysticètes et les odontocètes.

Globalement, les mysticètes, qui comptent 11 espèces, regroupent ce que nous appelons communément les « baleines », animaux de grande taille à la bouche garnie de fanons qui leur permettent de filtrer une nourriture de dimension réduite : plancton, crustacés ou poissons. Leur taille est très variable, de 6 m pour la baleine pygmée, certainement la plus petite et la moins connue des baleines, à 27 m pour la baleine bleue, probablement le plus grand animal ayant jamais existé sur Terre. Le poids peut atteindre 20, 50 et même 100 voire 120 tonnes (Garletti, 2004).

Les cétacés à dents (leur nombre de dents est très variable : de 0 chez le narval femelle et 1 chez le mâle, à 252 chez le dauphin à long bec) regroupent les dauphins, marsouins, orques et cachalots, au total, pas moins de 68 espèces. Leur taille est elle aussi très variable de 1,30 m pour le dauphin de Commerson à 18 mètres pour le grand cachalot. Le poids est en rapport avec la longueur. De 80 à 300 kg chez les *Delphinidae*, il peut s'élever chez les grands dauphins jusqu'à 500 et 1 000 kg, 2 ou 3 tonnes chez les orques, et jusqu'à 50 tonnes chez les cachalots (Garletti, 2004).

1.1.1 Caractères anatomiques et physiologiques généraux

1.1.1.1 Morphologie externe

Les cétacés constituent un ordre de la classe des mammifères exclusivement aquatique et essentiellement caractérisé par l'apparence pisciforme des animaux qui le composent et l'absence totale des membres postérieurs à l'extérieur du corps (on en retrouve quelques rudiments squelettiques internes chez les grands cétacés). Le corps, dépourvu de cou, plus ou moins fusiforme, est terminé en arrière par une queue élargie et aplatie en forme de nageoire transversale, qui remplace cette seconde paire de membres. Cette nageoire caudale est l'organe propulseur le plus important (Bourdelle et Grassé, 1984).

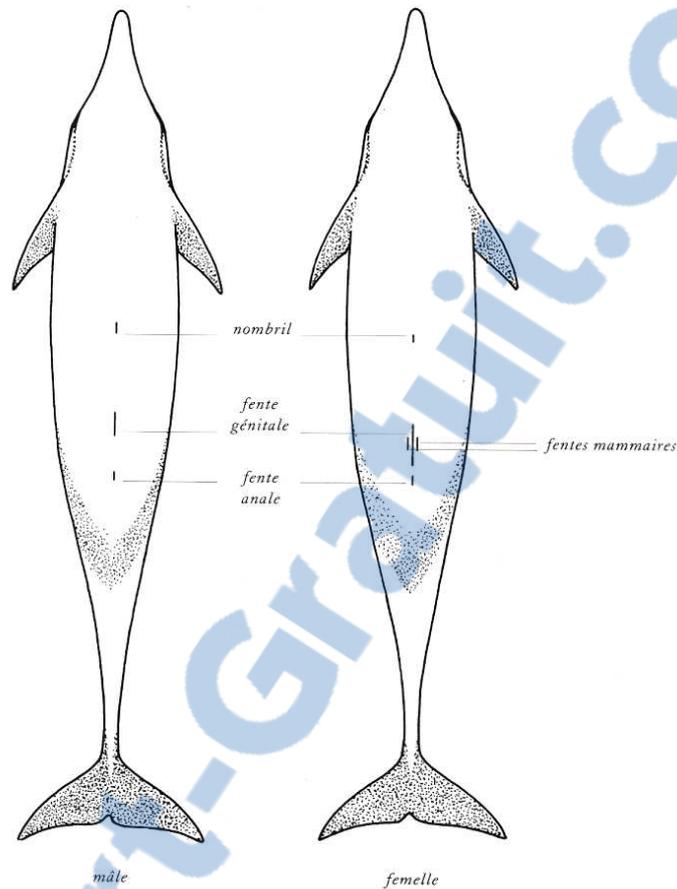
La paire de membres antérieurs est transformée en nageoires pectorales, véritables palettes natatoires qui se présentent bien détachées du tronc. Bras et avant-bras sont réduits, tandis que les doigts, dépourvus d'ongles, sont entourés d'une enveloppe commune de tissu fibreux et de peau. Souvent il existe en outre une nageoire dorsale, duplication de la peau et du tissu sous-cutané se soulevant le long de la ligne médio-dorsale. Sous ses deux faces, elle est renforcée par une couche de fortes fibres conjonctives, mais ni formation osseuse, ni muscle n'entrent dans la structure de cette nageoire (Bourdelle et Grassé, 1984).

Du fait de l'absence de cou, au moins à l'extérieur, le corps porte en avant une tête massive à la base, conique et plus ou moins allongée, terminée par un museau en pointe mousse (marsouins, orques) ou par un « bec » bien défini (dauphins) avec une bouche assez largement fendue, sans lèvres détachées. La boîte crânienne, globuleuse et large, est décalée vers l'arrière. Les mâchoires sont armées de dents en général nombreuses, d'une seule catégorie (c'est-à-dire qu'on n'y distingue ni incisives, ni canines, ni molaires) : ces dents sont simplement coniques. Chez les baleines elles sont remplacées par des lamelles de nature cornée appelées fanons. Les narines sont disposées en évent simple (odontocètes) ou double (mysticètes), s'ouvrant généralement loin du museau, vers le sommet de la tête. Il n'y a pas d'oreille externe. Les yeux, relativement petits, s'ouvrent latéralement à proximité de l'angle de la bouche. Chez les odontocètes, une masse adipeuse parfois globuleuse, le melon, compose une sorte de front plus ou moins bien séparé du bec (Robineau, 2005).

La peau est généralement nue, sauf quelques poils rares insérés sur les lèvres, sans glandes sébacées ou sudoripares. L'épiderme est particulièrement mince. Le derme est un matelas de tissu conjonctif à fibres parallèles à l'axe du corps dont peu sont élastiques ; il ne contient pas de fibres musculaires lisses. En profondeur, le derme devient le lard. Cet épais pannicule grasseux confère, en effaçant les inégalités de surface sous-jacentes, un hydrodynamisme parfait du corps, renforcé par la disparition (pavillons auditifs) ou la localisation interne (mamelons, organes génitaux externes des mâles) des organes susceptibles d'entamer la progression. La coloration des cétacés est assez rarement uniforme. Il y a le plus souvent association de blanc, brun et noir ardoisé (Soury, 1996).

Le perfectionnement de l'hydrodynamisme a eu pour conséquence de gommer les différences sexuelles externes mais la détermination du sexe est aisée si l'on peut examiner la région génitale (figure 1). Pour distinguer un mâle d'une femelle, l'examen rapproché est nécessaire. Le nombril est placé approximativement au milieu de la partie abdominale et l'anus en retrait, à la naissance du pédoncule caudal. Tous deux possèdent une fente génitale. Chez le mâle, celle-ci est nettement séparée de l'anus, alors qu'elle est beaucoup plus proche chez la femelle et est entourée par deux fentes mammaires plus petites. Pour certaines espèces, le dimorphisme sexuel est flagrant : par la taille (les odontocètes mâles sont généralement plus grands que les femelles), les dents (le mâle narval adulte possède une dent hypertrophiée qui peut atteindre 2,50 m) ou par la silhouette (l'orque mâle possède un aileron dorsal haut et triangulaire, tandis que celui de la femelle est falciforme et plus petit). Néanmoins, pour la plupart des dauphins, il est souvent impossible de les sexer dans la nature (Bourdelle et Grassé, 1984; Robineau, 2005).

Figure 1. Caractérisation du sexe par l'examen de la région génitale chez le dauphin (Soury, 1996)



1.1.1.2 Anatomie

1.1.1.2.1 Squelette

Le squelette des cétacés se caractérise par la réduction, ou même la disparition d'un certain nombre d'os (au niveau des membres et de leurs ceintures) et par un remodelage plus ou moins accentué de ses autres parties (crâne, squelette axial). Par ailleurs, presque tous les os présentent une porosité notable et un aminuement, voire la suppression, de leur corticale. Ces phénomènes expliquent le poids relatif extrêmement faible du squelette (3,68 % du poids total du corps chez *D. delphis*) (Bourdelle et Grassé, 1984 ; Robineau, 2005).

1.1.1.2.1.1 Crâne

Le crâne des cétacés diffère grandement de celui de tous les autres mammifères par la disparition de certaines parties et surtout par une modification profonde des rapports topographiques des os et des proportions de ceux-ci. Le facteur morphogénétique le plus important est la position très postérieure des narines externes. Ce recul a entraîné les os

nasaux, très réduits, vers l'arrière et vers le haut, et a eu pour conséquence l'extension postérieure des prémaxillaires et des maxillaires. Ces derniers ont glissé et se sont largement étalés au-dessus des frontaux qui, eux-mêmes, ont écarté les pariétaux de la voûte crânienne et sont venus s'articuler dorsalement au supra-occipital. Ce remaniement induit un changement des rapports de contact entre les différents os et est désigné par le terme de télescopage. Ces modifications sont moins importantes chez les mysticètes que chez les odontocètes. Une autre conséquence du recul des narines externes des cétacés, pourrait être le raccourcissement (compensé par un élargissement) de la boîte crânienne, dont la longueur devient plus faible que la largeur (Bourdelle et Grassé, 1984 ; Robineau, 2005).

1.1.1.2.1.2 Colonne vertébrale

La colonne vertébrale des cétacés se caractérise par une réduction de la région cervicale et un important accroissement de sa portion post-thoracique. Le nombre de vertèbres varie selon les espèces de 40 à 93. Du point de vue fonctionnel, elle n'offre qu'une seule courbure, à convexité dorsale, et se subdivise en deux parties. Sa partie antérieure (au niveau du cou, du thorax et de la plus grande portion de l'abdomen) est rigide par suite de l'aplatissement des faces antérieure et postérieure des corps vertébraux, de l'absence (ou de l'extrême réduction) des disques intervertébraux et de la présence d'un ligament longitudinal ventral. Ces restrictions disparaissent dans la région caudale, particulièrement souple et mobile.

Comme tous les mammifères, les cétacés possèdent sept vertèbres cervicales, libres ou soudées entre elles selon les genres considérés et très aplaties d'avant en arrière. Le nombre des vertèbres thoraco-lombaires et caudales varie d'une espèce à l'autre (par exemple, pour *Tursiops truncatus* : 7C, 13T, 16L, 26Cd et pour *Delphinus delphis* : 7C, 14T, 21L, 33Cd). En rapport avec la formation d'une queue à fonction locomotrice et avec la perte des membres postérieurs et du bassin, la colonne vertébrale présente certains caractères très particuliers. Les vertèbres lombaires augmentent de taille pour permettre l'insertion des divers muscles caudaux. Le sacrum n'existe plus en tant que tel : les vertèbres sacrées perdent les particularités qu'elles possèdent chez les mammifères terrestres. Elles sont quasiment identiques aux lombaires qui les précèdent et aux caudales qui les suivent. Par ailleurs, l'os pelvien occupe une position basse et n'a pas de rapport avec la colonne vertébrale. Les vertèbres caudales, sauf celles contenues dans la nageoire caudale, n'ont plus une apparence atrophiée, mais acquièrent un centre puissant à apophyses transverses fortes et aplaties, un arc dorsal et un arc ventral. Leur taille décroît régulièrement d'avant en arrière tandis que régressent leurs apophyses (Bourdelle et Grassé, 1984 ; Robineau, 2005).

1.1.1.2.1.3 Côtes

Le thorax est composé suivant les espèces de 9 à 15 paires de côtes. Chez les odontocètes, les 4 à 7 premières côtes sont sternales, les autres sont flottantes. Chez les mysticètes, seule la première côte s'articule avec le sternum. Les premières côtes s'articulent avec la vertèbre selon une double articulation, comme chez les autres mammifères mais les côtes postérieures ont des modes d'insertion qui varient parfois d'un genre à un autre. Chez les mysticètes, les côtes ne s'unissent plus aux vertèbres, à l'exception des 2^{èmes} et 3^{èmes} côtes qui restent en liaison très lâche avec les vertèbres (Bourdelle et Grassé, 1984 ; Robineau, 2005).

1.1.1.2.1.4 Sternum

Le sternum comporte toujours un manubrium, mais pas d'appendice xiphoïde. Chez les mysticètes, il se réduit au manubrium, chez les odontocètes, on dénombre en outre de une à quatre sternèbres rudimentaires (Bourdelle et Grassé, 1984).

1.1.1.2.1.5 Ceinture scapulaire et membre antérieur

La ceinture scapulaire, toujours dépourvue de clavicule, est réduite à une omoplate aplatie très large, en éventail. Le membre antérieur présente un humérus, un radius et une ulna relativement courts et épais, ces deux derniers n'étant pas soudés entre eux. Le squelette de la main forme un ensemble élargi et allongé, constitué par un massif carpien à 5 ou 6 os, auquel sont suspendus 3, 4 ou 5 métacarpiens courts et larges qui supportent chacun un doigt, avec un accroissement du nombre de phalanges des doigts centraux II et III (jusqu'à 15 et 11 phalanges aux doigts II et III chez *Globicephala melas*). L'allongement de la nageoire dépend ainsi de la longueur du radius et de l'ulna et de l'hyperphalangie des doigts II et III. La largeur de la nageoire dépend, elle, de l'écartement des doigts, qui peuvent être accolés ou largement ouverts en éventail. Seule l'articulation entre l'humérus et l'omoplate est fonctionnelle, les autres articulations sont pratiquement immobilisées. La main est légèrement en supination, son bord antérieur tourné vers le bas. Aucun vestige de griffe ne persiste (Robineau, 2005).

1.1.1.2.1.6 Ceinture pelvienne et membre postérieur

Il ne subsiste du bassin que deux petites tiges osseuses enfouies dans les masses musculaires de part et d'autre de la fente génito-urinaire et indépendantes de la colonne vertébrale. Sur ces tiges s'insèrent les corps caverneux du pénis et les muscles ischiocaverneux. Chez les mysticètes, aux vestiges du bassin s'ajoutent ceux des membres, sous la forme d'un fémur et d'un tibia rudimentaires. Chez les odontocètes, les vestiges des membres postérieurs sont encore plus discrets, puisqu'on ne trouve une trace de fémur que chez le grand cachalot. On ne saurait trop insister sur le fait que la nageoire caudale, organe locomoteur par excellence, est « néoformée » chez les cétacés et n'a aucun rapport avec les membres postérieurs. C'est là l'une des plus grandes originalités de ces mammifères (Bourdelle et Grassé, 1984 ; Robineau, 2005).

1.1.1.2.2 Musculature

Les muscles forment une masse charnue considérable qui représente environ le tiers et parfois même la moitié du poids total du cétacé considéré. On estime que les grandes espèces possèdent 10 tonnes de muscles pour 15 mètres de longueur. À part les muscles pectoraux qui forment des organes assez bien différenciés pour satisfaire aux mouvements étendus des nageoires pectorales, les muscles massétéris destinés à mobiliser les mâchoires sont déjà beaucoup moins différenciés et les muscles du tronc, allongés suivant l'axe vertébral ne permettent que difficilement la dissociation de leurs faisceaux respectifs. Les muscles abdominaux sont à la fois puissants et fortement aponévrotiques et le trajet inguinal reste imperforé en raison de l'absence de gaine vaginale par suite du défaut de descente des testicules. Le diaphragme enfin, placé en position très oblique de haut en bas et d'arrière en avant, à la limite du thorax et de l'abdomen, est fortement développé dans sa portion charnue (Bourdelle et Grassé, 1984).

1.1.1.2.3 Appareil digestif

1.1.1.2.3.1 Cavité buccale

L'appareil digestif commence à l'extrémité de la tête par une cavité buccale allongée, sans véritables joues, ouverte en avant par une bouche assez longuement fendue mais sans lèvres distinctes. La langue est en saillie sur le plancher de la bouche, plus ou moins étroitement associée à lui. La surface de la langue est le plus souvent unie, quelquefois relevée de papilles diverses.

Les dents n'existent que chez les cétacés qualifiés pour cela d'odontocètes. Ceux-ci sont homodontes, c'est-à-dire que toutes leurs dents sont semblables et en même temps haplodontes, c'est-à-dire qu'ils ne possèdent que des dents de type simple, de forme conique et uniradiculées. Les dents des odontocètes ne peuvent servir à mâcher, mais sont propres à saisir et à happer les poissons et les céphalopodes les plus agiles. La nourriture est souvent engloutie d'une seule bouchée. Les espèces teutophages (qui se nourrissent de céphalopodes) possèdent moins de dents que les ichtyophages (qui se nourrissent de poissons). Ces derniers sont armés de nombreuses dents pointues qui facilitent la capture des poissons à grande vitesse.

Les dents font défaut chez les mysticètes où elles sont remplacées par des formations épidermiques spéciales désignées sous le nom de fanons. Ceux-ci forment un dispositif filtrant bien adapté au régime planctonophage des baleines. Chaque fanon est une lame cornée, plus ou moins longue, en forme de triangle rectangle dont l'insertion se fait par le petit côté et dont l'hypoténuse est tournée vers l'intérieur de la bouche. Le côté externe est lisse, tandis que l'hypoténuse s'effiloche en filaments grossiers. Les fanons se disposent les uns derrière les autres à une distance de 6 mm environ, leurs franges s'intriquent les unes dans les autres formant une broussaille serrée servant de filtre. Des fanons plus petits, dits accessoires et insérés plus médialement, doublent les fanons principaux (Bourdelle et Grassé, 1984).

1.1.1.2.3.2 Pharynx

Le pharynx des mysticètes est très étroit et ne laisse passer qu'un bol alimentaire de petite taille. Celui des odontocètes, au contraire, est très large. Le pharynx, allongé, est traversé par le larynx qui s'engage dans l'ouverture gutturale des cavités nasales, étroitement enserré par un sphincter. Les aliments déglutis passent de part et d'autre du larynx et tombent dans l'œsophage. Cette disposition assure, en semi-immersion, l'indépendance de la respiration aérienne et de la déglutition et, en immersion complète, la déglutition d'aliments sans que l'eau puisse passer dans les voies pulmonaires (Bourdelle et Grassé, 1984).

1.1.1.2.3.3 Œsophage

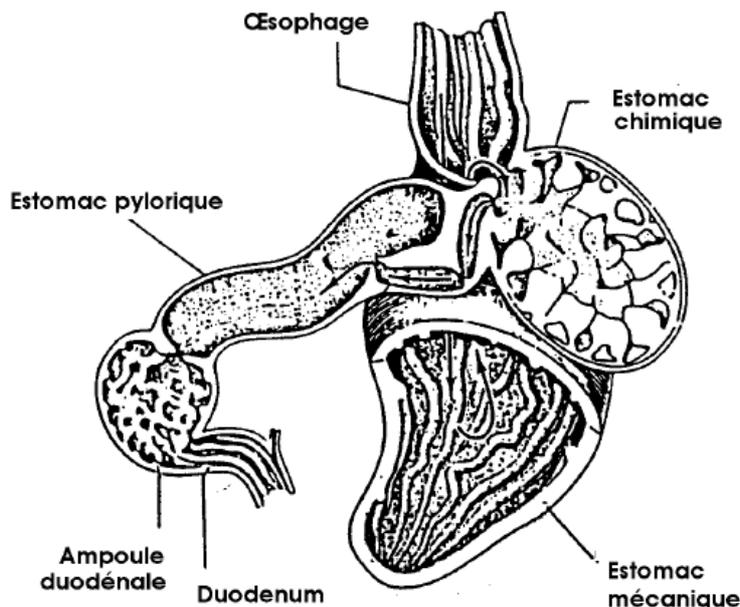
L'œsophage est très large chez les odontocètes et relativement très étroit chez les mysticètes (10 cm de diamètre pour un balénoptère de 23 m !). Sa muqueuse est plissée longitudinalement (Bourdelle et Grassé, 1984).

1.1.1.2.3.4 Estomac

L'estomac est toujours pluriloculaire, en relation avec la non-mastication des proies. On observe donc la coexistence du régime carnivore et du statut de polygastrique chez le

dauphin. L'estomac comporte typiquement trois poches (figure 2). L'œsophage débouche à l'extrémité antérieure d'un sac piriforme, à épaisse paroi musculaire, appelé estomac mécanique, estomac antérieur ou estomac oesophagien. Les plis longitudinaux de la muqueuse oesophagienne sont remplacés par un système de plis plus ou moins réticulés d'aspect blanchâtre. La paroi ne comporte aucune formation glandulaire. Cette première poche stomacale sert à broyer les aliments. Les parties ingérées les plus dures participent sans doute aussi à cette action mécanique. Par ailleurs, du fait de la température qui y règne, une autolyse rapide y a également lieu. Les aliments grossièrement broyés passent ensuite dans une deuxième poche, l'estomac principal ou chimique. La paroi de ce dernier est plus mince, par suite d'une réduction importante de la musculature. En revanche, la muqueuse, de couleur rougeâtre, a la même épaisseur. Les plis qu'elle forme s'orientent différemment selon les espèces et ils sont recouverts d'un abondant mucus. L'estomac principal est le siège de la digestion chimique, grâce à la sécrétion des sucs digestifs. Les aliments terminent enfin dans l'estomac pylorique, replié en U. Sa muqueuse, lisse et brillante, possède des glandes pyloriques typiques. Ses sécrétions servent à lubrifier les aliments (mucus). Un puissant sphincter le sépare de l'ampoule duodénale (Bourdelle et Grassé, 1984 ; Robineau, 2005).

Figure 2. Les différentes cavités stomacales du dauphin (*Stenella sp.*) (Macé, 2003)



1.1.1.2.3.5 Intestin et glandes annexes

Le duodénum se dilate dans sa portion proximale en une ampoule duodénale bien distincte dont la muqueuse, lisse, ne présente ni valvules, ni villosités (figure 2).

L'intestin présente une grande uniformité dans ses différentes parties. Chez la plupart des odontocètes, on ne distingue ni caecum, ni côlon différenciés de l'intestin grêle. Le jéjuno-iléon est long, voire très long (5 à 6 fois la longueur du corps chez les mysticètes, et jusqu'à 15 fois chez le *Tursiops*).

La muqueuse intestinale est en général assez fortement plissée. Dans l'intestin grêle, on trouve le plus souvent, sur toute sa longueur, des plis longitudinaux très saillants, alors que les plis transversaux sont peu marqués. L'intestin des cétacés contient des glandes de Lieberkühn nombreuses, serrées, des glandes de Brunner plus rares et des follicules clos, isolés (cachalot) ou associés en plaques de Peyer.

Le foie, en général assez petit, se compose de deux lobes (gauche et droit) partiellement subdivisés ; son appareil excréteur est dépourvu de vésicule biliaire. Le pancréas se présente comme une glande allongée à lobules peu soudés et plus ou moins dissociés (Bourdelle et Grassé, 1984 ; Robineau, 2005).

1.1.1.2.4 Appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est adapté à la fois à la respiration aérienne et à la vie aquatique.

1.1.1.2.4.1 L'évent

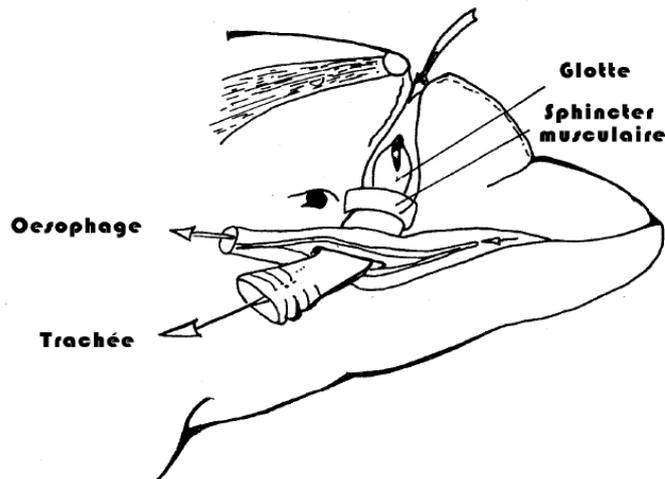
La respiration aérienne se fait, non par des narines situées à l'extrémité du museau, mais par un long conduit appelé évent, qui s'ouvre au sommet du crâne sur le plan médian, entre les deux yeux, par un orifice commun (odontocètes) ou par deux orifices distincts plus ou moins étroitement associés (mysticètes), dont l'ouverture est contrôlée musculairement. L'air passe exclusivement par les voies nasales qui ont perdu tout rôle olfactif et servent exclusivement à la respiration. Les dauphins contrôlent totalement leur respiration, ce qui leur permet de mieux maîtriser leurs plongées.

L'évent, par sa position apicale, est le premier à émerger lorsque le cétacé vient en surface, alors que les yeux demeurent sous l'eau. La disposition de l'évent permet ainsi à ces animaux de respirer sans sortir de l'eau et sans ralentir leur course pour changer la position normalement horizontale de leur corps, ce qui les distingue des pinnipèdes, qui ont conservé leurs narines en avant de la tête et sont contraints de sortir le museau hors de l'eau (Bourdelle et Grassé, 1984 ; Macé, 2003 ; Robineau, 2005).

1.1.1.2.4.2 Larynx

Si les dauphins peuvent manger sous l'eau sans risquer « d'avaler de travers » ou de se noyer, c'est que la trachée ne s'interrompt pas au niveau de l'œsophage mais le traverse de part en part grâce au prolongement de la trachée par un tube cartilagineux qui traverse l'œsophage et se termine plus haut, dans le canal de l'évent, par un larynx en "bec de canard". En effet, les cartilages arythénoïdes en haut, l'épiglotte en bas, s'allongent considérablement, formant une sorte de bec tubulaire à l'extrémité renflée qui fait saillie dans la partie inférieure du conduit nasal. Un puissant muscle annulaire (sphincter palato-pharyngien) le maintient en place. On obtient ainsi une séparation permanente entre le conduit respiratoire et le conduit digestif (figure 3) (Bourdelle et Grassé, 1984 ; Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

Figure 3. Cloisonnement des voies respiratoires et digestives chez le dauphin (Macé, 2003)



L'expiration lors de l'arrivée en surface est brusque et s'accompagne d'un bruit strident, en même temps qu'un panache de buée s'élève de l'évent, c'est le souffle. Ce souffle n'est pas un jet d'eau, comme on le croit encore trop généralement, mais un jet de vapeur humide et chaude, provenant du poumon, et visible seulement par condensation de la vapeur d'eau, comme l'haleine de tous les mammifères, lorsque la température est basse. L'eau que ces animaux avalent en mangeant est rejetée par la commissure postérieure de la bouche.

1.1.1.2.4.3 Trachée

La trachée est très courte en raison de l'absence de cou. Les cartilages de la trachée se continuent jusque dans les ramifications bronchiques les plus intimes du poumon, de manière à résister à la pression du liquide ambiant sur les parois thoraciques. Les bronches sont au nombre de trois, deux principales et une azygos, située à l'avant et à droite (Macé, 2003; Robineau, 2005).

1.1.1.2.4.4 Poumons

L'amplitude respiratoire a été augmentée grâce à des poumons allongés et particulièrement élastiques qui reposent sur un diaphragme plus long et placé de manière plus oblique que chez les autres mammifères. Ils sont situés plus dorsalement et ne présentent pas de lobation.

La cage thoracique est souple et mobile, car les premières paires de côtes ne sont pas rattachées au sternum. Les poumons sont de la sorte mieux employés : tandis que les humains n'utilisent que 10 à 15 % de leur capacité pulmonaire maximale lors d'une respiration normale, les dauphins renouvellent 80 à 90 % du volume maximal de leurs poumons à chaque inspiration. Le rythme respiratoire est lent et irrégulier. On compte en moyenne 1 à 3 inspirations par minute (Macé, 2003 ; Robineau, 2005).

1.1.1.2.5 Appareil circulatoire

1.1.1.2.5.1 Le cœur

Le cœur apparaît aussi large que long chez la plupart des odontocètes et un peu plus large que long chez les mysticètes et le cachalot ; ses dimensions sont en rapport avec la taille de l'animal. Son poids relatif par rapport à celui du corps est en moyenne de 0,6 % chez les dauphins. Les cavités du cœur droit l'emportent en volume sur celles du cœur gauche. Les troncs artériels aortique et pulmonaire restent assez longtemps associés par un canal artériel perméable qui se rencontre souvent chez les jeunes (Robineau, 2005).

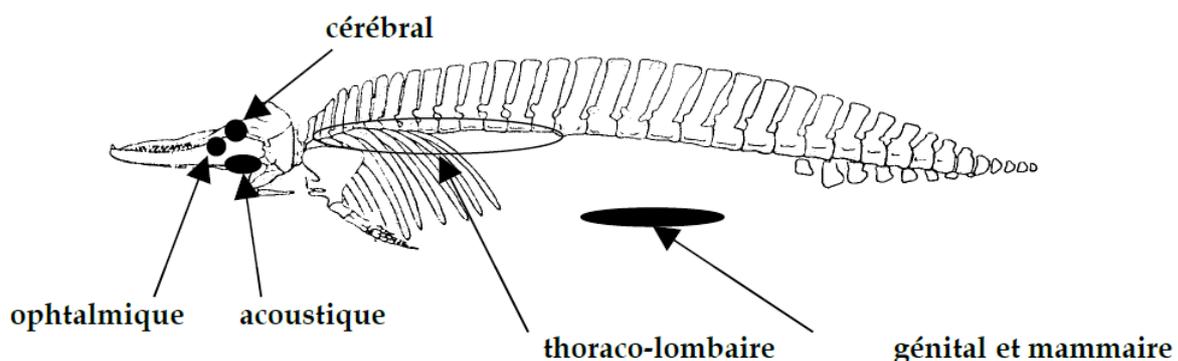
1.1.1.2.5.2 Le système vasculaire

Le système vasculaire des cétacés présente un certain nombre de caractères qu'on ne retrouve que chez les mammifères aquatiques. L'un des traits marquants réside dans la présence de *retia mirabilia*, réseaux capillaires disséminés dans des endroits stratégiques soumis à de fortes pressions (figure 4). De tels réseaux admirables existent chez les mammifères plongeurs, tels les pinnipèdes, mais c'est chez les cétacés qu'ils sont les plus étendus. Ils sont intercalés dans l'ensemble des artères irrigant les organes essentiels comme le cerveau. Le réseau admirable thoracique existe chez tous les cétacés de part et d'autre de la face ventrale de la colonne vertébrale ; c'est le réseau artériel le plus important. Il est intriqué avec le réseau veineux thoracique, les deux étant inclus dans une masse de tissu adipeux, et s'étend jusque dans le canal médullaire. Il s'y unit avec les artères méningées qui irriguent exclusivement le cerveau (Macé, 2003 ; Robineau, 2005).

Le fonctionnement des *retia mirabilia* est très simple : lors de la plongée, le sphincter situé en aval obture le capillaire et gonfle ainsi le réseau, stockant le sang et augmentant la pression périphérique. Lors de la remontée en revanche, ce sphincter s'ouvre et celui situé en amont se ferme légèrement, le tout concourant à la libération de la masse sanguine.

Le rôle de ces réseaux est double : équilibrage des pressions et stockage de dioxygène. Il semble que ces réseaux capturent également les bulles d'azote qui se forment lorsque le dauphin plonge en eaux profondes et qui risqueraient de provoquer une embolie gazeuse.

Figure 4. Localisation des *retia mirabilia* chez le dauphin (Macé, 2003)



Il faut remarquer aussi que les cétacés ont intensifié la circulation sélective par rapport aux autres vertébrés. Lors de la plongée, par le jeu de sphincters capillaires situés dans tous les organes, le cerveau, le cœur et les muscles sont préférentiellement irrigués, permettant ainsi une économie d'énergie importante. Les autres organes, pendant ce temps, fonctionneront en anaérobiose. Par ailleurs, la rate est relativement petite, contrairement aux pinnipèdes où son rôle de réserve sanguine est primordial.

Par ailleurs, le réseau vasculaire au niveau de la peau est bien particulier : il est constitué d'un réseau à contre-courant présentant des « shunts », communications artérioveineuses permettant une régulation à volonté des échanges thermiques avec le milieu. Ce dispositif est particulièrement bien développé dans les nageoires pectorales et caudales. Les veines sont organisées en réseau péri-artériel. Le fonctionnement en est très simple : si l'animal a besoin d'épargner de la chaleur (plongée, par exemple), la circulation se fait dans ces réseaux, le réseau superficiel étant obturé par des sphincters. Le contre-courant permet le transfert de chaleur des artères aux veines par proximité. Au contraire, en cas de nécessité de libération de chaleur (effort physique par exemple), la circulation s'effectuera de préférence par la voie superficielle (Macé, 2003 ; Robineau, 2005).

1.1.1.2.6 Appareil génital

1.1.1.2.6.1 Appareil génital mâle

Chez le mâle, les testicules restent en position abdominale dans un état permanent d'énorchidie, suspendus en arrière des reins par un large *mesorchium*. De forme ovoïde, très allongée, ces organes subissent un accroissement considérable de leur volume lors de l'acquisition de la maturité sexuelle. Ils peuvent peser jusqu'à plusieurs kilos chez un adulte reproducteur. Selon les espèces, des périodes de repos dans la spermatogenèse ramènent les testicules à des dimensions réduites. L'épididyme suit l'attache du *mesorchium* ; on peut y reconnaître une tête, un corps et une queue, de laquelle émerge progressivement le conduit déférent, très contourné. La prostate, volumineuse, entoure, à la base du pénis, le conduit urogénital. C'est vraisemblablement la seule glande annexe que possèdent les cétacés. Le pénis prend origine par deux piliers (*crura penis*) s'attachant sur les os pelviens. Ces piliers fusionnent pour donner un long corps caverneux de section circulaire ou ovale, qui, lors de l'érection, fait saillie par la fente pénienne. Le pénis au repos reste caché, replié dans une loge localisée dans l'épaisseur de la paroi abdominale. Il sort de la fente génitale grâce à l'afflux sanguin dans le corps caverneux lors de l'érection (Robineau, 2005).

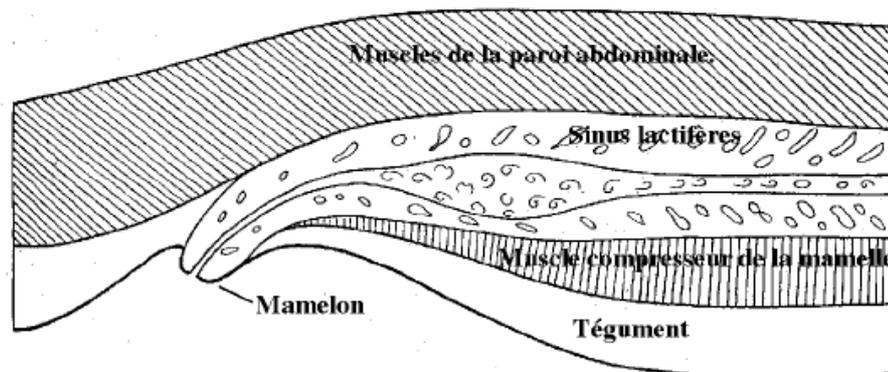
1.1.1.2.6.2 Appareil génital femelle

Les deux ovaires sont situés près des reins, suspendus par un *mesovarium* qui se prolonge ensuite en méso utérin. Leur forme est sphérique et régulière chez les odontocètes, alors qu'ils sont allongés et en forme de grappe chez les mysticètes. Leur taille augmente considérablement lors de la maturité sexuelle. On peut noter une particularité concernant le corps jaune : en cas de non fécondation, celui-ci dégénère et se transforme en corps blanc, qui subsiste chez les cétacés, en demeurant fixé à l'ovaire sous forme d'une excroissance. Ceci permet de connaître précisément le nombre d'ovulations. D'autre part, l'utérus est bicorne, mais à cornes inégalement développées en raison de la gestation généralement unipare des cétacés. C'est le plus souvent la corne gauche qui est gravide et qui est, même en dehors de la

gestation, plus grande que la corne droite, laquelle apparaît petite et comme greffée sur la corne gauche. Le col utérin, relativement long, à paroi fibro-musculaire et à lumière étroite, se projette à l'intérieur du vagin. Ce dernier présente d'abord des replis circulaires, qui constituent une série d'entonnoirs successifs dirigés vers la portion intra-vaginale du col, puis des replis longitudinaux. Il s'ouvre par une fente longitudinale, la vulve, munie de deux paires de lèvres, placée juste en avant de l'anus.

L'appareil mammaire des cétacés est constitué par deux mamelles lobulées qui s'allongent de chaque côté de la ligne médiane inférieure du corps. Leur épaisseur s'accroît considérablement chez la femelle allaitante, si bien qu'elles peuvent déterminer un léger bombement visible extérieurement. Le canal central galactophore de chaque glande mammaire reçoit les canaux galactophores secondaires et, près des tétines, se dilate en un réservoir ou sinus à paroi épaisse où se collecte le lait. Chaque mamelle est revêtue d'un muscle compresseur (figure 5). En se contractant, ce muscle chasse violemment le lait du sinus dans le canal de la tétine en un jet à très forte pression que le jeune reçoit dans la bouche. De par l'absence de lèvres molles permettant la succion, le jeune ne peut téter à la manière des mammifères terrestres. De la sorte, la durée de la tétée est raccourcie ; le jeune en peu de temps absorbe une grande quantité de lait (Bourdelle et Grassé, 1984 ; Macé, 2003 ; Robineau, 2005).

Figure 5. Coupe parasagittale schématique de mamelle de Cétacé (Macé, 2003)



1.1.1.2.7 Appareil urinaire

Les reins ne sont pas en forme de haricot, mais sont plus ou moins allongés et présentent une face dorsale presque plane, appliquée contre la paroi dorsale de la cavité abdominale et une face ventrale bombée. Ils présentent une apparence simple, à surface lisse, mais une fois décapsulés, ils se montrent composés de très nombreux petits reins (rénicules) étroitement accolés et bien distincts. Les canalicules excréteurs des différents rénicules se déversent dans un canal axial, d'où l'uretère se détache médialement, près du pôle postérieur de chaque rein. Les deux uretères décrivent une légère courbe avant d'aboutir, en bas et en arrière, à la vessie, de forme allongée. La structure fine du rein montre une majorité de néphrons courts réabsorbant moins l'eau et les sels minéraux que les autres mammifères, contribuant ainsi à l'équilibre hydrominéral perturbé par le milieu marin, liquide et hypertonique (Macé, 2003 ; Robineau, 2005).

1.1.1.2.8 Système nerveux et organes des sens

1.1.1.2.8.1 L'encéphale

La caractéristique principale de l'encéphale réside dans son poids relativement considérable (rapporté à la taille de l'animal, le poids du cerveau des dauphins les plus fortement encéphalisés, se situe entre celui de l'homme et celui des singes anthropomorphes), sa brièveté, sa largeur (il apparaît comprimé d'avant en arrière), sa forme générale arrondie, le plissement très accentué des hémisphères cérébraux, l'état rudimentaire ou l'absence du lobe olfactif. La place qu'occupent les centres acoustiques est considérable (Robineau, 2005).

1.1.1.2.8.2 Les organes des sens

Les organes des sens des dauphins sont inégalement développés, certains l'étant à l'extrême, d'autres ayant pratiquement disparu.

1.1.1.2.8.2.1 Le toucher

Le sens du toucher est mis à contribution de façon permanente. Il permet aux dauphins d'enregistrer avec la plus grande finesse les variations de l'eau sur leur corps et de donner à leur peau la forme idéale correspondant au déplacement. La peau est abondamment pourvue de terminaisons nerveuses. Les zones hautement sensibles se situent autour des yeux, de l'évent, du rostre, de la mâchoire inférieure et du melon. Chez certaines espèces, de petits poils sur le rostre et/ou le menton aideraient à collecter des informations sur leur environnement proche. Cela peut expliquer pourquoi les dauphins fluviaux (vivant dans des cours d'eau) évoluant dans des milieux turbulents et obscurs portent des moustaches sur leur long rostre sensitif. Cette sensibilité n'est pas étrangère au comportement des cétacés tout au long de leur vie, tant sur le plan des rapports mère-petit que dans les jeux incessants auxquels ils s'adonnent. Les dauphins, tout particulièrement, ont une prédilection pour les caresses, et pas seulement à des fins de procréation (Soury, 1996).

1.1.1.2.8.2.2 L'odorat et le goût

Chassant leurs proies dans l'eau, l'odorat est quasiment absent, les nerfs étant atrophiés et les fosses nasales transformées en simple tube propulseur de l'air. Il en va autrement du goût, car, s'ils ont perdu leurs cellules olfactives, ils possèdent toujours sur la langue des papilles gustatives reliées au cerveau. Dans la nature, ils ne consomment pas n'importe quelle proie. Certaines espèces sont très sélectives, même si d'autres sont éclectiques et passent volontiers d'un menu à l'autre (grand dauphin) (Soury, 1996).

1.1.1.2.8.2.3 La vue

Le sens de la vision est extrêmement bien développé et permet au dauphin de voir aussi bien dans l'eau que dans l'air. Les cétacés sont pourvus de muscles oculaires suffisamment puissants pour adapter la forme du cristallin au milieu ambiant, déjouant ainsi les déformations dues à la réfraction. (L'indice de réfraction de l'eau, plus élevé que celui de l'air, provoque un décalage de l'image, qui ne se forme plus sur la rétine, mais en arrière de celle-ci.) Les glandes de Harder sécrètent en permanence un épais mucus transparent pour protéger les yeux de l'agression des sels contenus dans l'eau de mer. En revanche, les

dauphins ne possèdent pas de glandes lacrymales. Les paupières ont un rôle de diaphragme : elles se ferment lorsque la lumière croît en intensité et restent closes durant le sommeil. Les espèces possédant un melon important ont leurs yeux situés de part et d'autre de la tête, ce qui leur donne une vision monoculaire. L'angle mort situé en avant de la tête les contraint à se mettre de profil et ils ne peuvent voir en relief. Pour beaucoup d'espèces, la perception visuelle se réduirait à un défilement d'images plates si elles n'avaient pas la possibilité de balayer leur sujet d'impulsions sonar et ainsi reconstituer dans leur cerveau les images en trois dimensions. Cependant, la vue ne doit être sous-estimée. Le fait que de nombreux dauphins arborent une pigmentation avec des marques distinctives n'est pas seulement à considérer comme du camouflage vis à vis de proies ou de prédateurs, mais aussi comme mode de reconnaissance des individus à l'intérieur d'une même espèce (Bourdelle et Grassé, 1984 ; Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

1.1.1.2.8.2.4 L'ouïe

Le sens développé et perfectionné à l'extrême est le sens de l'ouïe, les cétacés vivant dans un milieu où règne un bruit de fond en permanence et où les sons se déplacent 5 fois plus vite que dans l'air. Les dauphins n'ayant plus d'oreille externe, la collecte des sons est assurée par les os du crâne. Les os crâniens, larges surfaces sur les côtés de la tête captent les sons et les conduisent particulièrement bien vers l'oreille interne (cochlée). Celle-ci se termine en énorme nerf auditif qui aboutit à des lobes auditifs eux aussi hypertrophiés. Le centre de l'audition est donc très étendu dans le cerveau, permettant une exploitation maximale des sons reçus. De plus, expérimentalement, des chercheurs ont bouché les oreilles d'un dauphin et se sont aperçus qu'il continuait à entendre. Il existe donc un autre mode de réception. La structure de la mâchoire inférieure en fait un récepteur-transmetteur idéal des ondes sonores. Celles-ci se propagent au travers d'un fin tissu adipeux garnissant la mâchoire jusqu'à une membrane qui, à son tour les transmet à l'oreille interne. Cette dernière relaie (*via* le nerf auditif) les ondes jusqu'au cerveau qui les traite et les traduit en " images sonores ", c'est l'écholocation (ou écho-détection) (Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

1.1.1.2.8.2.5 L'écholocation

Les cétacés vivent dans un milieu où le sens de la vision seul ne permet pas de mener une vie de « super-prédateur ». En effet, l'eau absorbe les radiations solaires, d'abord sélectivement, puis totalement. Passé une certaine profondeur, il est impossible de se repérer à l'aide de ses seuls yeux. Parallèlement à la perception tympanique, les dauphins ont développé une sorte de « sixième sens », infiniment mieux adapté à la vie aquatique et extrêmement perfectionné: le sens de l'écholocation ou SONAR (de l'anglais SOund NAVigation and Ranging : « navigation et évaluation de la distance par le son »). Cette faculté sensorielle permet en quelque sorte de " voir avec les oreilles ". Le principe en lui-même est simple : émettre un signal directionnel qui va rebondir sur une cible située à distance et qui revient à son point de départ. Puis capter le signal de retour et l'analyser. Mais dans la réalité, le mécanisme s'avère beaucoup plus complexe : les dauphins produisent les sons grâce à trois paires de sacs aériens, de formes et de dimensions différentes, annexés à la base de leur évent et dont ils contrôlent musculairement le débit (figure 6). C'est le passage de l'air d'un sac à l'autre qui crée les sons. Il se peut que le larynx (ils ne possèdent pas de cordes vocales), capable de vibrer, soit également mis à contribution lorsque l'air en provenance des poumons franchit le bec de canard. Ces sons servent à l'écholocation d'une part (cliquetis provoqués par le sinus aérien gauche), et à la communication d'autre part (sifflements par le sinus droit).

Après émission, les clics d'écholocation passent à travers le melon (masse de tissu gras, en avant de l'évent, délimitée par une forte paroi musculaire qui dépend en partie de la musculature de l'évent) où ils sont amplifiés et focalisés en faisceaux par l'amas huileux qui compose le melon, pour ensuite se propager dans l'eau jusqu'à la cible (un poisson, un homme, un congénère, etc.). Les clics sont ensuite renvoyés en "écho" et sont captés par la mâchoire inférieure, selon le principe expliqué plus haut (figure 7). Le cerveau, en analysant les caractéristiques de l'écho, se compose une image précise de l'environnement et de la cible. Ce système aurait une portée maximale estimée à 800 mètres.

La bande de fréquence de l'oreille humaine va de 20 à 20 000 Hertz. Les cétacés entendent non seulement les mêmes fréquences que nous mais également un immense spectre d'ultrasons, variant selon les espèces, et allant jusqu'à 200 000 Hz ! Un signal n'est émis que lorsque le précédent est reçu. Lors de la chasse en groupe, il n'y a pas de problème d'interférence car chaque animal possède un registre propre, issu du processus de socialisation. Lorsqu'un dauphin explore son environnement, il diffuse d'abord de larges faisceaux de sons de basse fréquence, d'une portée de plusieurs centaines de mètres. Les informations reçues sont assez grossières et l'informent de ce qui l'entoure, la profondeur, l'aspect général du fond marin, ou des masses importantes (bateau, animal, etc.). Dès qu'il a détecté quelque chose qui suscite son intérêt, il se rapproche de la cible tout en émettant des faisceaux étroits de haute fréquence (dont la portée est plus faible) afin d'en tirer le maximum de précision. Il remue la tête en tous sens et procède à un balayage complet de la cible, ce qui lui donne accès à des détails de forme. Lorsqu'il parvient à proximité de la cible, ce que ses yeux voient a déjà été enregistré par son cerveau sous forme d'images sonores. Finalement, le dauphin explore sa cible « à bout portant » d'un étroit faisceau de clics à très haute fréquence, lui permettant d'obtenir les moindres détails de structure, y compris la matière. L'écholocation est une échographie en plus précis. Le dauphin peut ainsi sonder le corps de son vis-à-vis, comme par exemple "regarder" battre le cœur... ! Il pourrait ainsi évaluer le degré d'émotion de son partenaire et anticiper ses réactions (Soury, 1996 ; Poncelet, 1999 ; Macé, 2003 ; Water Planet USA, 2010).

Figure 6. Disposition des sacs aériens chez le dauphin (Poncelet, 1999)

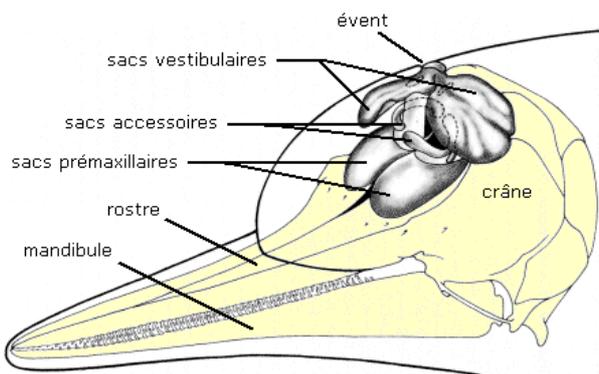
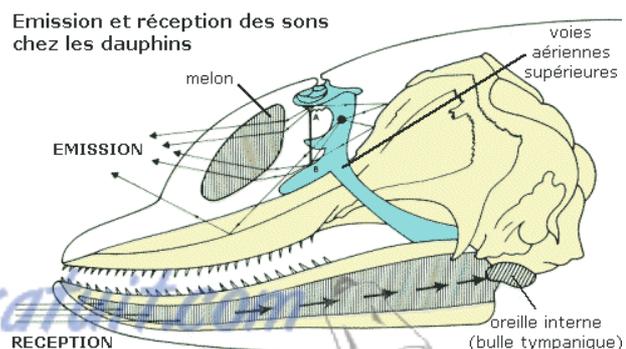


Figure 7. Émission et réception des sons chez le dauphin (Poncelet, 1999)



1.1.2 Biologie, écologie et rapports avec l'Homme

1.1.2.1 *Habitat et répartition*

Le principal facteur physique affectant la répartition des cétacés semble être la température des eaux superficielles, mais la bathymétrie doit aussi être prise en considération. La plupart des espèces évitent les eaux très froides ou chaudes, ou bien n'y séjournent qu'une partie de l'année. Par ailleurs, un grand nombre d'espèces fréquentent préférentiellement les eaux océaniques situées au-delà du plateau continental et ne se rencontrent habituellement à proximité des côtes que lorsqu'elles sont bordées d'eaux profondes. Un autre facteur de grande influence est la productivité des océans. Les seules régions fertiles sont celles où les substances nutritives remontent en surface avec les eaux profondes, c'est-à-dire le long des côtes, au niveau des hauts fonds ou des archipels et lorsque les courants froids profonds s'affrontent et s'élèvent pour former des fronts (Robineau, 2005).

1.1.2.2 *Reproduction et croissance*

Deux grands schémas définissent la reproduction des odontocètes : polygamie et promiscuité. Les espèces polygames (cachalots, globicéphales, etc.) se distinguent souvent par un dimorphisme sexuel important et une structure sociale élaborée. Un tel scénario implique souvent de violents combats entre mâles. Au contraire, la promiscuité, attitude sexuelle la plus répandue chez les odontocètes, consiste pour les mâles à féconder plusieurs femelles et pour les femelles à recevoir la semence de plusieurs mâles. Cette stratégie de reproduction propre aux grands troupeaux est un moyen efficace pour perpétuer l'espèce.

Après un certain nombre d'années (de 3 ans chez le dauphin commun à 16 ans chez l'orque), les femelles d'abord, puis les mâles, atteignent leur maturité sexuelle. Mature dès sa première ovulation, la femelle a cependant peu de chances, dans une structure sociale cohérente, de procréer immédiatement. Donner naissance à un petit, le nourrir, l'assister et en faire un adulte autonome, apte à perpétuer l'espèce, requiert de l'expérience, qu'elle pourra acquérir en assistant d'autres femelles dans leur procréation.

Les cétacés ne donnent naissance qu'à un seul petit à la fois. Selon les espèces, la gestation dure de 10 à 16 mois. Dans la plupart des cas, la future mère recherche la compagnie d'une ou plusieurs assistantes, qui l'assisteront au moment de la mise-bas et souvent contribueront à la protection du petit jusqu'à sa complète autonomie. L'expulsion a lieu en quelques minutes. Le petit apparaît la plupart du temps par la caudale, mais même si la mise-bas se fait par la tête, sa vie n'est pas en danger, car sa respiration n'est pas un réflexe. Les nageoires pectorales et l'aileron dorsal se déplient et deviennent fonctionnels en quelques secondes. Le cordon ombilical se rompt de lui-même et le nouveau-né va prendre sa première inspiration, aidé par sa mère ou seul si l'expulsion a été rapide. La silhouette et les proportions du petit sont rigoureusement identiques à celles des adultes. En revanche, les couleurs de robe peuvent être totalement dissemblables. La taille du nouveau-né est de l'ordre du tiers de celle de sa mère chez les odontocètes et du quart chez les mysticètes. Aptitude à la nage, à la plongée, à téter sous l'eau attestent la haute maturité physiologique du cétacé nouveau-né.

L'allaitement a lieu aussitôt. Le lait très riche en corps gras (15 à 45 % selon les espèces, contre 4-5 % chez l'être humain) permet au jeune de grandir à une vitesse prodigieuse et de s'enrober d'une épaisse couche de lard pour se protéger du froid. Le petit tète d'abord une fois toutes les demi-heures, puis le rythme se stabilise autour de 7 fois par jour. Le sevrage n'est jamais brutal. La mère aide son petit à consommer progressivement de la nourriture solide, à partir de 4 à 5 mois après la naissance. Parallèlement, le nombre de tétées ainsi que la richesse du lait maternel diminuent, mais l'allaitement s'étale généralement sur 18 à 20 mois. Les individus vont grandir, apprendre à chasser, s'orienter et se défendre jusqu'au jour où ils seront à leur tour capables de transmettre la vie.

Les femelles suitées forment un sous-groupe. Les petits nagent très près de leur mère, ce qui leur permet d'atteindre des vitesses très élevées, les mêmes que leurs mères, tout en diminuant l'effort, conséquence de la loi de Bernouilli (deux corps soumis à un déplacement dans un fluide développent une force d'attraction liée à la distance et à l'accélération).

Les espèces de grande taille ont en général une espérance de vie plus longue que celles de petite taille. Selon les espèces, les dauphins ont une durée de vie comprise entre 20 et 40 ans (Soury, 1996 ; Macé, 2003 ; Robineau, 2005).

1.1.2.3 Alimentation

Les mysticètes se nourrissent essentiellement de crustacés planctoniques par filtration à travers leurs fanons. Les cétacés à dents, quant à eux, sont tous des carnivores. Les ichtyophages ou piscivores consomment du poisson, les teutophages se nourrissent de céphalopodes. Certaines espèces côtières ajoutent des crustacés, voire certains coquillages à leur ordinaire. La nourriture est souvent engloutie d'une seule bouchée. Les espèces teutophages possèdent moins de dents que les ichtyophages (le cachalot et le dauphin de Risso ne possèdent des dents que sur la mâchoire inférieure). Ces espèces capturent les céphalopodes par succion. Les ichtyophages sont armés de nombreuses dents pointues qui facilitent la capture des poissons à grande vitesse. Certaines espèces usent probablement de techniques de chasse qui font moins appel à la vitesse et au nombre de dents qu'à l'organisation. On peut citer par exemple les orques et les grands dauphins qui regroupent les bancs de poissons vers la surface avant de les assommer d'un battement de la caudale (Soury, 1996; Robineau, 2005).

1.1.2.4 Vie sociale : le groupe et la communication

La vie sociale des dauphins se caractérise par la constitution de groupes au sein desquels solidarité et entraide sont de mise : c'est en effet grâce à la force du groupe que ces mammifères peuvent vivre, se défendre et se nourrir, dans un univers où toute faiblesse est synonyme d'élimination. Cependant, rien n'est plus versatile que la notion de groupe chez les odontocètes. Il est souvent plus approprié de parler d'opportunité de groupe, tant ses dimensions évoluent selon le temps et la nécessité, qui peut être d'ordre sexuel. La structure sociale dépend en partie du mode de vie et de l'alimentation, et varie selon les espèces. Au sein d'un groupe, un individu en difficulté constitue toujours une priorité : il est secouru et

assisté jusqu'à ce qu'il retrouve son autonomie : un dauphin malade peut être soutenu à la surface de l'eau pendant des heures par ses congénères.

Les dauphins n'arrêtent pas de communiquer entre eux par des moyens diversifiés. Particulièrement friands de contacts corporels, les caresses font partie de leurs moyens d'expression favoris, et cela sans distinction de sexe. Le jeu (ou, du moins, ce que nous interprétons comme tel) fait également partie de leurs activités : sauts, nage acrobatique, surf dans les vagues ou à l'étrave des bateaux, etc. Ils s'inventent des "jouets" tels un poisson, un coquillage, une corde, des algues, une méduse, etc. Pour le jeune dauphin, l'activité ludique est une manière d'apprendre la vie : développer ses réflexes, ses sens, sa mémoire, ses connaissances, etc. L'agressivité ou la violence sont également présentes chez les dauphins, comme chez tout mammifère contraint de s'imposer par la force de temps en temps.

À côté du langage corporel, le principal moyen de communication des cétacés consiste en différentes vocalisations : sifflements, gazouillis, grincements, craquements, explosions de clics, jappements, couacs, etc. constituent le langage par excellence des dauphins. Chaque espèce possède ses propres empreintes en matière de vocalisation. Le registre est parfaitement reconnaissable d'une population à l'autre et le timbre permet de distinguer les individus. Chaque individu possède un "contour acoustique" ou signature sifflée qui permet de l'identifier avec certitude, et qui se met en place très tôt, entre 1 et 2 ans. Il semble également que des populations géographiquement éloignées soient incapables de communiquer entre elles. Il faut toutefois rester prudent quand on parle de langage : ces discours correspondent à des moments précis de la vie sociale (regroupements pour la chasse, retrouvailles, amour, péril, jeux, rencontres agressives) et n'expriment donc tout au plus que des informations élémentaires. Des nuages de bulles associés à ces sons sont très souvent observables, exprimant probablement des émotions (excitation, avertissement, etc.) et servant des fonctions particulières (bouclier, etc.) (Soury, 1996 ; Water Planet USA, 2010).

1.1.2.5 Adaptations à la vie aquatique

1.1.2.5.1 Locomotion et hydrodynamisme

Au cours de l'évolution, les ancêtres des dauphins ont subi de nombreuses modifications pour aboutir à des animaux dépourvus de poils, dont les membres antérieurs ont régressé et les membres postérieurs ont disparu. Les parties externes des organes sexuels ainsi que les mamelles se sont enfouies dans des replis cutanés de l'abdomen. Le pavillon auditif a disparu et le cou s'est effacé, la tête est donc dans le prolongement ininterrompu du corps. Par conséquent, rien ne vient freiner la « glisse » du dauphin.

Un poisson peut rester indéfiniment en immersion. Il utilise pour se mouvoir une queue prolongée d'une voile verticale qui, grâce à des mouvements alternatifs latéraux, le propulse horizontalement. Pour les dauphins, il en va tout autrement. Contraints de venir respirer régulièrement à la surface, l'essentiel de leurs déplacements ne peut s'effectuer que de bas en haut, et inversement. Ils ont donc développé une nageoire caudale horizontale épaisse à sa base, amincie et plus ou moins profondément échancrée à son bord postérieur. Celle-ci est mue par des muscles logés de part et d'autre de la colonne vertébrale. Les nageoires pectorales ne sont pas directement impliquées dans la motricité, mais jouent un rôle

essentiel dans la stabilisation et l'orientation. Chez les dauphins de rivière, qui doivent souvent évoluer dans des espaces plus restreints, elles sont sensiblement plus développées car elles participent à de fréquents changements de direction. L'aileron dorsal joue le rôle de stabilisateur. Sa forme et sa taille varient sans doute en fonction du type de nage des différentes espèces.

Par ailleurs, la peau a acquis d'étonnantes propriétés, lui permettant d'atteindre des vitesses dépassant 45 km/h. Le dauphin a le privilège d'adapter la structure interne de sa peau de manière à ne pas avoir de résistance due aux turbulences causées par le déplacement de son corps dans l'eau, à une certaine vitesse. Les microplis de l'épiderme neutralisent ces turbulences. Les cellules de l'épiderme des cétacés exsudent également des gouttelettes d'huile qui jouent un rôle de lubrifiant. Ces cellules se renouvellent plusieurs fois par jour. De plus, tirant profit de leur besoin de respirer, les dauphins sautent en surface en se déplaçant, où la résistance de l'air est moindre (l'air est 800 fois moins dense que l'eau). Ils adaptent leur vitesse, leur direction et leur position par rapport aux courants et n'hésitent pas à profiter de la poussée d'étrave d'un bateau (Soury, 1996).

1.1.2.5.2 La plongée

Les cétacés ont adapté leur métabolisme afin de pouvoir effectuer de grandes plongées. Les globicéphales peuvent atteindre des profondeurs de 500 m, mais le record est détenu par le grand cachalot qui peut plonger jusqu'à 3000 m de profondeur au cours d'apnées durant jusqu'à 90 minutes ! Durant les plongées, les cétacés consomment très peu de dioxygène. Par ailleurs, ils peuvent réduire considérablement leur rythme cardiaque pendant l'immersion. De plus, les cétacés renouvellent 80 à 90 % du volume maximal de leurs poumons à chaque inspiration (contre 10-15 % pour l'Homme). La circulation sanguine est contrôlée et redistribuée vers les organes essentiels : leurs artères n'irriguent plus que les organes « nobles » (cœur et cerveau) ; leurs muscles et leurs organes digestifs fonctionnent sur leurs réserves. Enfin, les cétacés possèdent une myoglobine plus performante que celle des humains. Elle « pompe » tout le dioxygène du sang vers les muscles avant chaque plongée. Par ailleurs, les réseaux admirables pourraient servir à ralentir le retour du sang vers le cœur pendant une apnée (Soury, 1996).

1.1.2.5.3 La thermorégulation

La température interne des dauphins est en moyenne de 36° C. Dépourvus de système pileux, ils doivent affronter des températures extrêmement basses dans un milieu où la conductivité est 27 fois plus importante que dans l'air. Plusieurs moyens permettent aux dauphins de réguler leur température :

- un métabolisme élevé, permis par une meilleure utilisation de la respiration (renouvellement de 80-90 % de l'air à chaque inspiration), un volume sanguin plus important (15 % du poids de leur corps, contre 7 % chez les humains) et un taux d'hémoglobine plus élevé ;
- un corps fusiforme, au rapport surface/volume nettement plus faible que chez les mammifères terrestres ;

- un rythme respiratoire lent, qui limite l'expiration d'air réchauffé par l'organisme, d'où une importante économie d'énergie ;
- une épaisse couche graisseuse, réchauffée par les artères qui la parcourent ;
- un système de régulation vasculaire organisé de façon à ce que les artères qui alimentent en dioxygène les parties du corps peu isolées telles les nageoires soient entourées d'un réseau veineux très dense qui provoque un échange thermique : les artères se refroidissent légèrement pour ne pas apporter une chaleur inutilement élevée, et au retour, le sang veineux se réchauffe et sollicite d'autant moins le métabolisme (Soury, 1996).

1.1.2.6 *Exploitation et conservation*

Après la seconde guerre mondiale, en 1946, la France a signé la Convention de Washington et a adhéré à la Commission Baleinière Internationale (CBI). Actuellement, il paraît clair que la chasse baleinière commerciale ne constituera plus, dans l'avenir, une menace pour la conservation des populations des grands cétacés. L'adoption, par la CBI, de procédures de gestion des stocks très conservacionistes et le contrôle international très strict de la chasse permettent tout au moins de le croire. Par ailleurs, il apparaît peu vraisemblable que les nations non baleinières (dont la France) constituant actuellement la majorité de la CBI, reprennent un jour la chasse, qui restera sans doute l'apanage d'un petit nombre de pays (Japon, Norvège, Islande). Les menaces les plus lourdes pesant sur les petits cétacés dans le monde entier sont cependant les captures accidentelles dans les engins de pêche, tant dans la zone côtière qu'au large, et les effets de la pollution et du trafic maritime dans la zone côtière, en particulier celle des pays industrialisés (Robineau, 2005).

1.1.3 Monographies

Dans cette partie, ne seront développées que les espèces qui se retrouvent fréquemment le long des côtes françaises et roumaines. Ces espèces appartiennent à la famille des delphinidés et à celle des phocoenidés.

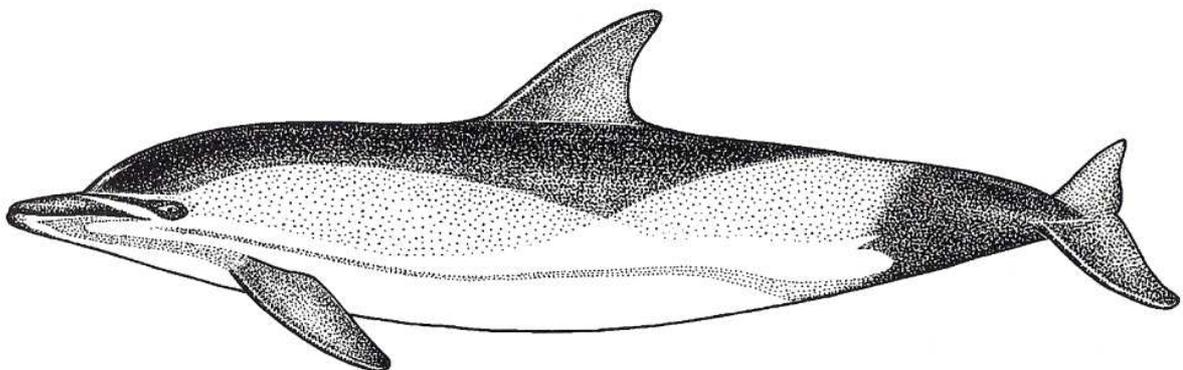
1.1.3.1 *Les delphinidés*

Les delphinidés (*Delphinidae* Gray, 1821), ou dauphins vrais, sont des odontocètes dont la denture comporte un nombre de petites dents coniques élevé ou très élevé. La taille des delphinidés varie de 1,50 m à 4 ou 5 m et peut même atteindre 8 à 9 m chez l'orque. Le corps est plus ou moins fusiforme, sans trace de cou. La tête est tantôt prolongée par un « bec » très net, avec une région crânienne aplatie ou renflée, tantôt courte, de forme conique, formant un museau plus ou moins obtus. Ils présentent la plupart du temps une nageoire dorsale falciforme. Ces odontocètes vivent en troupes nombreuses, très mobiles, que l'on rencontre dans toutes les mers, mais dont certaines espèces sont cependant localisées (Robineau, 2005).

1.1.3.1.1 Le dauphin commun (*Delphinus delphis* Linné, 1758)

Du latin *delphinus*, « dauphin » et du grec *delphis*, « dauphin, esprit de la mer ». C'est l'espèce communément décrite par les anciens et qui apparaît dans les légendes antiques et la mythologie (figure 8) (Ridgway et Harrison, 1994 ; Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

Figure 8. *Delphinus delphis* (Robineau, 2005)



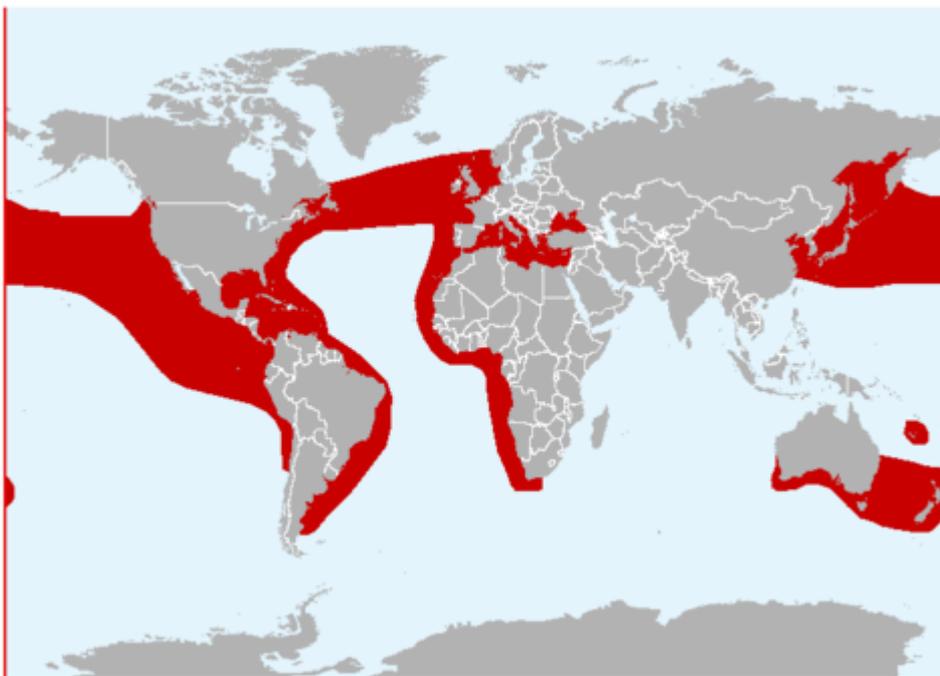
1.1.3.1.1.1 Description

D'une taille de 70 à 90 cm à la naissance, l'adulte atteint 2,50 m pour les mâles et 2,30 m pour les femelles. Le poids moyen se situe entre 70 et 100 kg. La durée de vie se situe entre 25 et 30 ans. Le dauphin commun fait partie des cétacés les plus rapides (sa silhouette élancée est propice à la vitesse). Le bec long et fin est bien démarqué du melon par le sillon frontal. Chacune des mâchoires comporte de 80 à 120 petites dents coniques. Les nageoires pectorales, effilées en leur extrémité, ont une fixation large, un bord d'attaque arrondi et un bord de fuite droit. La nageoire dorsale, de taille moyenne et située à mi-corps, est nettement falciforme. La caudale, en forme d'accolade, est marquée d'une encoche médiane. La coloration est complexe et varie selon les populations. Le dos et les nageoires pectorales sont sombres, le ventre et les flancs antérieurs sont presque blancs, tandis que les flancs postérieurs sont d'un gris moyen. Le tout forme un X aplati, plus ou moins marqué selon les individus, comparable à un sablier (Ridgway et Harrison, 1994 ; Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

1.1.3.1.1.2 Habitat et populations

Le dauphin commun vit dans toutes les eaux tropicales et tempérées de la planète (figure 9). Tantôt côtier, tantôt hauturier, il est opportuniste et se déplace parfois sur des distances considérables pour suivre ses proies. Il a cependant tendance à être plus côtier que le dauphin bleu et blanc : il fréquente des fonds moins importants et donc des secteurs plus proches du littoral. Cela est lié à son régime alimentaire plus orienté vers les petits poissons, qui se reproduisent en général au dessus du plateau continental. La population mondiale est estimée à plusieurs millions d'individus mais sa survie à long terme pourrait être compromise si des mesures efficaces ne sont pas prises contre la pollution des océans. C'est également une espèce fréquemment capturée dans les sennes tournantes et les filets maillants dérivants, en raison notamment de son association avec les grands poissons migrateurs, comme par exemple les thonidés. En Atlantique, l'espèce est considérée comme occasionnelle en mer du Nord, peu fréquente en Manche et à l'ouest de la partie sud des îles Britanniques, commune de la pointe de la Bretagne à la côte du Maroc. En Méditerranée, l'espèce n'est fréquente qu'entre Gibraltar et l'ouest des Baléares. L'espèce est retrouvée fréquemment en mer Noire (Ridgway et Harrison, 1994 ; Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

Figure 9. Répartition mondiale du dauphin commun (Society for Marine Mammalogy, 2012)



1.1.3.1.1.3 Reproduction et croissance

La maturité sexuelle intervient entre 5 et 7 ans, cependant celle-ci précède de plusieurs années la première reproduction. La gestation dure de 10 à 11 mois. Dans l'Atlantique du nord-est, la majorité des naissances se produisent entre mai et août avec un maximum en juin. Les femelles donnent naissance à un dauphineau qui mesure de 70 à 90 cm, qu'elles allaitent durant plus d'un an. Les jeunes commencent par ailleurs à manger de la nourriture solide à partir de 2-3 mois (Robineau, 2005).

1.1.3.1.1.4 Alimentation

Très éclectique et prédateur accompli, le dauphin commun sait trouver sa nourriture en toutes circonstances : poissons grégaires (anchois, maquereaux, sardines, harengs, merlus, tacauds) ou céphalopodes (seiches, calmars). Les contenus stomacaux étudiés en Méditerranée comprennent une forte proportion (plus de 90 %) de poissons. Bien que cette espèce soit opportuniste, elle serait donc spécialement apte à exploiter une ichthyofaune abondante et variée. Cette tendance est bien illustrée d'ailleurs par l'abondance du dauphin commun en mer Noire associée à l'absence du dauphin bleu et blanc : il est bien connu que les calmars (20 à 40 % des proies du dauphin bleu et blanc) sont pratiquement absents de cette mer, alors que les poissons y sont abondants. La surpêche industrielle peut réduire son stock alimentaire et le contraindre à chasser en compagnie de ses propres prédateurs, que sont l'orque et certains grands requins. Ses méthodes de chasse sont presque exclusivement collectives. Elles consistent entre autres à chasser en meute à la nuit tombée lorsque les proies migrent et se regroupent vers la surface, ce qui lui évite d'avoir à plonger trop profondément pour se nourrir. Les plongées se font en moyenne entre 9 et 50 m. La profondeur maximale observée n'a pas été de plus de 200 m. Le temps passé en plongée excède rarement 5 minutes (Ridgway et Harrison, 1994 ; Robineau, 2005).

1.1.3.1.1.5 Organisation sociale, comportement et activités

Animal grégaire, il ne se déplace quasiment jamais seul. Des troupes de plusieurs centaines d'individus ne sont pas rares, mais la structure de base regroupe en général moins de 30 individus. Les groupes sont probablement établis suivant les sexes : femelles gravides ou allaitantes d'une part et mâles d'autre part.

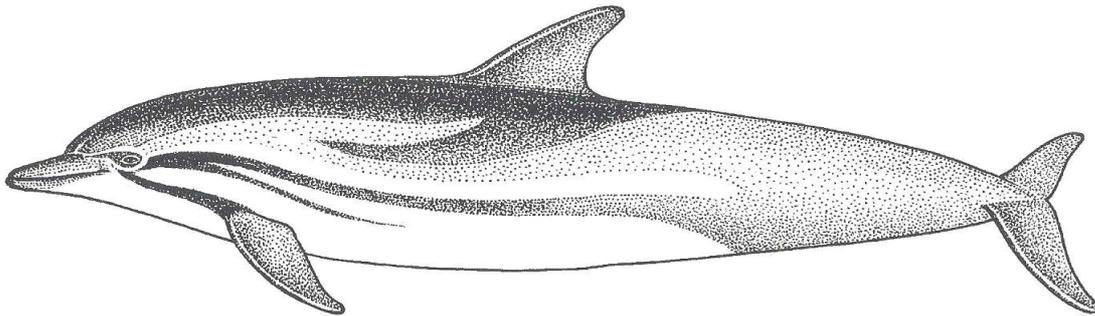
Dans l'Atlantique, *D. delphis* peut s'associer temporairement à d'autres espèces, notamment *Tursiops truncatus*, et surtout *Stenella coeruleoalba*. En Méditerranée, il forme parfois des groupes mixtes avec *S. coeruleoalba*.

Les dauphins communs sont très bruyants. Le répertoire acoustique est assez semblable à celui des autres petits delphinidés. Ils peuvent émettre des clics, des couinements, des sifflements, des craquements et des cris. Dans les grands troupes en déplacement, les individus sautant simultanément hors de l'eau sifflent de façon presque synchrone. Pendant la journée, les sifflements et les cris, riches en harmoniques sont les vocalisations les plus fréquentes. Lors de la nuit, la recherche de nourriture est associée à des vocalisations plus rythmiques : les clics, témoins de l'écho-détection (Robineau, 2005).

1.1.3.1.2 Le dauphin bleu et blanc ou dauphin rayé (*Stenella coeruleoalba* Meyen, 1833)

Du grec *stenos*, « étroit » et du latin *coeruleus*, « bleu sombre » et *albus*, « blanc » (Figure 10) (Ridgway et Harrison, 1994 ; Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

Figure 10. *Stenella coeruleoalba* (Robineau, 2005)



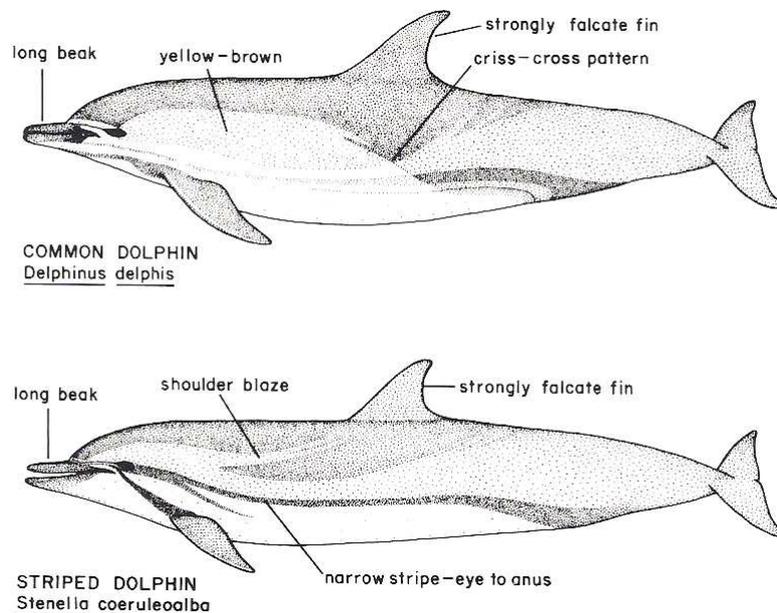
1.1.3.1.2.1 Description

Selon les régions, la taille va de 1,80 m à 2,40 m pour un poids de 100 à 150 kg pour les mâles, les femelles étant légèrement plus petites. La durée de vie, de 40 ans en moyenne, est sensiblement plus élevée que chez le dauphin commun. La silhouette est élancée et le bec se distingue bien du melon. La bouche est droite et dirigée vers l'œil. Chaque mâchoire porte de 80 à 110 petites dents coniques, légèrement incurvées vers l'arrière. Les nageoires pectorales, de petite taille, sont légèrement falciformes. L'aileron dorsal, situé à mi-corps, est de taille moyenne et falciforme également. La nageoire caudale est concave et marquée d'une petite encoche médiane. La coloration et les marques peuvent différer selon les populations. Globalement, le bec est noir, la région ventrale blanche, le dos gris foncé, les flancs gris moyen. Le ventre, blanc, est séparé des zones grises par une mince ligne transversale noire qui part de l'œil pour rejoindre, en s'évasant, la région anale. Une autre ligne noire part également de l'œil pour rejoindre la nageoire pectorale, noire elle aussi. Ces lignes constituent les éléments d'identification les plus sûrs.

L'allure générale est très semblable à celle de *D. delphis*, avec cependant un melon généralement un peu plus bombé (figure 11) (Robineau, 2005).

Figure 11. Comparaison de la morphologie externe des dauphins commun et bleu et blanc (Ridgway et Harrison, 1994)

(long beak : long bec, yellow-brown : jaune-brun, strongly falcate fin : nageoire fortement falciforme , criss-cross pattern : motifs entrecroisés , shoulder blaze : coloration plus claire sur l'épaule, narrow stripe-eye to anus : bande étroite de l'œil à l'anus)



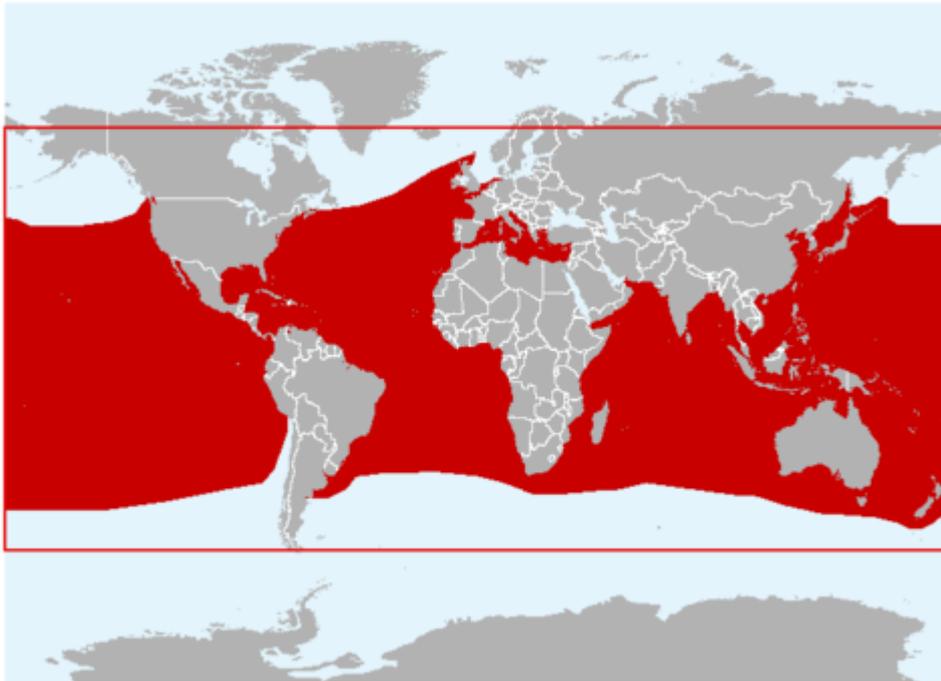
1.1.3.1.2.2 Habitat et populations

Présent dans tous les océans, ce dauphin se limite aux eaux tropicales et tempérées (figure 12). Essentiellement océanique, il peut vivre au-dessus du plateau continental, voire près des côtes si les fonds qui les bordent sont d'une profondeur supérieure à 100 m et voisins d'une zone de profondeur importante (500 m ou plus), c'est le cas par exemple en Méditerranée.

En fait, l'habitat du dauphin bleu et blanc est dicté par la nature pélagique de ses proies, et particulièrement les poissons, calmars et crustacés qui se retrouvent dans les couches sub-superficielles de la mer durant la nuit (phénomène de la migration nyctémérale des organismes marins). Au voisinage de la France, le dauphin bleu et blanc est rare en Manche et mer du Nord, mais commun en Atlantique dès que l'on s'éloigne un peu du plateau continental. Plus au large, il est très répandu puisque sa densité de population atteint 0,40 individu par km². L'espèce se rencontre dans toute la Méditerranée mais sa répartition n'y est pas uniforme. Elle est commune en Méditerranée occidentale et centrale, où elle constitue l'espèce de cétacés la plus abondante, mais elle apparaît relativement rare en Méditerranée orientale.

Fréquemment rencontré avec les autres stenelles ainsi qu'en compagnie du dauphin commun, il s'associe également avec certaines espèces de thonidés, ce qui lui vaut parfois d'être capturé dans les immenses filets tournants, les sennes. Si la plupart des pêcheurs s'efforcent de relâcher les dauphins, ils sont systématiquement capturés et tués dans le Pacifique oriental. Chassé pour sa chair depuis des siècles, il l'est encore aujourd'hui au Japon, à raison de 5 000 à 6 000 individus chaque année. Toutefois, sa population globale ne semble pas directement menacée. Elle est estimée à plusieurs millions d'individus (Robineau, 2005).

Figure 12. Répartition mondiale du dauphin bleu et blanc (Society for Marine Mammalogy, 2012)



1.1.3.1.2.3 *Reproduction et croissance*

Au large des côtes françaises, la femelle acquiert sa maturité sexuelle entre 9 et 11 ans, alors que c'est un peu plus précoce pour le mâle. Les accouplements ont lieu lorsque des petits groupes de mâles adultes et de femelles fécondes se forment : ils donnent lieu à de multiples poursuites, sauts acrobatiques, pointes de vitesse. Les accouplements et les naissances ont lieu majoritairement en fin d'été. Pour une femelle, l'intervalle entre deux naissances se situe entre deux et quatre ans. À l'issue d'une gestation de 12 mois environ, la femelle donne le jour à un nourrisson de 80 cm à 1 m, pesant moins de 10 kg. À un an, le delphineau mesure environ 1,60 m et à 2 ans, il atteint 1,80 m. Les mâles commencent à devenir plus grands que les femelles en fin de 3^{ème} année. L'allaitement dure de 12 à 18 mois. Dans la seconde année, le jeune se nourrit également de proies animales qu'il apprend à capturer progressivement. Pendant les premières semaines de sa vie, le jeune reste « collé » à sa mère, sauf lorsque celle-ci va s'alimenter en profondeur, où il reste en surface (Soury, 1996).

1.1.3.1.2.4 *Alimentation*

Le dauphin bleu et blanc est très opportuniste selon les océans ou les régions, mais pour l'essentiel, les proies attrapées sont des poissons vivant en bancs et des céphalopodes (calmars), d'une taille comprise entre 3 et 17 cm de longueur. Parmi les poissons qui représentent souvent plus de 50 % des proies, il affectionne les petits poissons-lanternes (myctophidés), ou les merlans, tandis que les sardines et anchois forment rarement une part importante de ses repas. Chez les calmars (20-40 % des proies), ses proies sont également très diverses, avec peu de prédilection pour les espèces consommées par l'homme. Enfin, le dauphin bleu et blanc ne dédaigne pas de compléter son régime par des crevettes pélagiques

(jusqu'à 10 % des proies). Les techniques de chasse diffèrent selon les proies et l'heure de la journée, sachant qu'une grande partie de la prédation est nocturne, en régions tempérées. Pour ce type de chasse, on observe qu'un groupe comptant, par exemple, 50 dauphins se disperse le soir en petites unités d'un à trois individus que l'on trouvera tous les 500 mètres environ : ainsi le groupe couvre une surface de plusieurs dizaines de kilomètres carrés, ce qui est très adapté à la localisation et à la capture de proies dispersées. Le matin, dès la chasse terminée, le groupe va se reformer progressivement pour se livrer à d'autres activités : repos et socialisation. Lorsqu'il s'agit d'attraper des poissons en plein jour, près de la surface, les dauphins vont au contraire avoir une tactique de groupe visant à concentrer les proies, grâce à des sauts et des mouvements rapides, pour ensuite les capturer plus facilement. Prédateur marin parmi les plus opportunistes, le dauphin bleu et blanc va adapter subtilement sa tactique en fonction des proies disponibles. La prédation profonde ou nocturne fait appel à la technique d'écholocation.

Le dauphin bleu et blanc peut plonger jusqu'à des profondeurs de l'ordre de 200 m. En de nombreux endroits, on assiste à des migrations qui sont liées à la fois aux déplacements saisonniers du poisson et à la reproduction. Il est capable de soutenir une vitesse supérieure à 25 km/h pendant plusieurs dizaines de minutes. Pour un dauphin qui doit ingérer chaque jour l'équivalent de 5 % de son poids (donc 5 kg pour un adulte), la prédation peut occuper 50 % de l'activité journalière (Ridgway et Harrison, 1994 ; Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

1.1.3.1.2.5 Organisation sociale, comportement et activités

Animal grégaire, ce dauphin vit habituellement en troupes de 20 à 40 individus, mais pouvant dépasser plusieurs centaines, voire plusieurs milliers d'individus lors des déplacements saisonniers. Les groupes d'Atlantique et de Méditerranée sont les plus petits. Un troupeau est subdivisé en groupes différenciés par le sexe et par l'âge. Un jeune quittera le groupe de type « familial » après le sevrage, pour un groupe d'individus immatures, et ce jusqu'à ce que la maturité sexuelle le ramène vers le groupe initial.

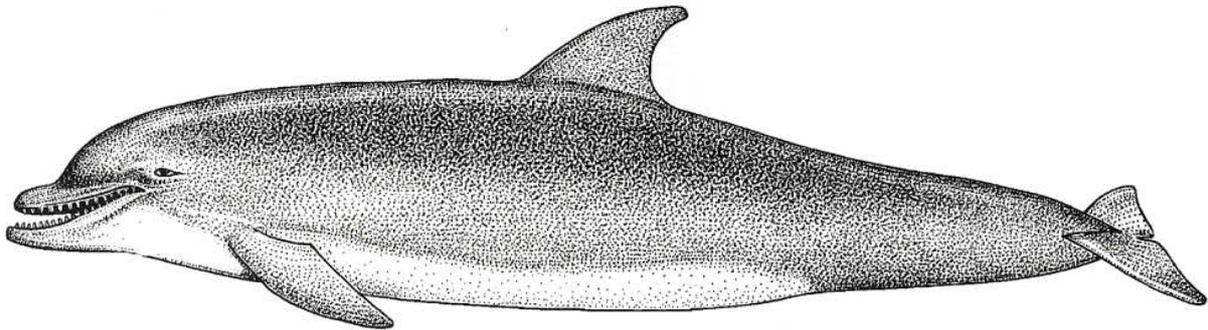
Quelle que soit la saison, une proportion importante du budget-temps des dauphins bleu et blanc est dévolue à la nutrition qui, on l'a vu, se déroule en grande partie durant la nuit. La disponibilité des proies est variable, mais la recherche se fait au milieu d'un concert de « caquètements », sons qui témoignent de l'utilisation intense du biosonar des dauphins bleu et blanc. La capture d'une proie se traduit par l'émission d'un genre de miaulement, indiquant en fait un train d'impulsions à rythme rapide. En milieu de matinée, l'activité se situe plus en surface, les dauphins se déplacent doucement (1 à 3 noeuds), ils digèrent en quelque sorte, toutefois ils peuvent être à l'affût de proies complémentaires. En milieu de journée, l'ambiance est au repos, ou bien si le groupe a décidé de changer de site de nourrissage, il entreprend un déplacement assez rapide (4-8 noeuds) dans une direction déterminée ; les dauphins sont alors plutôt silencieux. Le milieu de journée est aussi propice à la socialisation : jeux de poursuite, compétitions diverses, séries de sauts (ces sauts acrobatiques peuvent atteindre les 7 m de haut). À grande vitesse, quel que soit l'instant, un tiers des membres du groupe se trouvent hors de l'eau. Ces manifestations se traduisent par l'émission de sifflements très variés en durée (quelques dixièmes de seconde) et en fréquence : le domaine d'émission des dauphins bleu et blanc s'étend au-delà de 100 kHz. Enfin, vers la fin de journée, les dauphins s'organisent à nouveau pour la chasse : ils se redéplient vers un lieu propice et commencent à effectuer des sondes de plusieurs minutes jusqu'à des profondeurs de 200 mètres en émettant leurs « kak » (Ridgway et Harrison, 1994 ; Robineau, 2005).

1.1.3.1.3 Le grand dauphin (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821)

Du latin *tursio*, « animal proche du dauphin », du suffixe grec *ops*, « visage, aspect » et du latin *truncare*, « coupé, amputé ». Le terme spécifique fait référence aux dents tronquées (en fait usées) du spécimen type.

Le grand dauphin est le plus populaire de tous les dauphins, coqueluche des delphinariums (c'est l'espèce qui s'adapte le mieux à la vie en captivité) et rendu célèbre par la série télévisée « Flipper » (figure 13) (Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

Figure 13. *Tursiops truncatus* (Robineau, 2005)



1.1.3.1.3.1 Description

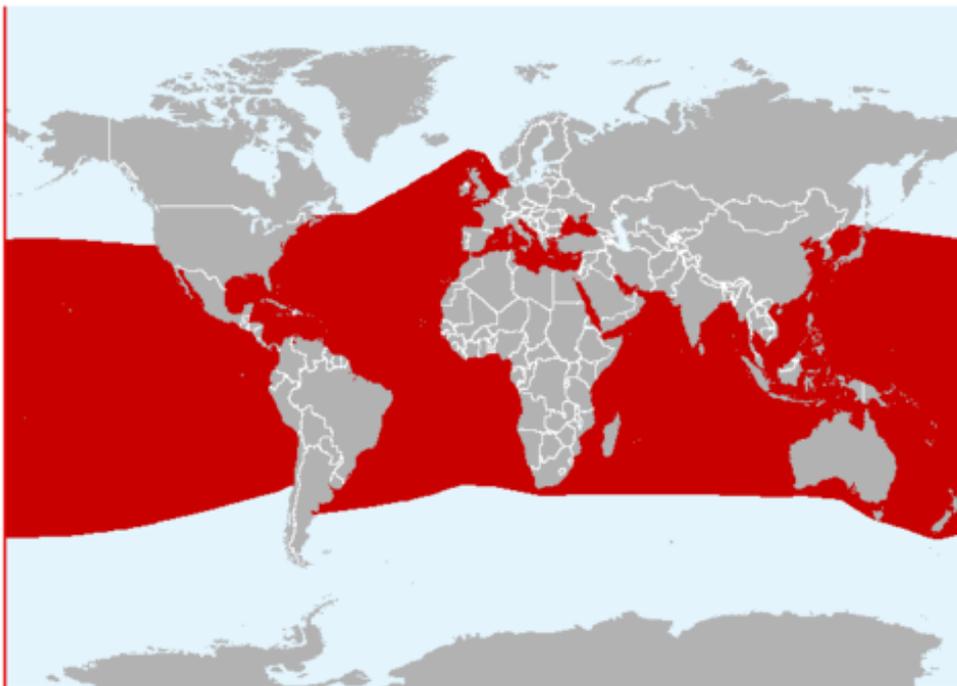
Répandu dans toutes les mers tropicales et tempérées, sauf les mers fermées, le grand dauphin présente quelques différences morphologiques selon les populations : Atlantique, océan Indien, océan Pacifique, zones où il est parfois différencié en sous-espèces. Selon l'habitat, la taille d'un mâle adulte se situe entre 2 et 4 m, pour un poids de 150 à 600 kg environ. La femelle est légèrement plus petite. La durée de vie se situe entre 30 et 40 ans. À la fois robuste et élancé, le grand dauphin est une quasi-perfection en matière d'adaptation aquatique. Le melon, bien distinct, est séparé du bec par un profond sillon frontal. Le bec est court et plus ou moins effilé. La mâchoire inférieure déborde de la mâchoire supérieure. La ligne de la bouche, qui s'infléchit vers le haut, lui confère un « sourire » caractéristique. Les dents robustes (jusqu'à 1 cm de diamètre) sont au nombre de 36 à 54 sur chaque mâchoire. Les nageoires pectorales, larges à la base, sont triangulaires. L'aileron dorsal, falciforme, de taille moyenne, est situé au milieu du corps. La nageoire caudale, en forme d'accolade, est large, concave et possède une profonde encoche médiane. La coloration gris ardoise sur le dos va en s'éclaircissant vers la gorge et l'abdomen. La couleur s'éclaircit souvent avec l'âge. Le poids moyen du cerveau avoisine, dans cette espèce, 1500 g, ce qui lui confère un coefficient d'encéphalisation 4,5 fois plus élevé que celui d'un mammifère moyen de même poids (Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

1.1.3.1.3.2 Habitat et populations

Cosmopolite, le grand dauphin évite seulement les hautes latitudes, préférant se tenir dans des eaux tempérées ou tropicales (figure 14). S'il lui arrive d'aller en haute mer, au bord, voire au-delà du plateau continental, il marque une nette préférence pour les zones côtières, n'hésitant pas à pénétrer dans les estuaires, voire dans les ports, pour peu qu'il y trouve un quelconque intérêt. Dauphin du large ou des côtes, c'est la nourriture qui semble déterminer l'essentiel de ses déplacements. Pour les dauphins côtiers, les données ne montrent pas de variation saisonnière de distribution. Au contraire, le régime alimentaire varié plaide plutôt pour une stratégie d'occupation permanente d'un domaine et pour son exploitation en toutes saisons grâce à une connaissance fine de la topographie et de son écologie. À l'inverse, les grands dauphins « pélagiques » qui vivent plus au large dans la zone du plateau continental ou dans le domaine océanique se révèlent généralement mobiles. Globalement, l'espèce ne semble pas être en danger. Animal puissant et organisé, ce dauphin paraît armé pour éviter les pièges qui ne lui sont pas directement destinés, comme les filets.

Sur les côtes françaises, la fréquence de cette espèce dans les échouages permet de la classer en quatrième position. Dans l'Atlantique, les observations en mer se concentrent dans des secteurs bien localisés : baie du Mont St Michel, archipel de Molène, île de Sein, Pertuis charentais, bassin d'Arcachon. Le grand dauphin est également observé en Méditerranée, le long de toutes les côtes provençales, avec une plus grande fréquence autour des îles d'Hyères et au large de Marseille, ainsi qu'en mer Noire (Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

Figure 14. Répartition mondiale du grand dauphin (Society for Marine Mammalogy, 2012)



1.1.3.1.3.3 Reproduction et croissance

La maturité sexuelle est atteinte entre 10 et 12 ans chez les mâles et 9 et 10 ans chez les femelles. La copulation est précédée par des activités de cour très variées. Après une gestation de 12 mois, la femelle met au monde un delphineau qui mesure environ 1 m. Elle le pousse rapidement à la surface pour qu'il prenne sa première inspiration. Elle peut être assistée par d'autres individus, notamment des femelles non gravides. En effet, c'est d'abord en assistant d'autres femelles dans leur procréation que les jeunes femelles acquièrent l'expérience nécessaire pour donner naissance et élever leurs jeunes. La période des naissances est située en octobre sur les côtes atlantiques bretonnes alors qu'en Méditerranée (Adriatique) elles ont lieu en été, coïncidant avec la température des eaux la plus élevée. La lactation dure de 12 à 18 mois, bien que le jeune consomme du poisson à partir de 6 mois. Les tétées ont lieu toutes les 15 à 30 min, jour et nuit. Les premières semaines sont pour le jeune une période d'apprentissage pendant laquelle la mère contrôle étroitement ses mouvements et veille à sa sécurité. Pendant toute cette période, le jeune se déplace en contact étroit avec sa mère pour profiter de l'onde de pression qu'elle produit en nageant. Il ne commence à acquérir une certaine indépendance que vers 3 semaines lorsque, sa musculature s'étant suffisamment développée, il devient capable de se passer de l'effet d'entraînement engendré par le déplacement de sa mère. Il reste près de sa mère pendant plusieurs années (3 à 4 ans), ce qui témoigne de la grande socialisation de cette espèce. Les mères et les jeunes avec d'autres adultes forment des groupes qui facilitent l'apprentissage des jeunes et permettent aux mères de s'alimenter sans leur petit. Le cycle de reproduction est de 2 à 3 ans selon les régions. Une fois indépendants, les jeunes quittent leur groupe pour rejoindre un groupe mixte et erratique de sub-adultes. Puis, quand ils atteignent leur maturité ils quittent ce groupe. Les femelles reviennent souvent dans le groupe où elles sont nées, alors que les mâles restent solitaires ou avec 2 ou 3 congénères (Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

1.1.3.1.3.4 Alimentation

Particulièrement éclectique en matière de nourriture, le grand dauphin n'est jamais en manque, ce qui explique l'étendue de son territoire. On observe en général une forte fréquence des poissons benthiques (mulets, sardines, tacauds, etc.). Les céphalopodes et certains crustacés constituent également une partie de son ordinaire. Prédateur perfectionné capable, grâce à l'écholocation, de repérer ses proies à distance, il est tout aussi capable de chasser en groupe dans un banc de sardines que de fouiller le sable ou la vase pour débusquer un poisson benthique isolé. Ses plongées durent en moyenne 3 à 4 minutes mais peuvent atteindre 10 minutes, pour une profondeur maximale de 600 m. Sa vitesse maximale est de 30 km/h (Robineau, 2005).

1.1.3.1.3.5 Organisation sociale, comportement et activités

S'il est parfois observé en troupes de plusieurs centaines d'individus en plein océan, on le rencontre le plus souvent près des côtes en groupes de 2 à 20 individus. Les dauphins vivant dans les baies ou les estuaires forment généralement des groupes plus petits que ceux qui fréquentent le large. Le sexe, l'âge, le statut reproducteur et les rapports familiaux sont des facteurs importants à considérer lorsque l'on envisage la composition des groupes. Trois sortes de groupes peuvent s'observer, notamment des groupes de femelles adultes accompagnées de leur petit le plus récent et des groupes de femelles ou de mâles subadultes. Les mâles adultes se rencontrent isolés ou par paires ; ils vont d'un groupe de femelles à un

autre et entretiennent avec les femelles des relations brèves (durant au plus quelques semaines).

Le grand dauphin est un animal particulièrement social et solidaire dans la plupart des actes de sa vie, qu'il s'agisse d'aider une mère et son petit au moment de la mise-bas, de chasser en meute, de se défendre contre un agresseur ou d'assister un congénère en difficulté. L'espèce est aussi la grande pourvoyeuse des dauphins dits « ambassadeurs », séparés du groupe pour des raisons obscures (par exemple, « Jean-Louis », à la pointe du Raz, en Bretagne, entre 1976 et 1990).

Les dauphins sauvages sont actifs aussi bien le jour que la nuit. L'activité du grand dauphin se répartit entre la recherche de nourriture, le repos (nage lente ou immobilité totale) et les jeux et divers déplacements. La chasse est souvent individuelle mais peut être collective, les dauphins coopérant pour maintenir la cohérence des bancs de poissons. Les proies peuvent être pourchassées à grande vitesse, étourdies par un coup de queue, ou rabattues vers le rivage pour qu'elles s'y échouent. Des sauts bruyants ou des coups de queue peuvent aussi servir à maintenir les proies en bancs ou à les désorienter. Les *Tursiops* chassent à vue ou localisent leurs proies par écho-détection. Les ondes acoustiques à basse fréquence (0,25 à 1 kHz) et à longue portée, ou clics d'orientation, permettent d'explorer l'environnement, les ondes acoustiques à haute fréquence (2 à 220 kHz), ou clics de discrimination, fournissent des informations très précises sur les proies. Dans la zone côtière, le début de chasse est généralement collectif pour rabattre les proies vers un secteur favorable, puis le groupe se disperse parfois sur une grande étendue.

On interprète comme comportement ludique des sauts spectaculaires hors de l'eau, de brusques accélérations, une compétition pour un objet quelconque flottant en surface, de soudains changements de direction des animaux nageant à l'étrave d'un bateau. Ces manifestations souvent très courtes, sont généralement le fait de subadultes. Ce sont des animaux de surface actifs qui n'ont pas peur d'approcher les bateaux. Ils apprécient les contacts avec d'autres animaux et parfois avec les humains, s'approchant facilement d'un nageur. Ils sont parfois accompagnés de d'autres espèces de cétacés comme des dauphins ou des globicéphales, et parfois d'espèces marines autres que des mammifères comme des tortues.

Le repos ne dure que quelques minutes, mais se reproduit à de nombreuses reprises durant la journée. Les individus regroupés s'orientent face au courant à une vingtaine de centimètres de la surface et remontent lentement en surface, toutes les 2 ou 3 minutes, pour respirer.

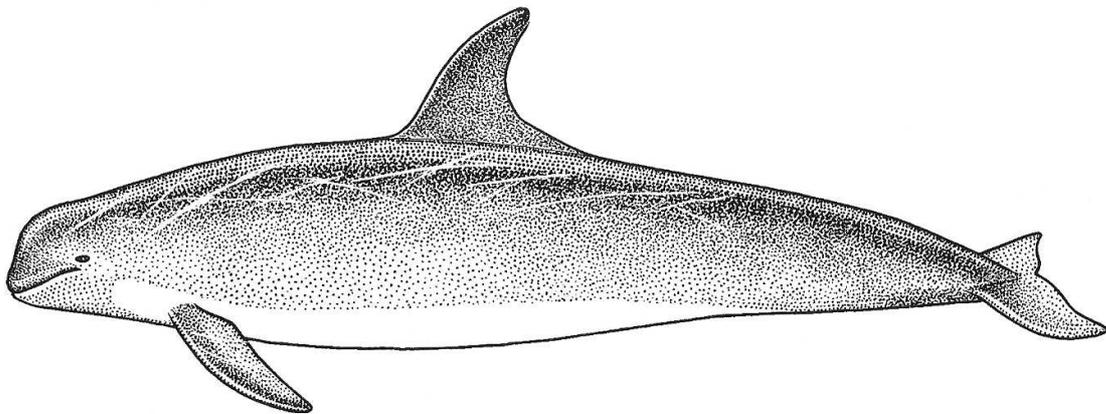
Les émissions acoustiques ont surtout été étudiées sur des animaux captifs. Les *Tursiops* produisent trois sortes d'émissions acoustiques : des sifflements, des clics d'écholocalisation et des impulsions en rafale utilisées semble-t-il pour exprimer des situations affectives ou émotives. Les sifflements, en grande part stéréotypés, semblent caractériser les individus et peuvent être utilisés pour communiquer aux autres individus l'identité, l'état émotionnel et la localisation de l'individu émetteur. Cette signature individuelle, qui se développe chez le jeune, reste stable plusieurs années et sans doute toute la vie (Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

1.1.3.1.4 Le dauphin de Risso (*Grampus griseus* Cuvier, 1812)

Du latin *grampus* « grand » et *griseus* « gris ».

Risso est le nom du naturaliste amateur français qui découvrit un spécimen échoué en Méditerranée, près de Nice, en 1811 (figure 15) (Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

Figure 15. *Grampus griseus* (Robineau, 2005)



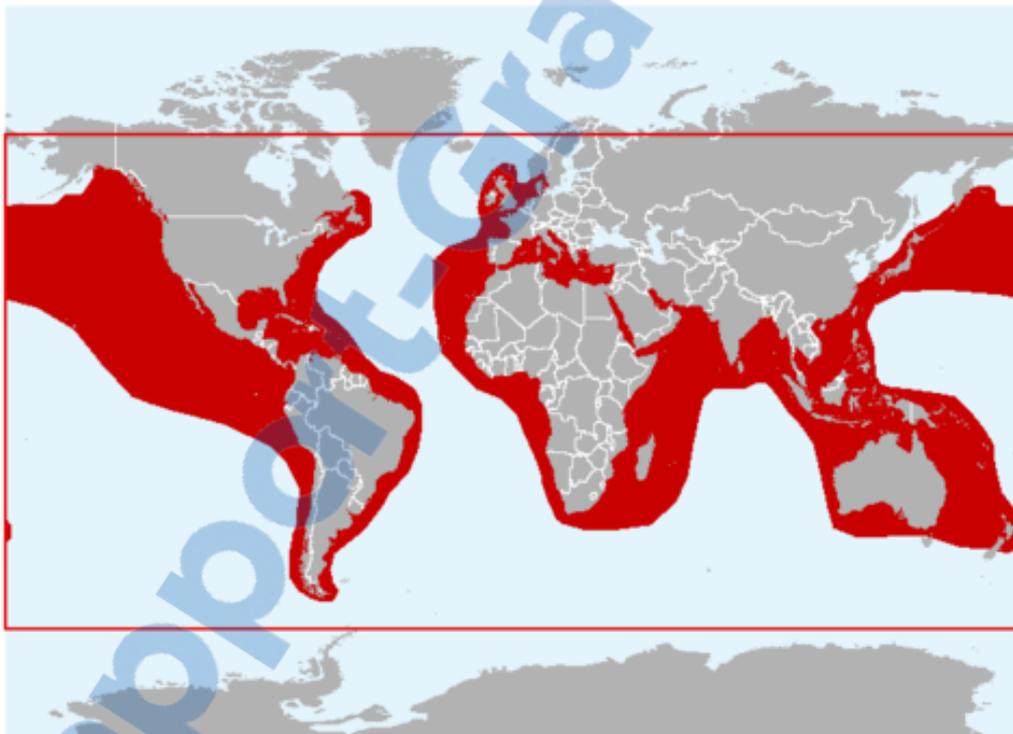
1.1.3.1.4.1 Description

Le dauphin de Risso est un animal robuste à l'avant, plus mince à l'arrière. La taille d'un adulte se situe entre 2 et 4 m pour un poids de 300 à 500 kg, sans différence marquée selon le sexe. La durée de vie se situe entre 20 et 30 ans. Le melon, important, retombe d'une façon abrupte vers le bec, quasi-inexistant, donnant à l'animal un profil anguleux. La tête est séparée en deux par un sillon vertical peu profond qui relie le front à la bouche. Celle-ci, rectiligne ou incurvée, remonte en direction de l'œil. La mâchoire supérieure ne possède pas de dents apparentes, tandis que la mâchoire inférieure porte un maximum de 14 dents robustes qui peuvent disparaître chez un individu âgé. Les longues nageoires pectorales sont falciformes, ainsi que l'aileron dorsal, situé au milieu du corps. La nageoire caudale, en forme d'accolade, possède une encoche médiane. La coloration varie tout au long de la vie du dauphin. Chez un individu jeune, le corps est gris sombre, à l'exception de la face ventrale qui présente, entre les pectorales, un plastron blanc, évoquant grossièrement une ancre de bateau. Avec le temps, le corps se couvre de balafres blanchâtres, supposées être le résultat de corps à corps entre congénères ou de lutte avec les calmars. Ceci s'explique par son épiderme qui est fait d'une couche supérieure qui ne se reconstitue pas lorsqu'elle est blessée et laisse définitivement apparaître la sous-couche claire. Un individu âgé peut devenir entièrement blanc (Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

1.1.3.1.4.2 Habitat et populations

Cosmopolite, ce dauphin préfère toutefois les eaux tropicales et tempérées (figure 16). Dans les eaux métropolitaines françaises, le dauphin de Risso est commun dans le golfe de Gascogne, occasionnel en Manche et il représente environ 2,5 % des observations réalisées dans le nord de la Méditerranée. Il ne fréquente les côtes que dans la mesure où les fonds sont suffisamment importants pour y abriter les calmars qu'il convoite. Les mouvements des groupes de dauphins de Risso commencent à être étudiés: sans être migrateur, cet animal a un comportement qui fait penser au nomadisme, étant présent à un endroit avec une périodicité de plusieurs mois, avec une fidélité au cours des années. Cette stratégie pourrait lui permettre de s'adapter à l'abondance variable des différentes ressources qu'il exploite. Il est chassé occasionnellement par certaines pêcheries locales, mais l'espèce ne semble pas menacée (Soury, 1996 ; Robineau, 2005).

Figure 16. Répartition mondiale du dauphin de Risso (Society for Marine Mammalogy, 2012)



1.1.3.1.4.3 Reproduction et croissance

Reproduction et croissance sont mal connues dans cette espèce. La maturité sexuelle pourrait survenir au-delà de dix ans, chez les femelles. À l'issue d'une gestation de 12 à 14 mois environ, la femelle met au monde un delphineau d'une taille moyenne de 1,20 à 1,50 m. Les variables telles que l'intervalle entre mise-bas ou la durée d'allaitement sont inconnues : le fait que les groupes soient nomades ne facilite pas les choses pour les études scientifiques locales. Des cas d'hybridation entre dauphin de Risso et grand dauphin ont été observés à l'occasion d'échouages et en captivité (Robineau, 2005).

1.1.3.1.4.4 Alimentation

Bien que certains poissons puissent occasionnellement entrer dans son alimentation, le dauphin de Risso se nourrit essentiellement de calmars. Sa denture (dents uniquement sur la mâchoire inférieure) est caractéristique de cette prédilection pour les céphalopodes. C'est tout le contraire des petits cétacés ichtyophages, qui possèdent de très nombreuses petites dents sur les deux mâchoires. Les proies appartiennent à des espèces aussi bien pélagiques (calmars), que benthiques (encornet commun) voire côtières (poules). Bien que l'on pense que le dauphin de Risso plonge très profondément (peut-être 500 m ou même plus) pour attraper ses proies, on n'en a pas encore de preuves expérimentales. La technique de chasse fait un usage intensif de l'écholocalisation, avec des clics caractéristiques. Les plongées peuvent durer de 5 à 30 minutes (Robineau, 2005).

1.1.3.1.4.5 Organisation sociale, comportement et activités

Grégaire, il vit la plupart du temps en groupes de 10 à 20 individus, parfois en troupes plus importants à l'occasion d'une migration saisonnière. On ne sait pas si les mâles et les femelles vivent habituellement ensemble, ou s'ils se séparent pendant une partie de l'année. D'après des observations faites sur des échouages massifs, il est possible que les communautés soient composées de sous-groupes comprenant des dauphins de même classe d'âge et de même sexe.

Les dauphins de Risso ont les mêmes comportements que les autres delphinidés : ils nagent couramment à 7-8 km/h, même si des pointes jusqu'à 30 km/h ont été observées, mais ils sont rarement très véloces. Ils ne viennent pas volontiers à l'étrave, et quand ils le font ne restent que peu de temps devant le bateau. Typiquement, le cycle d'activité est composé de chasse nocturne, avec souvent des périodes de repos ou de voyage en journée, mais ce cycle n'est pas absolument stéréotypé: il arrive aussi qu'on observe des *Grampus* en train de chasser en sub-surface, en fin d'après-midi, par exemple.

La plus remarquable des attitudes du dauphin de Risso est sans conteste sa posture "queue en l'air", unique chez les dauphins : un ou plusieurs individus stationnaires se positionnent verticalement avec la tête et le thorax immergés, tandis qu'une partie du ventre ainsi que le pédoncule caudal sont émergés à la verticale. Cette curieuse attitude peut se prolonger plusieurs secondes, elle est parfois suivie de sortes de corps-à-corps et de sauts, et elle peut être répétée plusieurs fois. Cette attitude pourrait être associée à une activité générale d'accouplement. Une femelle qui voudrait refuser un accouplement pourrait adopter cette position, mais c'est une pure conjecture (Robineau, 2005).

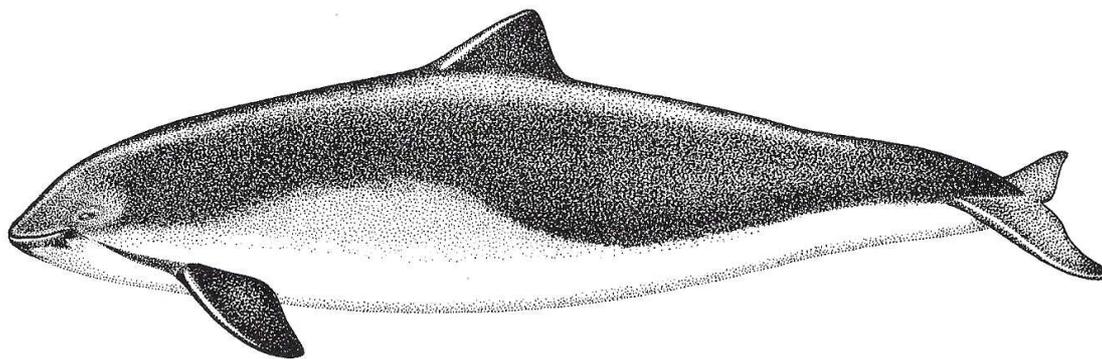
1.1.3.2 Les phocoenidés

Les phocoenidés (*Phocoenidae* Gray 1825) sont des odontocètes de petite taille (140 à 220 cm) à tête plus ou moins arrondie, sans bec. La nageoire dorsale est généralement présente et plus ou moins triangulaire. Les pectorales sont courtes et étroites. La famille compte 3 genres et 6 espèces sont actuellement reconnues. La famille ne compte dans l'Atlantique qu'un seul genre, *Phocoena*, et une seule espèce *Phocoena phocoena* (Robineau, 2005).

1.1.3.2.1 Le marsouin commun (*Phocoena phocoena* Linnaeus, 1758)

Phocoena vient d'un mot grec employé par Aristote pour désigner un cétacé de mer Noire plus petit qu'un dauphin, mais qu'il est difficile de reconnaître (figure 17) (Robineau, 2005 ; Museum national d'histoire naturelle, 2012).

Figure 17. *Phocoena phocoena* (Robineau, 2005)



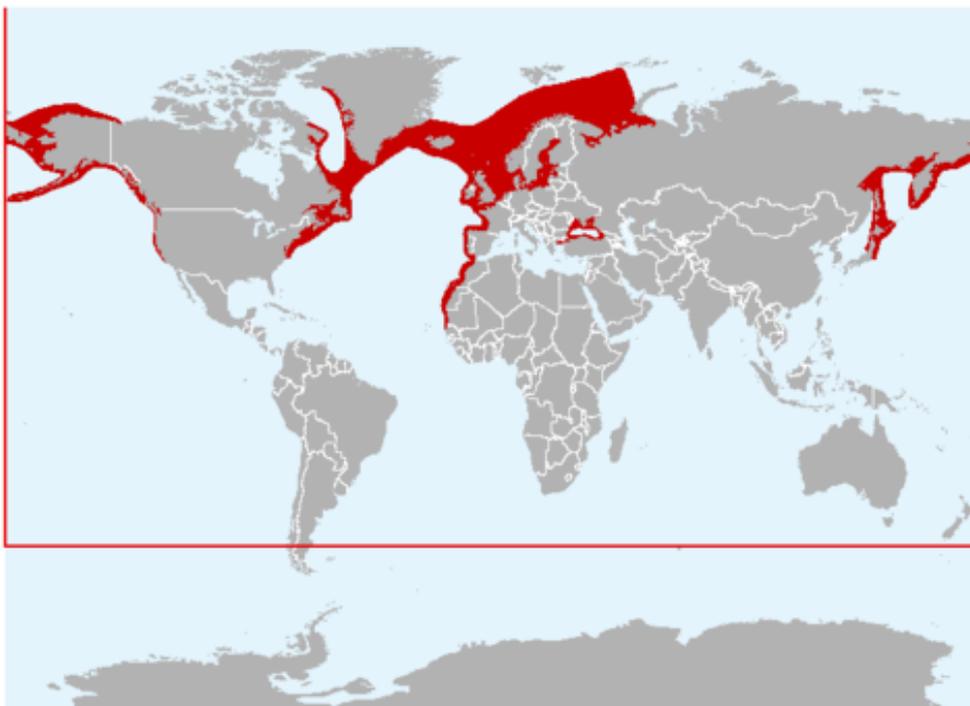
1.1.3.2.1.1 Description

Le marsouin commun est le plus petit des cétacés d'Europe. Il présente un dimorphisme sexuel : les femelles deviennent plus grandes que les mâles. Les mâles mesurent le plus souvent entre 1,40 et 1,60 m, tandis que les femelles mesurent entre 1,50 et 1,80 m. Leur poids dépasse rarement 60 kg. Le corps est d'apparence robuste. La tête, sans bec, offre un profil dorsal fuyant. Le nombre de dents par mâchoire varie de 40 à 60, il est généralement un peu plus faible en haut qu'en bas. La nageoire dorsale, basse et triangulaire, se dresse au milieu du dos. Les nageoires pectorales, de taille modérée, sont étroites et se terminent par une extrémité arrondie. La coloration gris foncé ou noire de la face dorsale s'étend plus ou moins vers le bas ; sa limite ventrale est généralement plus haute en avant de la nageoire dorsale, que dans la partie postérieure du corps. Elle est bordée par une zone gris clair, de largeur variable, qui forme une transition avec le blanc pur de la face ventrale. La face inférieure de la nageoire caudale, de même que la bordure de la mâchoire inférieure et les faces médiale et dorsale des nageoires pectorales apparaissent cependant sombres (Robineau, 2005 ; Museum national d'histoire naturelle, 2012).

1.1.3.2.1.2 *Habitat et populations*

L'aire de répartition du marsouin commun est morcelée et limitée à l'hémisphère Nord (figure 18). Trois sous-populations sont aujourd'hui distinguées en mers Noire et d'Azov, dans le Pacifique et dans l'Atlantique. Les principales concentrations s'observent en mer du Nord et en Baltique. En France, le marsouin commun est devenu rare : il est régulier en Manche, sporadique en Atlantique, au nord du Pertuis charentais et absent ailleurs. Cette espèce, typiquement côtière, circonscrite aux eaux tempérées froides et subarctiques, ne se rencontre guère au-delà de la limite du plateau continental et fréquente le plus souvent des eaux dont la température de surface ne dépasse pas 17°C. Le marsouin fréquente les baies, estuaires et détroits peu profonds (en général, pas plus de 200 m). Il remonte souvent le long des grands fleuves, parfois sur des distances considérables (Robineau, 2005 ; Museum national d'histoire naturelle, 2012).

Figure 18. Répartition du marsouin commun (Society for Marine Mammalogy, 2012)



1.1.3.2.1.3 *Reproduction et croissance*

La reproduction est nettement saisonnière dans toutes les populations. Ovulations et fécondations se produisent pendant une période relativement brève, au printemps et en été. La gestation durerait entre 10 et 11 mois et la lactation entre 8 et 9 mois, mais le jeune commence très tôt (dès 5 mois) à consommer de la nourriture solide, tout en continuant à s'allaiter. La plupart des femelles de l'Atlantique nord, fécondées tous les ans, sont simultanément gravides et allaitantes la plus grande partie de leur vie. À la naissance, la taille du nouveau-né avoisine 50 % de celle de sa mère : elle varie de 65 à 90 cm et son poids de 5 à 7 kg. La croissance du jeune est très rapide. Après la maturité, la croissance des femelles est plus rapide que celle des mâles. L'âge moyen à la maturité sexuelle serait de 3-4 ans. La longévité est en moyenne de 16 ans, mais peut atteindre 24 ans (Robineau, 2005).

1.1.3.2.1.4 Alimentation

Le marsouin commun de l'Atlantique nord se nourrit d'une grande variété de poissons et parfois de céphalopodes. Les espèces les plus fréquemment consommées sont les capelans, les harengs, les merlans, les sardines, les maquereaux, les soles et les morues, etc. Il s'agit essentiellement d'espèces benthiques, le marsouin chassant souvent très près du fond. Les marsouins chassent le plus souvent isolés et ne coopèrent que rarement pour la capture des proies. Celle-ci se fait en utilisant un mécanisme de succion (Robineau, 2005).

1.1.3.2.1.5 Organisation sociale, comportement et activités

Les marsouins communs se rencontrent le plus souvent isolés ou par paires. L'organisation sociale est mal connue. Les femelles restent en étroit contact avec leur petit pendant toute la durée de l'allaitement. Une certaine ségrégation, par âge et par sexe, a été parfois signalée. Les marsouins s'associent rarement avec d'autres espèces de cétacés.

L'espèce étant difficile à approcher et à observer en mer, son comportement dans la nature est mal connu. En captivité, des activités ludiques et des comportements de cour pendant lesquels les femelles étaient souvent plus entreprenantes que les mâles ont été signalés.

La vitesse maximale de nage est de 22 km/h. Les individus sautent rarement hors de l'eau. La durée des plongées, généralement très brève, ne dépasse guère 5 mn et la profondeur maximale atteinte est rarement supérieure à 200 m. Contrairement aux dauphins, les marsouins ne viennent pas jouer devant l'étrave des bateaux.

Les marsouins émettent des trains de clics selon deux fréquences principales (2 kHz et 130 kHz), vraisemblablement utilisés pour l'écho-détection et la communication ; ils ne produisent pas de sifflements (Robineau, 2005).

1.2 Les pinnipèdes

Les pinnipèdes, sous-ordre de mammifères marins, appartenant à l'ordre des carnivores, comptent trois familles (Marion et Sylvestre, 1993) :

- les *Otariidae* (otaries) ;
- les *Odobenidae* (morses) ;
- les *Phocidae* (phoques et éléphants de mer).

Seuls des phoques appartenant à la famille des *Phocidae* se rencontrent dans les eaux métropolitaines françaises.

1.2.1 Caractères anatomiques et physiologiques généraux

1.2.1.1 Morphologie externe

Les principales modifications de structure, qui distinguent les pinnipèdes des carnivores terrestres, sont celles qui leur permettent de séjourner presque constamment dans l'eau de mer, d'y nager rapidement, d'y plonger assez profondément et de se nourrir des divers animaux qui y vivent. Le corps a acquis une forme hydrodynamique au cours de l'évolution, permettant une moindre résistance à l'eau ; la tête s'est aplatie (surtout chez les phoques), ce qui présente un avantage pour changer de profondeur ; le cou est devenu court et épais ; la cage thoracique est longue ; la queue est courte, le rôle de gouvernail ayant été conféré aux membres postérieurs, transformés en nageoires, de même que les membres antérieurs, tout en restant pentadactyles. Sur chaque membre, les doigts sont reliés l'un à l'autre par la palmure jusqu'à la pointe des dernières phalanges. Les segments proximaux des membres ont subi un raccourcissement et sont inclus dans le contour du corps. Seuls la main (et une partie de l'avant bras) et le pied (et la partie distale de la jambe) sont libres. La couche de graisse tend à recouvrir les parties saillantes du squelette (épaules et membres). Les autres éléments externes se sont atrophiés, ont migré ou ont disparu (les oreilles externes sont absentes chez les *Phocidae*, les testicules, le pénis et les glandes mammaires se trouvent dans des replis cutanés).

Le tégument des pinnipèdes se compose d'un épiderme et d'un derme, qui forment la peau et d'un hypoderme, constitué par une épaisse couche de lard (pannicule adipeux), lâchement associée aux muscles sous-jacents.

Le pelage comporte deux sortes de poils : de longs poils raides de couverture (jarres) et de petits poils souples de rembourrage (bourre). Les poils rarement isolés, se groupent par unités de 2 à 12 (un poil de jarre et plusieurs poils de bourre) dirigés vers l'arrière et associés à des glandes sébacées bien développées. Chez les phoques, les pattes sont munies de poils sur leurs deux faces alors que seule la face externe en est pourvue chez les otaries et les morses. La coloration du pelage est uniforme sauf chez quelques phoques, où il est orné de tâches, parfois en forme de cercles, d'une couleur différente. De plus, la coloration peut varier avec l'âge, le pelage des phoques nouveau-nés est habituellement blanc (lanugo). Les mues annuelles ont lieu la plupart du temps vers l'été, à l'exception du morse qui mue en automne. La mue n'affecte pas simultanément toutes les parties du corps, ce sont souvent les pattes qui sont affectées en premier lieu, suivies de la tête et du coup, de la face dorsale du corps et finalement de sa face ventrale. Chez certaines espèces, la mue fatigue beaucoup l'animal (Frechkop, 1955; Robineau, 2004).

1.2.1.2 Anatomie

1.2.1.2.1 Squelette

Parmi les particularités du squelette, ce qu'on remarque avant tout, c'est l'aspect massif de la partie cervicale de la colonne vertébrale, des membres antérieurs et de la cage thoracique (en corrélation avec de grands poumons) et une réduction du segment caudal (queue courte) (figure 19) (Frechkop, 1955; Robineau, 2004).

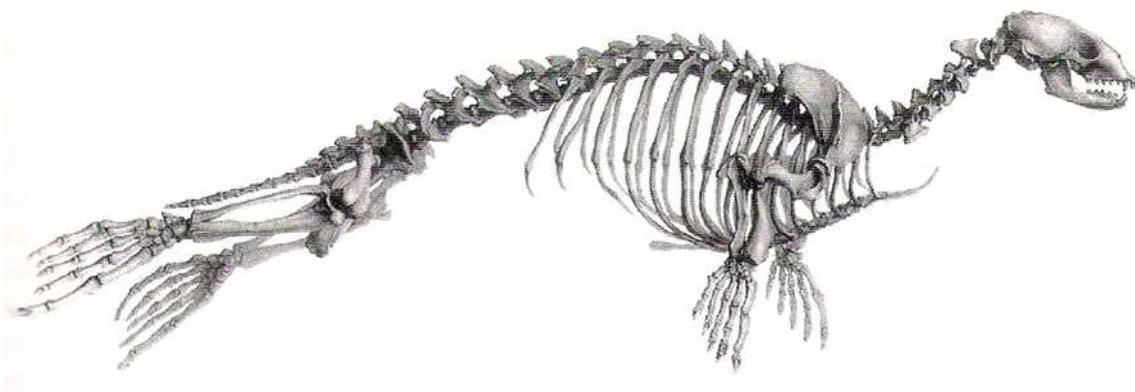
1.2.1.2.1.1 Crâne

La forme générale du crâne frappe par la brièveté du massif facial, par la position et la grandeur des fosses orbitaires ainsi que par l'aplatissement et l'élargissement de la capsule cérébrale. Le museau paraît court à cause de la position avancée des fosses orbitaires. Celles-ci, conformément au grand volume des yeux, se sont développées grâce à la réduction des fosses temporales et à l'amointrissement des muscles de la mastication (Frechkop, 1955 ; Robineau, 2004).

1.2.1.2.1.2 Colonne vertébrale, côtes et sternum

Contrairement aux carnivores terrestres, la colonne vertébrale des pinnipèdes se courbe aussi bien dans le sens dorsal que ventral, ce qui est un avantage pour l'exécution des mouvements très variés qu'exige la chasse sous l'eau (Frechkop, 1955 ; Robineau, 2004).

Figure 19. Squelette de phoque (*Phoca vitulina*), d'après Blainville (Robineau, 2004)



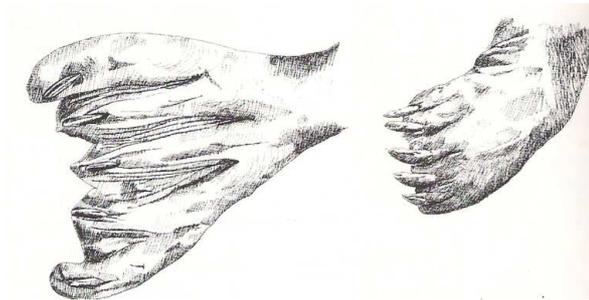
La formule vertébrale est généralement la suivante : Cv 7, T 14-16, L 5, S 3, Cd 10-12. Les différences morphologiques observées entre la colonne vertébrale des otaries et des phoques reflètent leurs modes de locomotion. Ce point sera développé plus en détail dans la partie « Musculature et locomotion ». Le nombre de côtes correspond au nombre de vertèbres thoraciques. Le sternum est composé de 8 ou 9 sternèbres, le manubrium sternal des pinnipèdes est très allongé vers l'avant (Frechkop, 1955 ; Robineau, 2004).

1.2.1.2.1.3 Membres

L'omoplate est plus ou moins falciforme chez les phoques. Il n'y a plus trace de clavicule. Les os carpiens ont fusionné en un seul os. L'agrandissement de la surface de la « rame » est obtenu, dans cette extrémité, par un allongement extraordinaire du pouce, les autres doigts ayant une longueur décroissante. Les doigts se terminent par une forte griffe.

Dans le membre postérieur, la surface de la nageoire est agrandie principalement par l'allongement des orteils marginaux (I et V), de sorte qu'ils sont devenus plus longs que les trois autres, ce qui donne un contour concave à l'extrémité du pied (figure 20) (Frechkop, 1955 ; Robineau, 2004).

Figure 20. Pattes antérieure (à droite) et postérieure (à gauche) droites d'un phoque gris (Robineau, 2004)



1.2.1.2.1.4 Pelvis

Le pelvis des pinnipèdes se caractérise par un raccourcissement de l'ilium et un allongement de l'ischium et du pubis. L'allongement de la portion post-acétabulaire est à mettre en rapport avec la puissance des muscles qui s'y attachent, utilisés essentiellement dans la locomotion terrestre chez les otaries et dans la locomotion aquatique chez les phoques (Robineau, 2004).

1.2.1.2.2 Musculature et locomotion

Comme la nage n'est pas effectuée de la même façon chez les otaries et les morses d'une part et chez les phoques d'autre part, des différences notables ressortent de la comparaison de la musculature dans ces deux groupes.

Les phoques avancent, dans l'eau, par l'action des nageoires postérieures, dont ils orientent l'une vers l'autre les faces plantaires ; ils s'en servent de la façon dont les poissons utilisent leur queue verticale (battements latéraux). Des flexions du corps dans le plan horizontal (comme chez les serpents) et dans le plan vertical (comme chez les chenilles) contribuent à la progression. Les nageoires antérieures servent aux changements de direction brusques. Les otaries, au contraire, se meuvent principalement grâce aux mouvements puissants de leurs longues nageoires antérieures, à la manière des manchots. D'autre part, leur échine se courbant dans le plan vertical, leur nage est comparable à celle des dauphins et, comme ces derniers, elles peuvent bondir au-dessus de la nappe d'eau.

À terre, les otaries avancent en s'appuyant sur les 4 membres, dont la surface touchant le sol est dépourvue de poils. Les phoques, au contraire, s'appuient seulement et difficilement

sur leurs nageoires antérieures, et entrent en contact par toute leur face ventrale avec le substrat : ils se déplacent par reptation ventrale voire costale.

Chez le phoque, le cou est plus court, plus gros et moins mobile, aussi la musculature cervicale est-elle plus simplifiée, bien que plus volumineuse, que chez les otaries. Chez ces dernières, les fortes apophyses cervicales associées à une musculature bien développée permettent une grande mobilité de la tête et du cou lors de la locomotion terrestre.

D'autre part, la fonction des muscles homologues peut être tout à fait différente dans ces deux groupes. Ainsi, il y a, chez les phoques, tendance au développement vers l'arrière de la musculature dorsale, qui joue le rôle principal dans les flexions latérales du corps, associée à un fort développement des apophyses lombaires ; chez les otaries, le rôle de ces muscles est plutôt dévolu à la mobilité des membres antérieurs. De même, d'autres muscles du thorax ont pour fonction, chez les phoques, de fixer la position du membre antérieur, tandis que, chez les otaries, en association avec les grandes apophyses de la région thoracique antérieure, ils doivent aider à le mouvoir (Frechkop, 1955).

1.2.1.2.3 Appareil digestif

1.2.1.2.3.1 Cavité buccale

La denture montre divers degrés de réduction numérique et une tendance à l'uniformité de ses éléments pour aboutir à une denture de piscivore. Le nombre d'incisives par demi-mâchoire varie, mais est habituellement de 3/2. Les canines sont bien développées et chez le morse, les supérieures se sont transformées en d'énormes défenses. Les dents jugales sont habituellement au nombre de 5 par demi-mâchoire (Pm 4/4, M 1/1). Seule la dernière de ces dents est une véritable molaire mais elle ne diffère généralement pas, par sa forme et par le nombre de racines, des prémolaires qui la précèdent. L'impossibilité de mastiquer sous l'eau et la nécessité de retenir dans la gueule des proies glissantes expliquent la réduction des surfaces triturantes des dents jugales et leur forme transversalement comprimée. Les dents ne servent donc qu'à saisir et retenir les proies, sans jamais les diviser, celles-ci sont systématiquement avalées en entier. Les couronnes dentaires présentent le plus souvent une pointe principale et deux accessoires, l'une à l'avant et l'autre à l'arrière de la principale.

Le remplacement des dents se produit très tôt ; les dents de lait ne percent la gencive que chez les otaries et quelques espèces de phoques et tombent très peu de temps après la naissance. Chez la plupart des phoques, le processus de leur résorption peut débuter et parfois même être terminé *in utero* (Frechkop, 1955).

1.2.1.2.3.2 Tube digestif et glandes annexes

L'œsophage, qui présente souvent des plis longitudinaux, se dilate aisément et peut donner passage à des proies volumineuses dont le transit est facilité par la sécrétion de nombreuses glandes muqueuses.

Parmi les particularités du tube digestif, on constate, avant tout, la position de l'estomac, orienté dans le sens de la longueur du corps, puis la grande longueur de l'intestin, alors que chez les carnivores terrestres, il se distingue, précisément, par sa brièveté. Cette particularité de la structure des pinnipèdes peut être mise en corrélation avec deux conditions de leur existence :

- la vie dans l'eau, souvent très froide, d'où nécessité, pour le tube digestif (le corps ne pouvant pas être protégé par la fourrure), de fournir une grande quantité de nutriments pour la production du sang et de la graisse ;
- tandis que les carnivores terrestres assimilent principalement des proies vertébrés, les pinnipèdes se nourrissent d'invertébrés aquatiques et avalent inévitablement une grande quantité de phytoplancton, or, en principe, un long intestin correspond, chez les mammifères, à une nourriture végétale.

Le caecum et le rectum sont très courts chez les pinnipèdes.

Le foie multilobé est pourvu d'une vésicule biliaire.

La nourriture, très aqueuse, dispense les pinnipèdes de boire. Le phoque ne boit pas d'eau de mer et est dépendant de l'eau contenue dans sa nourriture et de l'eau métabolique (Frechkop, 1955 ; Robineau, 2004).

1.2.1.2.4 Appareil respiratoire

Les narines des pinnipèdes sont placées en position normale, à l'extrémité du museau. Le larynx comporte les mêmes cartilages que chez les mammifères terrestres ; des cordes vocales sont présentes.

L'appareil respiratoire, bien qu'adapté à l'inspiration irrégulière, interrompue par des intervalles relativement longs (5 à 20 minutes), ne présente aucune particularité anatomique notable, sauf la longueur et, par conséquent, le volume des poumons, plus grand que chez les carnivores terrestres à taille comparable. La position du diaphragme diffère par son inclinaison : au lieu d'être orienté plus ou moins verticalement, le diaphragme des pinnipèdes descend obliquement de la colonne vertébrale vers le sternum, en avant. Chaque poumon comporte en général trois lobes principaux : deux grands lobes (antérieur et postérieur) et un petit lobe médian ; le poumon droit présentant en outre un petit lobe intermédiaire (Frechkop, 1955 ; Robineau, 2004).

1.2.1.2.5 Appareil circulatoire

Le cœur, plus large et plus aplati que chez les mammifères terrestres, peut s'adapter aisément à la diminution de volume de la cage thoracique lors de la plongée. Le *foramen ovale* du septum inter-atrial se ferme plus tard (5 à 6 semaines après la naissance) que chez les mammifères terrestres. La crosse aortique apparaît dilatée en forme de bulbe. Un *ductus arteriosus* la relie au tronc pulmonaire pendant les 6 premières semaines. C'est au niveau veineux que s'observent les principaux dispositifs adaptatifs en rapport avec la plongée. On note la présence de nombreux plexus veineux anastomotiques qui mettent en relation presque toutes les parties du système veineux. Le dispositif veineux le plus remarquable est constitué par la grande dilatation, au-dessous du diaphragme, des veines hépatiques qui reçoivent le sang de la veine cave postérieure et le transmettent à sa partie antérieure, pourvue, au niveau du diaphragme, d'un sphincter musculaire réglant le flux sanguin. Ce « sinus hépatique » occupe un espace aussi grand que le foie. On trouve dans les nageoires, de même que chez les cétacés, des *retia mirabilia* extrêmement développés, surtout chez les *Phocidae* (Robineau, 2004).

1.2.1.2.6 Appareil génital

1.2.1.2.6.1 Appareil génital mâle

La prostate est présente. Le pénis se trouve habituellement en position rétractée dans une poche cutanée dont l'ouverture, sur la ligne médiane ventrale, se situe entre l'anus et l'ombilic. Il est soutenu par un os pénien provenant de l'ossification de la partie antérieure du corps caverneux, qui atteint son plein développement à la puberté. Les testicules occupent chez les phoques et le morse une position inguinale et se situent ventro-latéralement par rapport au pelvis. Bien que placés à l'extérieur des muscles abdominaux, aucune protubérance ne signale leur présence à la surface du corps (Robineau, 2004).

1.2.1.2.6.2 Appareil génital femelle

L'ovaire est enclos dans une volumineuse capsule ovarienne (formée par deux replis du péritoine) dans laquelle pénètre la trompe de Fallope. La surface est lisse, ni les follicules, ni les corps jaunes ne se voient de l'extérieur, toute la périphérie de l'organe est revêtue d'un épithélium germinatif qui, par endroits, s'enfonce dans l'albuginée, formant des cryptes plus ou moins profondes. Ces formations faciliteraient la rupture des follicules que la grande épaisseur de l'albuginée rend malaisée. Pendant la gestation, on trouve un unique corps jaune, sur un seul des deux ovaires. Il régressera, mais subsistera sous forme de cicatrice (*corpus albicans*). De même que chez les carnivores terrestres, l'utérus est bicorne et le placenta est zonaire. Le vestibule du vagin s'ouvre, juste en avant de l'anus, dans un sillon commun avec ce dernier. Les mamelles, au nombre d'une ou deux paires, sont abdominales. Après la lactation, les tétines s'enfoncent dans une dépression profonde, dont l'ouverture, masquée par les poils, est difficile à localiser (Frechkop, 1955 ; Robineau, 2004).

1.2.1.2.7 Appareil urinaire

Les reins sont réticulés, c'est-à-dire constitués de petites unités (rénicules) formant chacune un rein miniature, dont le nombre varie selon les espèces de 100 à 300 environ.

La pression osmotique du sang et de l'urine est légèrement plus forte que chez les mammifères terrestres. Il ne semble pas que les pinnipèdes présentent une modification importante de leur milieu interne. Pendant la plongée, l'activité rénale reste au même niveau (Frechkop, 1955 ; Robineau, 2004).

1.2.1.2.8 Système nerveux et organes des sens

1.2.1.2.8.1 Encéphale

Le système nerveux central des pinnipèdes se caractérise par un cerveau volumineux, globuleux et pourvu de nombreuses circonvolutions sur les hémisphères. Les lobes olfactifs réduits rapprochent, d'autre part, le cerveau des pinnipèdes de celui des primates diurnes ; l'aire auditive est bien développée. Le cerveau des pinnipèdes se distingue par le

développement particulièrement important de l'appareil moteur central, dont dépendent les mouvements réflexes. De plus, les centres subcorticaux, qui perçoivent et réagissent aux excitations optiques, acoustiques et aux informations de pesanteur et de contact, sont considérablement plus développés que les centres corticaux (Frechkop, 1955).

1.2.1.2.8.2 *Organes des sens*

Les yeux, les oreilles et le nez sont situés le plus haut possible sur la tête, ce qui facilite leur utilisation. Le phoque peut ainsi voir, entendre et respirer sans sortir complètement sa tête de l'eau.

1.2.1.2.8.2.1 *La vue*

L'environnement marin étant peu lumineux, la vue dans ces conditions a dû subir des adaptations : la rétine est épaisse et l'organisation interne de l'œil permet d'augmenter la sensibilité à la lumière. Les orbites de grande taille offrent un champ de vision considérable, très utile, étant donné que le phoque évolue dans un milieu à trois dimensions. Les yeux n'ont pas une forte convexité externe et sont orientés en avant et en haut, nettement visibles chez les phoques, qui capturent volontiers leurs proies par en dessous. De même que chez les loutres et les cétacés, l'œil est pourvu d'un muscle palpébral. L'épithélium de la cornée, fortement kératinisé, protège efficacement l'œil (Frechkop, 1955 ; Marion et Sylvestre, 1993 ; Robineau, 2004).

1.2.1.2.8.2.2 *L'ouïe*

Les sons interviennent surtout dans la communication entre les individus. Les femelles utilisent différentes vocalises pour appeler leur petit ou faire fuir un intrus. Facilitant l'hydrodynamisme, les oreilles externes des phoques et du morse sont réduites à de petits rabats protecteurs qui restent clos grâce à la pression pendant la plongée, il ne reste qu'un petit pavillon chez les otaries. Les muscles de l'oreille sont transformés en un sphincter obturant l'entrée de l'oreille pendant la submersion (Frechkop, 1955 ; Marion et Sylvestre, 1993 ; de Beaulieu *et al.*, 1994).

1.2.1.2.8.2.3 *L'odorat*

L'olfaction ne sert qu'à terre, en effet, les narines sont fermées lorsque le phoque plonge. Elle est utile dans la reconnaissance mère-jeune et pour la reconnaissance d'une femelle disponible par un mâle (Frechkop, 1955 ; Marion et Sylvestre, 1993).

1.2.1.2.8.2.4 *Les vibrisses*

Les vibrisses, épaisses et rigides, présentes au-dessus des yeux, sous le museau et sur les joues sont très développées et permettent la détection tactile. On en retrouve 400 chez le morse et 100 à 200 chez le phoque veau-marin. Elles sont plus longues et plus nombreuses que chez les mammifères terrestres et possèdent plus de terminaisons nerveuses. Elles ont un rôle dans la recherche du poisson, surtout en eau trouble, où la vue ne suffit pas, mais également dans la reconnaissance mère-jeune et les rapports entre mâles concurrents (Frechkop, 1955 ; Marion et Sylvestre, 1993).

1.2.2 Biologie, écologie et rapports avec l'Homme

1.2.2.1 Habitat et répartition

Les pinnipèdes ne se sont pas totalement affranchis du milieu terrestre. Ils restent tributaires des rivages et des glaces de mer sur lesquels ils doivent revenir pour se reproduire. Leurs aires de répartition se présentent donc sous forme de bandes plus ou moins larges suivant le contour des côtes ou de la banquise, mais peuvent parfois, si l'on tient compte des aires d'alimentation, s'étendre à des régions notables de mers ou d'océans. Les phoques offrent une large répartition : on les retrouve dans tous les océans. Suivant les espèces, l'aire de répartition est plus ou moins étendue. Si l'on s'intéresse à l'importance numérique des populations, on se rend compte que la plupart des espèces, et celles qui comptent le plus grand nombre d'individus, fréquentent les eaux froides des deux hémisphères. L'abondance de la nourriture expliquerait la prédominance des pinnipèdes dans ces eaux (Robineau, 2004).

1.2.2.2 Reproduction et croissance

La puberté est atteinte à des âges différents : de 2 à 6 ans selon les espèces. Chez les mâles, il faut distinguer la maturité sexuelle purement physiologique, caractérisée par la production de spermatozoïdes, de la maturité sexuelle effective, atteinte seulement lorsque le mâle peut exercer sa dominance sur des mâles plus jeunes ou moins forts que lui et sur des femelles.

Une différence majeure existe par rapport aux cétacés : les cétacés se reproduisent totalement dans l'eau, tandis que les pinnipèdes doivent impérativement revenir à terre pour donner naissance à leur petit et l'allaiter. Cette obligation constitue une des contraintes les plus fortes de leur vie en mer. À noter que la femelle peut différer un peu le moment de la naissance, jusqu'à ce qu'elle touche terre pour mettre bas.

Les phoques se rassemblent sur des zones qui leur assurent une tranquillité totale durant les quelques semaines que dure la saison de reproduction. Durant ces périodes, ils deviennent momentanément incapables de se nourrir.

La naissance d'un jeune phoque est un processus rapide (en général, moins de 15 minutes), facilité par la forme hydrodynamique du corps et la réduction des membres. De taille relativement grande par rapport à sa mère, le nouveau-né sort la tête la première ou en sens inverse. La plupart des phoques ont des périodes d'allaitement relativement courtes (trois semaines pour le phoque gris, mais seulement une petite semaine pour le phoque du Groenland), ce qui diminue la période de vulnérabilité et de jeûne que constitue ce séjour à terre. Le lait des pinnipèdes est d'une extrême richesse en matières grasses et protéines. L'accroissement notable du poids des nouveau-nés se réduit pour l'essentiel, à un transfert de lipides entre le lait maternel et leur pannicule adipeux. L'allaitement est vraiment un système de vases communicants : chez le phoque gris, la femelle perd chaque jour 4 kg alors que le jeune en prend 2. La séquence de développement des principaux tissus est : graisse/os/muscle chez les pinnipèdes au lieu de os/muscle/graisse chez les autres mammifères.

À la naissance, le pinnipède se trouve dans un état physiologiquement et anatomiquement très avancé, revêtu d'une toison épaisse et laineuse (poils de bourre), toute différente du rude pelage de l'adulte ; elle s'imbibe facilement d'eau et rend la nage difficile. Le jeune mue quelques semaines après sa naissance, juste avant d'entrer dans l'eau. Chez quelques espèces, dont le phoque veau-marin, la toison laineuse tombe *in utero*, un peu avant la parturition, elle est rejetée avec la délivrance. Le nouveau-né possède alors un pelage du type adulte et va à l'eau très peu de temps après sa naissance. En général, le petit quitte sa mère peu de temps après le sevrage, l'important stock de graisse lui permettant de subsister en attendant qu'il puisse se procurer de la nourriture.

Avant que les regroupements d'animaux reproducteurs se dispersent en mer à la recherche de nourriture, les femelles deviennent réceptives et les accouplements ont lieu. Que la femelle venant de mettre bas soit réceptive s'explique par la structure bicorne de l'utérus. Les deux cornes fonctionnent alternativement : l'une n'a pas terminé son involution post-partum, mais l'autre est prête à une nouvelle gestation, du fait de l'œstrus et de l'ovulation de l'ovaire situé de son côté. Un adulte qui arriverait après cette période ne trouverait tout simplement pas de partenaire pour se reproduire.

Chez tous les phoques, l'implantation différée de l'embryon permet de rallonger la période de gestation apparente ; les naissances ont ainsi toujours lieu à la même saison. Après la fécondation, qui suit immédiatement l'accouplement, l'œuf subit un petit nombre de divisions. Cet embryon arrête alors son développement à ce stade très précoce (blastocyste), demeure inactif dans la lumière utérine et ne se fixera sur la paroi de l'utérus que quelques semaines à quelques mois plus tard.

Cette originalité de développement du fœtus est partagée par tous les pinnipèdes mais n'existe pas chez les cétacés. En effet, ces derniers n'ont pas besoin de retourner à terre pour aucune des phases de la reproduction. De ce fait, naissances et accouplements ne sont pas nécessairement rapprochés dans le temps.

La longévité varie selon les espèces : elle est d'une vingtaine d'années chez les phoques, certains individus pouvant cependant aller au-delà de 40 ans (Frechkop, 1955 ; de Beaulieu *et al.*, 1994 ; Robineau, 2004).

1.2.2.3 Alimentation

Si les pinnipèdes se nourrissent surtout de poissons, beaucoup d'espèces ajoutent à leur régime des mollusques (céphalopodes particulièrement), crustacés, voire oiseaux et mammifères (le morse et le léopard de mer peuvent se nourrir de phoques). La plupart capturent leurs proies sous l'eau, d'autres vont les chercher sur le fond. Les pinnipèdes ne se cantonnent généralement pas à un seul type de nourriture et peuvent à l'occasion changer de régime alimentaire, lequel peut aussi varier de manière saisonnière, selon la disponibilité des ressources. Il se modifie aussi selon l'âge, le régime des juvéniles différant souvent par rapport à celui des animaux plus âgés (Frechkop, 1955 ; Robineau, 2004).

1.2.2.4 Adaptations cardio-respiratoires à la plongée

Les phoques sont des mammifères et doivent donc remonter en surface pour respirer. Néanmoins, la plongée est nécessaire pour la recherche de nourriture, pour fuir un prédateur ou explorer le milieu. Ainsi, le phoque gris peut descendre jusqu'à 268 m de profondeur et rester pendant 32 minutes sous l'eau.

Ces performances sont dues à des spécificités anatomiques respiratoires permettant de faire face à l'augmentation de pression avec la profondeur (anneaux trachéaux complets). De plus, les phoques expirent avant (contrairement aux cétacés qui inspirent avant de plonger) et pendant la plongée, permettant de diminuer au maximum l'air dans les poumons et d'éviter la formation de bulles de gaz d'azote nuisibles. Les narines ont acquis la forme de fentes plus ou moins verticales ; l'état d'occlusion indispensable lors de la plongée est devenu, pour ainsi dire, normal et un effort musculaire est nécessaire pour qu'ils puissent ouvrir les narines afin d'aspirer l'air.

Les phoques connaissent une évolution des critères hématologiques par rapport aux mammifères terrestres : leur volume sanguin représente 12 à 15 % du poids vif et leur hémoglobinémie s'élève de 15 à 26 g/dL. Le dioxygène est stocké pour l'essentiel dans le sang (70 %) et dans les muscles (25 %), mais très peu dans les poumons.

Lors d'une plongée, les phoques ralentissent leur rythme cardiaque, qui passe de 100 battements par minute à 10. L'électrocardiogramme montre que la forme de la contraction demeure normale, seul le rythme est touché. La pression de l'artère fémorale ne subit aucune diminution en dépit de la bradycardie accentuée ; les contractions cardiaques ne perdent rien en puissance. Une vasoconstriction intense périphérique se produit pendant l'immersion : l'artère d'un orteil s'oblitére pendant la plongée, les calibres des vaisseaux mésentériques diminuent aussi beaucoup. La circulation ne change pas dans le cerveau et dans le cœur, ce qui explique que les pinnipèdes conservent dans l'eau toute leur agilité. La contraction du sphincter de la veine cave antérieure intervient certainement pour maintenir en réserve, dans le « sinus hépatique », le sang oxygéné. Les *retia mirabilia* jouent probablement un rôle dans le blocage temporaire du sang. L'accumulation du CO₂ dans le sang est bien tolérée, ce qui indique le peu de sensibilité des centres régulateurs de la respiration et du cœur des pinnipèdes à la teneur en anhydride carbonique. Le sang possède également un pouvoir oxyphérique très élevé (quantité maximale de dioxygène que peut fixer l'hémoglobine du sang) : 100 cm³ de sang renferment de 30 à 35 cm³ d'O₂ chez le phoque et seulement 20 cm³ chez l'Homme.

Le ralentissement du torrent circulatoire, accompagné de l'accumulation dans le sang de métabolites tels que l'acide lactique et de la diminution de dioxygène a pour effet d'abaisser le métabolisme. En plongée, la consommation du sang en dioxygène n'atteint que 1/5^{ème} de la valeur normale. Dans ces conditions, la quantité d'oxygène dont l'animal dispose au moment de l'immersion lui permet de rester sous l'eau pendant 15 minutes environ (30 minutes au maximum). Au total, il semble que la durée de la plongée soit directement en relation avec la bradycardie et avec la réduction du torrent circulatoire aux seuls viscères de première nécessité (Frechkop, 1955 ; Marion et Sylvestre, 1993).

1.2.2.5 Prédateurs

Les principaux prédateurs des pinnipèdes sont les grands requins, l'orque et, dans les régions arctiques, l'ours blanc et le loup. Le morse, plusieurs espèces de lions de mer et le léopard de mer se nourrissent volontiers d'espèces de pinnipèdes de moindre taille.

Mais le plus redoutable des prédateurs est l'Homme. Son impact sur les pinnipèdes est ancien ; il a été cependant limité tant que la chasse est restée une activité de subsistance pour des populations locales (pour les Inuits, les phoques constituent la ressource essentielle de nourriture et de vêtement). Au cours du XVII^{ème} siècle s'est progressivement développée la chasse commerciale moderne et de nombreuses espèces ont dès lors été chassées seulement pour leur graisse et/ou leur peau. Les otaries ont été longtemps chassées pour le commerce de la fourrure. La plupart de ces espèces, y compris celles qui étaient parvenues au bord de l'extinction, ont cependant remonté la pente de façon très spectaculaire. Deux espèces ont néanmoins disparu et trois autres sont en danger d'extinction, principalement du fait des activités humaines, parmi lesquelles la chasse commerciale ne joue le plus souvent qu'un rôle restreint.

Pour ce qui est de la faune de France, on doit faire état de la disparition, sans espoir de retour, du phoque moine de nos côtes méditerranéennes, mais en contrepartie, noter la réapparition du phoque gris sur les côtes de Bretagne et la reconstitution de la colonie permanente de phoques veau-marin dans la baie de Somme (Robineau, 2004).

1.2.3 Monographies

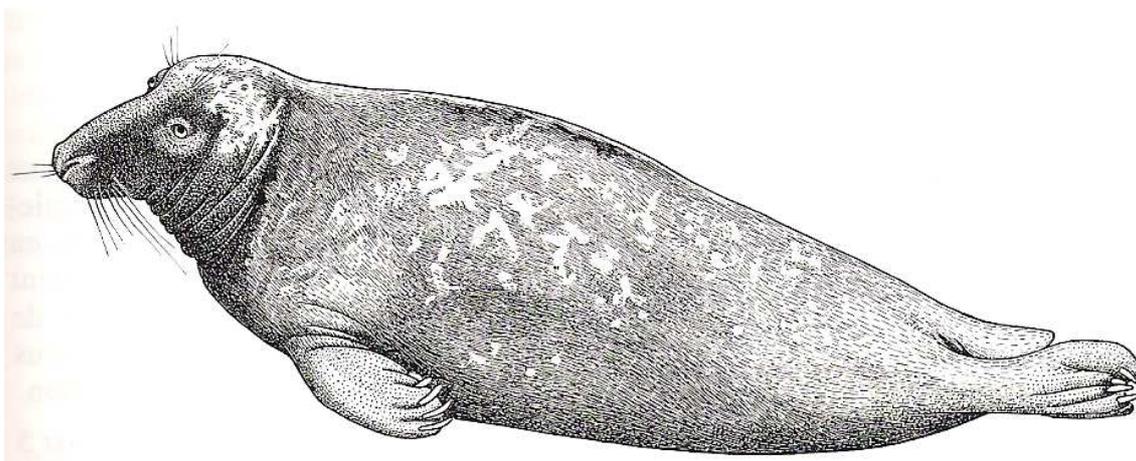
La famille des *Phocidae* est caractérisée par l'absence d'oreilles internes, des pattes postérieures toujours tournées vers l'arrière et un déplacement à terre par ondulation du corps. Cette famille est subdivisée en 4 sous-familles distribuées géographiquement de la manière suivante : les *Phocinae* (phoque veau-marin, phoque annelé, phoque du Groenland, phoque à ruban, phoque gris, phoque barbu) se rencontrent dans les eaux froides ou tempérées de l'hémisphère nord ; les *Lobodontinae* (phoque crabier, phoque léopard, phoque de Ross et phoque de Weddell) sont exclusivement antarctiques, les *Monachinae* (phoque moine) n'existent que dans la zone tropicale et subtropicale des deux hémisphères ; les *Cystophorinae* sont représentés par un genre arctique (phoque à capuchon) et un genre antarctique (Éléphant de mer). On trouve les plus gros effectifs de phoques autour des pôles (phoque crabier -Sud- et phoque annelé -Nord-) (Frechkop, 1955; Marion et Sylvestre, 1993).

Les espèces que l'on retrouve sur les côtes françaises appartiennent à la sous-famille des *Phocinae*.

1.2.3.1 Le phoque gris (*Halichoerus grypus* Fabricius, 1791)

Le phoque gris *Halichoerus grypus* est le seul représentant du genre *Halichoerus*, qui signifie « cochon de mer ». *Grypus* vient du latin « qui a le nez crochu » (figure 21). Cette espèce ne comporte pas de sous-espèce (Marion et Sylvestre, 1993 ; Robineau, 2004).

Figure 21. *Halichoerus grypus*, mâle adulte (Robineau, 2004)

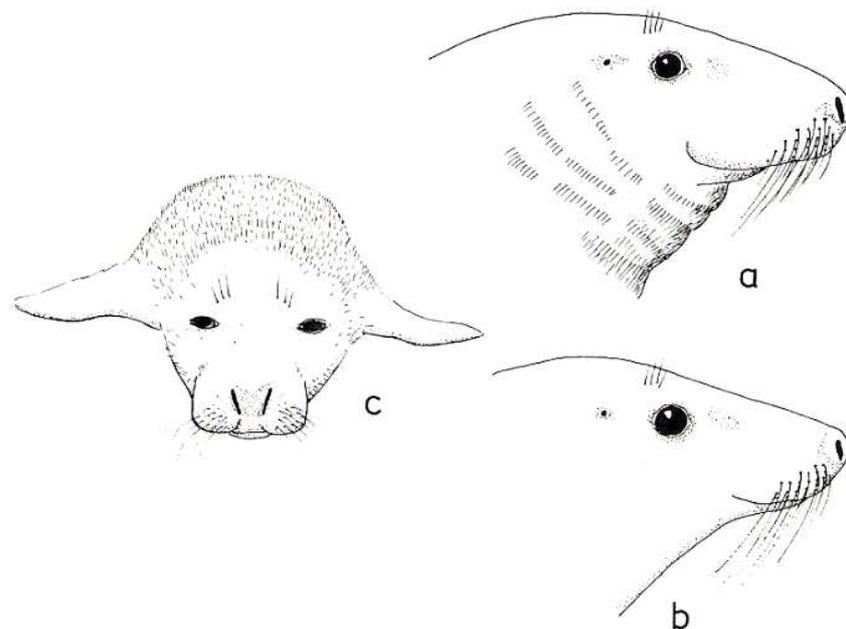


1.2.3.1.1 Description

C'est une des espèces les plus massives des *Phocinae*, caractérisée par un fort dimorphisme sexuel. Les mâles adultes mesurent en moyenne 1,95 à 2,30 m pour une masse corporelle de 170 à 310 kg alors que les femelles adultes font généralement entre 1,65 et 1,95 m et pèsent de 105 à 185 kg. (Le poids des femelles varie énormément entre le début et la fin de l'allaitement.) La longévité peut atteindre 35 ans chez les femelles et une vingtaine d'années chez les mâles.

Les mâles adultes, massifs, ont un museau allongé et large caractéristique. Ils possèdent des plis cutanés sur le cou, souvent recouverts de cicatrices, vestiges de blessures occasionnées lors des affrontements entre mâles. Les femelles ont un museau plus fin et leur tête apparaît plus plate vue de profil (figure 22). Les narines parallèles du phoque gris le distinguent du phoque veau-marin chez qui elles sont en V et jointives à la base (figure 25). De longues vibrisses ornent de chaque côté le museau ; quelques unes, plus courtes, s'implantent au dessus des yeux. Le trou auditif, bien visible, est parfois muni d'un petit pavillon. Le pelage du phoque gris adulte est ras sur l'ensemble du corps ; son aspect diffère chez les mâles et les femelles et également beaucoup selon les individus. Les mâles sont de couleur gris sombre uniforme, orné seulement de quelques taches claires, de taille et de forme variables. Le pelage des femelles est gris clair et parsemé de taches sombres plus ou moins nombreuses. Dans les deux sexes, la coloration en face ventrale est d'une nuance plus claire que celle du reste du corps. Les juvéniles (jeunes de 1 à 3 ans) sont fauves, un peu plus foncés sur le dos et sans taches (Marion et Sylvestre, 1993 ; Robineau, 2004).

Figure 22. Profils d'un phoque gris mâle adulte (a) et d'une femelle adulte (b) ; vue de face d'un nouveau-né (c) (Ridgway et Harrison, 1981)



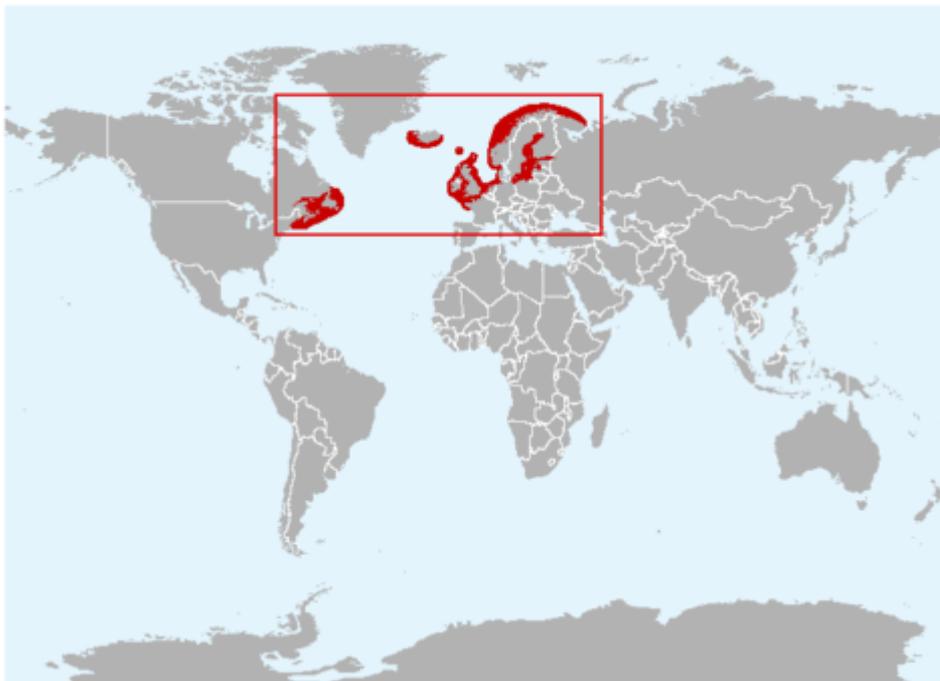
1.2.3.1.2 Habitat et répartition

Le milieu terrestre est indispensable pour la mue et la reproduction (mise-bas et allaitement, quelque fois accouplement également). Les habitats fréquentés habituellement par le phoque gris sont les côtes rocheuses, bordées de falaises, avec quelques petites plages. Les sites de reproduction privilégiés sont généralement des îles à quelque distance de la côte. Les aires de reproduction sont rarement utilisées en dehors de la période de reproduction. Le phoque gris fréquente alors des sites de repos, le plus souvent des îlots baignés par des forts courants ou des bancs de sable.

Le phoque gris est présent exclusivement dans l'hémisphère Nord. Trois populations isolées géographiquement et biologiquement (les saisons de reproduction sont différentes) se trouvent respectivement dans l'Atlantique du nord-ouest (autour de Terre-Neuve et sur la côte orientale du Canada), l'Atlantique du nord-est (de la Bretagne à l'Islande en passant par les îles Féroé et les côtes de Norvège) et la mer Baltique. Les effectifs sont estimés à plus de 155 000 phoques gris en Atlantique nord-est et autant en Atlantique nord-ouest. La population est surtout nombreuse sur les côtes des îles Britanniques : en Écosse, à l'est et au sud-ouest de la Grande Bretagne et en Irlande (figure 23).

La France correspond à la limite sud de l'aire de répartition dans l'Atlantique du nord-est. Le site le plus important correspond à l'archipel de Molène-Ouessant, avec 120 phoques gris et en moyenne 25 naissances par an. Le deuxième site fréquenté est celui de l'archipel des Sept-Iles. En dehors de ces colonies, on ne rencontre que quelques individus le long du littoral. L'espèce, rare en Manche, est un peu plus fréquente sur la façade atlantique (Marion et Sylvestre, 1993 ; Robineau, 2004).

Figure 23. Répartition de *Halichoerus grypus* (Society for Marine Mammalogy, 2012)



1.2.3.1.3 Reproduction et croissance

Les phoques gris se reproduisent une fois par an. L'espèce montre un comportement grégaire qui s'accompagne, pendant la période de reproduction, d'une organisation sociale hiérarchique liée à la polygamie. Le rassemblement des animaux commence un mois environ avant la date des naissances et les mâles cherchent à occuper des places pour l'accouplement. Les femelles gravides sont à l'origine de la formation des colonies (car ce sont elles qui sélectionnent le site). Au sein de la colonie, leur nombre est toujours supérieur à celui des mâles.

Les femelles sont matures aux environs de 3 à 6 ans, les mâles sont plus tardifs (7 à 12 ans), mais ils ne se reproduisent que vers 10 ans, car la capacité d'un individu à tenir un harem (une dizaine de femelles) et obtenir un territoire dépend de critères de poids et de taille. Les mâles peuvent fréquenter les colonies de reproduction pendant près de 10 ans et les femelles peuvent se reproduire pendant plus de 30 ans.

La saison de reproduction varie suivant la localisation géographique. Dans les colonies du sud-ouest de l'Angleterre, elle se situe entre la fin août et la fin novembre, tandis qu'en Baltique elle se déroule de la mi-février à la fin mars.

Les femelles donnent naissance à un seul petit par an, appelé blanchon car il porte un pelage soyeux et blanc, le lanugo. Il pèse environ 15 kg et mesure de 90 cm à 1,05 m. Au bout de 2 à 3 semaines, le petit perdra son pelage qui sera remplacé par un poil ras. L'allaitement a lieu à terre et dure 3 semaines environ. Le lait maternel est très riche (52 % de matières grasses) ce qui permet une prise de poids rapide (environ 2 kg/j) pour atteindre 45 kg lors du sevrage. Le jeune se nourrit environ 6 minutes toutes les 5 à 6 heures.

Une quinzaine de jours après le début de l'allaitement, les femelles entrent en œstrus et s'accouplent. L'accouplement peut se dérouler dans l'eau ou hors de l'eau. Elles restent encore quelques jours en compagnie de leur petit, puis mettent fin brutalement à l'allaitement et quittent le site de reproduction. Le jeune, qui vit sur ses réserves pendant 10 à 28 jours, doit ensuite apprendre seul la vie en mer pour reconstituer en priorité ses réserves protéiques. Cette période est critique, en effet 50 % des individus meurent avant l'âge d'un an.

Comme pour toutes les espèces de pinnipèdes, l'implantation est différée et la croissance de l'embryon ne démarre réellement que trois à quatre mois après l'accouplement et pendant la mue des femelles (qui se déroule de janvier à mars pour les femelles et de mars à mai pour les mâles). La gestation apparente est de 11,25 mois en moyenne, mais la gestation réelle n'est finalement que de 8 mois (Marion et Sylvestre, 1993 ; Robineau, 2004).

1.2.3.1.4 Alimentation

Le phoque gris se nourrit dans la zone côtière, d'une grande variété de poissons. Saumon, morue et hareng sont les trois espèces les plus couramment prélevées. En complément, il se nourrit également de quelques crustacés et mollusques (notamment des calmars et des poulpes). Ce régime alimentaire varie selon la région et la saison ; il dépend de l'abondance locale et saisonnière des proies. La plupart des plongées (profondeur moyenne de 25 m environ et profondeur maximale de 100 m) atteignent le fond, ce qui suggère une nourriture benthique. La quantité ingérée varie en fonction de l'année : les périodes de mue et de reproduction correspondent à un jeûne, ce qui fait que les phoques se nourrissent environ pendant les $\frac{3}{4}$ de l'année. La quantité journalière de poisson est de 5 kg par individu en moyenne sur une année, périodes de jeûne incluses (Marion et Sylvestre, 1993 ; Robineau, 2004).

1.2.3.1.5 Organisation sociale, comportement et activités

Le comportement est mal connu en dehors de la reproduction et de la mue, mais le pistage d'individus munis d'un émetteur radio a révélé de grandes différences de comportement : certains individus séjournent pendant des semaines dans des zones de superficie réduite (20 à 50 km de rayon), d'autres se déplacent sur de grandes distances. La recherche de nourriture occupe vraisemblablement une grande partie du temps passé en mer.

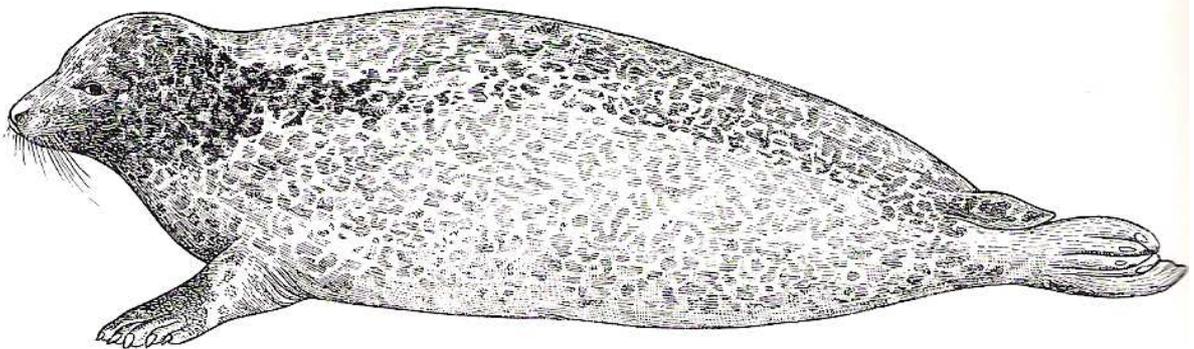
La pose de balises Argos sur 18 phoques par Océanopolis (Brest, 29) entre 1997 et 2001 a permis d'étudier les migrations de l'espèce et de mettre en évidence une incroyable capacité des jeunes à se déplacer rapidement et loin (ils peuvent parcourir des centaines de kilomètres à partir de leur lieu de naissance). L'apparente existence de déplacements importants laisse supposer que des échanges entre populations différentes s'opèrent et que les phoques gris sont parfois en contact avec des phoques d'espèces différentes également (Robineau, 2004).

Au moment de la reproduction, les phoques gris se rassemblent en groupes sociaux de taille variable, nommés colonies. La composition de la colonie est en perpétuel changement car l'arrivée des femelles gravides et le départ des femelles fécondées sont échelonnés ; par ailleurs, la durée du séjour des mâles est très variable. Au sein de la colonie, le comportement le plus fréquent est le repos qui permet de limiter les dépenses énergétiques. Les comportements sociaux se limitent d'une part aux interactions, essentiellement agressives, entre les adultes et d'autre part aux échanges entre les mères et les petits (ceux-ci n'interagissent pratiquement pas entre eux). Trois mois environ après la reproduction, les phoques gris rejoignent la terre ou la glace pour muer. Ces rassemblements de mue peuvent compter de quelques centaines à plus de 2000 individus. Au cours de cette période, les individus font de nombreux trajets entre terre et mer et, le plus souvent, jeûnent (Robineau, 2004).

1.2.3.2 Le phoque veau-marin (*Phoca vitulina* Linné, 1758)

L'espèce *Phoca vitulina*, du latin *phoca* (phoque) et de *vitulina* qui dérive de *vitulinus* formé à partir de *vitula* (veau) et du suffixe *inus* (comme), comprend cinq sous-espèces, qui se distinguent par la zone géographique dans laquelle elles vivent : trois se trouvent dans l'Atlantique nord et deux dans le Pacifique nord. En France, on rencontre la sous-espèce *Phoca vitulina vitulina* (figure 24) (Marion et Sylvestre, 1993 ; Robineau, 2004).

Figure 24. *Phoca vitulina* adulte (Robineau, 2004)

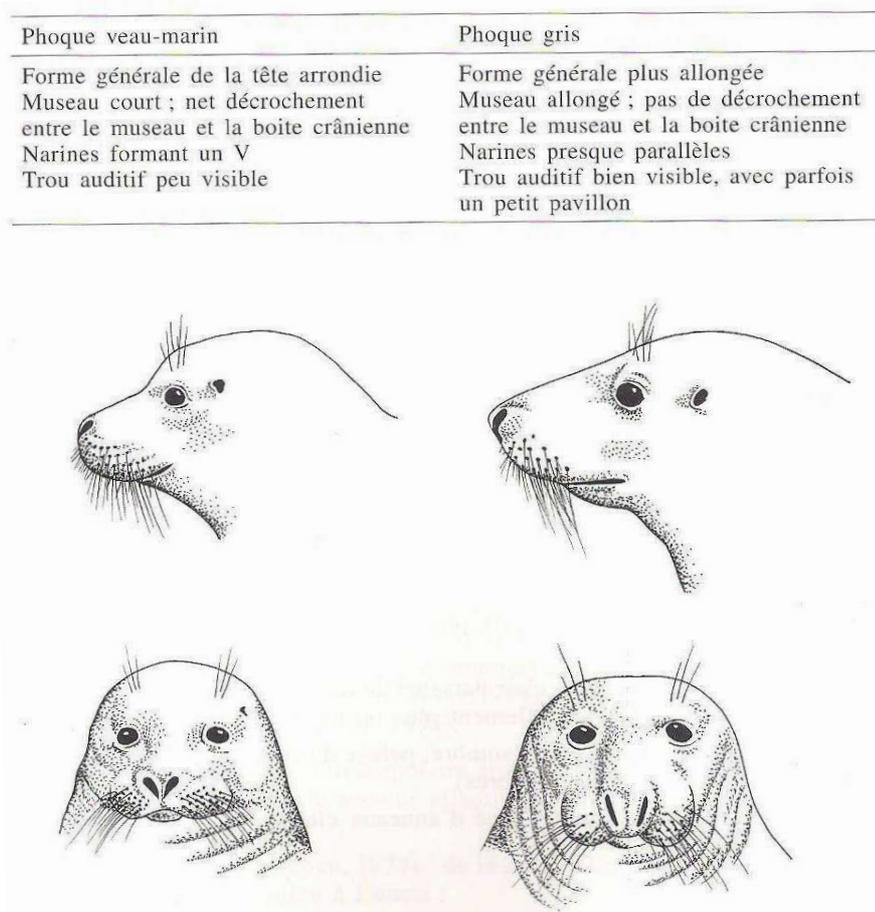


1.2.3.2.1 Description

Le phoque veau-marin est un petit phoque rond avec une tête large, des membres courts et des yeux rapprochés. Les mâles mesurent jusqu'à 1,90 m et pèsent 70 à 150 kg. Les femelles atteignent 1,70 m et peuvent peser de 60 à 110 kg. La longévité maximale serait de l'ordre de 25-30 ans. Contrairement au phoque gris, il existe peu de différences entre mâle et femelle. Le corps est dans l'ensemble plus trapu que celui du phoque gris. La brièveté du museau et la boîte crânienne sphérique confèrent à la tête une forme arrondie qui ressemble à celle d'un chat. Par ailleurs, un net décrochement sépare le museau de la boîte crânienne. Les narines se rejoignent presque ventralement et dessinent donc un V bien ouvert. L'orifice auditif, en forme de fente, est moins apparent que chez le phoque gris (figure 25). Les dents sont implantées en biais dans la mâchoire et sont toutes coniques. De longues vibrisses ornent le museau de chaque côté, d'autres s'implantent au-dessus et en arrière des yeux. La couleur du pelage est très variable suivant les individus. Il est gris dans l'ensemble avec de grands ocelles noirs irréguliers, plus nombreux sur le dos et sur les flancs, d'où un dos plus sombre que le ventre. La mue annuelle a lieu en été (principalement en juillet et en août) ; les femelles muent généralement avant les mâles et les immatures avant les adultes. Le renouvellement du pelage commence habituellement par le museau et la région caudale et s'étend ensuite au reste du corps. Durant la mue, qui dure de 3 à 4 semaines, les phoques restent le plus souvent à terre (Marion et Sylvestre, 1993 ; Robineau, 2004).



Figure 25. Morphologie de la tête du phoque veau-marin (à gauche) et du phoque gris (à droite) (Robineau, 2004)

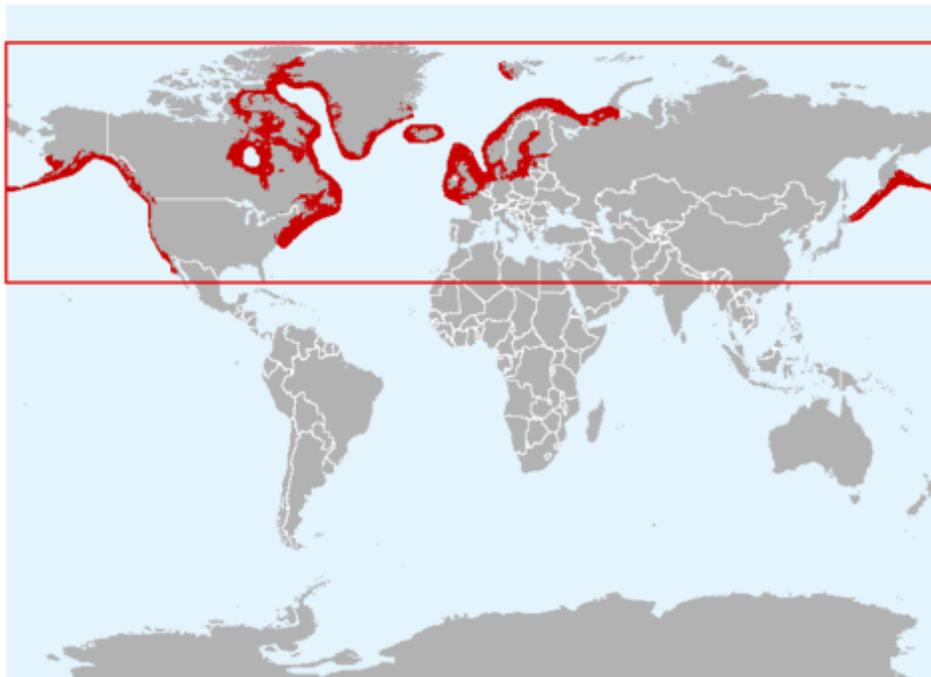


1.2.3.2 Habitat et répartition

Le phoque veau-marin est une espèce marine qui revient cependant à terre pour se reproduire, muer et se reposer : il quitte l'eau plus souvent que les autres phoques. Deux types d'habitats littoraux sont utilisés. Le long des côtes rocheuses, l'espèce fréquente le plus souvent des roches de la zone de balancement des marées abritées des eaux du large, mais parfois aussi des roches à fleur d'eau et des plages de galets. Le phoque veau-marin affectionne également les larges estuaires. Il se trouve plutôt dans l'eau à marée haute et se repose à terre quand la marée descendante découvre de grands bancs de sable, séparés par des chenaux suffisamment profonds.

Le phoque veau-marin est présent, comme le phoque gris, uniquement dans l'hémisphère nord. L'aire de répartition de la sous-espèce *Phoca vitulina vitulina* s'étend de la Norvège jusqu'aux côtes du Nord de la France, de l'Islande à la Mer Baltique. Les colonies les plus importantes se trouvent sur les côtes de la mer de Wadden et autour du Royaume-Uni. L'effectif mondial est estimé à 400 000 individus, dont 60 000 sur les côtes européennes. La plus grosse colonie est située en Angleterre, en baie de Wash. Elle compte plus de 5 000 individus. En France, la baie de Somme abrite la colonie la plus importante (100 phoques). Deux autres sites de reproduction sont identifiables : la Baie des Veys (50 phoques) et la Baie du Mont-Saint-Michel (50 phoques). Les autres sous-espèces se rencontrent dans l'Atlantique ouest, le Pacifique est et le Pacifique ouest (figure 26) (Marion et Sylvestre, 1993 ; Robineau, 2004).

Figure 26. Répartition du phoque veau-marin (Society for Marine Mammalogy, 2012)



1.2.3.2.3 Reproduction

Ils se reproduisent une seule fois par an et sont polygames, mais les mâles ne constituent pas de harem. Il semble vraisemblable que les mâles s'accouplent à quelques femelles et les femelles à quelques mâles. Les femelles atteignent leur maturité sexuelle entre 3 et 5 ans, elle a lieu entre 3 et 7 ans pour les mâles.

Pour *Phoca vitulina vitulina*, la saison des naissances a lieu entre juin et la mi-juillet et dure environ 4 semaines. Environ 85 à 92 % des femelles matures donnent naissance à un petit chaque année. Celui-ci, contrairement au phoque gris, naît avec un pelage comparable à celui des adultes. En effet, la première mue est intra-utérine. La mise-bas se fait habituellement à marée basse sur des bancs de sable ou des roches situés dans la zone de balancement des marées. Le nouveau-né doit donc être capable de nager prématurément et son pelage lui permet d'affronter l'eau quelques heures après la naissance en sachant tout de suite nager. À 2 ou 3 jours, il peut déjà plonger 2 minutes et à 10 jours, ses plongées peuvent atteindre 8 minutes. A 3 semaines, le petit se comporte dans l'eau presque comme un adulte. Le jeune pèse de 7 à 12 kg et mesure de 70 à 90 cm.

La mère reste très unie à son petit en mer et retourne régulièrement sur le sable pour l'allaitement qui peut également avoir lieu dans l'eau. Il dure 4 à 5 semaines, pendant lesquelles la femelle jeûne. Le petit tète environ une minute toutes les 3 à 4 heures. La croissance est rapide pendant la période d'allaitement, à l'issue de laquelle les petits peuvent avoir plus que doublé leur poids. Cette période est critique pour le jeune, en effet elle a lieu en été lorsque les plages sont fréquentées par les touristes et la mortalité est élevée (abondons). Il est conseillé de ne pas approcher les phoques à moins de 300 m.

Le sevrage a lieu brutalement. Le petit, revêtu d'un épais pannicule adipeux et d'une denture fonctionnelle est prêt à mener une existence indépendante. Il va cependant perdre du

poids après le sevrage jusqu'à ce qu'il soit capable de prélever des proies en quantités suffisantes, se nourrissant d'abord de crustacés, plus faciles à capturer que les poissons.

Les accouplements débutent vers le début de septembre, après la mue. Comme chez le phoque gris, l'implantation du blastocyste est retardée de deux à trois mois. Après l'implantation, la gestation dure de 7 à 8,5 mois (Marion et Sylvestre, 1993 ; Robineau, 2004).

1.2.3.2.4 Alimentation

C'est un chasseur opportuniste qui mange essentiellement du poisson : harengs, morues, saumons, mulets, truites, éperlans, cabillauds, chabots, poissons plats, mais également céphalopodes et crustacés. Au total, l'espèce semble surtout chasser les poissons vivants en bancs près du fond (ce qui limite les possibilités de fuite des proies) dans des eaux relativement peu profondes (ce qui minimise les dépenses énergétiques). La chasse a lieu durant le jour, mais le phoque veau-matin est capable de capturer des proies dans des eaux très turbides ou la nuit, grâce à ses nombreuses vibrisses qui semblent capables de détecter les vibrations émises par les proies. Il peut plonger jusqu'à 200 m et rester au maximum 30 minutes sans respirer, mais en moyenne, la durée des plongées d'un phoque qui chasse n'est que de quelques minutes.

Un adulte consomme en moyenne 2 kg de poissons par jour. L'eau provient à plus de 80 % des poissons qu'il ingère. Les jeunes sevrés se nourrissent essentiellement de crustacés (en particulier de crevettes grises) qu'ils trouvent sur le fond, jusqu'à leurs 3 mois. Ensuite, ils diversifient leur régime alimentaire, comme les adultes (Robineau, 2004).

1.2.3.2.5 Organisation sociale, comportement et activités

Le phoque veau-marin a tendance à être solitaire lorsqu'il est en mer, mais sur terre, il devient grégaire et forme des groupes de 2 à 125 individus. La taille des groupes, très variable, pourrait être en rapport avec la superficie des sites de repos ou des zones d'alimentation. Les groupes comprennent des individus des deux sexes et de tout âge, sans hiérarchie sociale. Les liens sociaux les plus étroits sont ceux qui unissent une mère et son petit jusqu'au sevrage. La composition des groupes varie peu au cours de l'année. Les groupes au repos sont difficiles à approcher car quelques individus (en général des phoques âgés) sont sur le qui-vive et alertent les autres. Le phoque veau-marin est une espèce plutôt sédentaire bien que d'importantes variations d'effectifs puissent être observées lors des dénombrements sur les reposoirs. Après le sevrage, les jeunes peuvent se déplacer sur de longues distances.

Cette espèce passe pour être la moins bruyante des pinnipèdes. Pourtant, les mâles « aboient » ou crient abondamment pendant les périodes de parades et utilisent de nombreuses autres sources sonores (grognements sous l'eau, claquements des nageoires et de la tête en surface, production de bulles, etc.). Les femelles et les jeunes utilisent également diverses vocalises qui leur permettent notamment de se reconnaître.

Comme d'autres espèces de phoques, le phoque veau-marin nage fréquemment sur le dos. Quand tous les reposoirs sont immergés, le phoque veau-marin peut, comme le phoque gris, dormir en immersion quelques minutes puis se laisser remonter pour respirer (Robineau, 2004).

2 Rappels sur les parasites étudiés : *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis* spp. et *Trichinella* spp.

Dans cette thèse, nous avons choisi de nous concentrer sur quatre parasites retrouvés chez diverses espèces de mammifères marins : les parasites *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* et *Sarcocystis* spp. sont des protozoaires, tandis que *Trichinella* spp. fait partie des helminthes.

2.1 Caractères généraux des protozoaires

Les **protozoaires** constituent un sous-règne des **protistes** (êtres unicellulaires eucaryotes), à paroi non cellulosique, souvent mobiles et à développement hétérotrophe.

Au niveau anatomique, les protozoaires possèdent la structure d'une cellule eucaryote, souvent complétée de divers organites locomoteurs (flagelles, cils, pseudopodes). Ils sont généralement microscopiques (2 à 250 µm le plus souvent).

La plupart des espèces de protozoaires mènent une vie libre et aquatique, dans des eaux douces ou marines, ou même dans des sols humides ; certains peuvent devenir des parasites occasionnels. D'autres sont des parasites obligatoires.

On reconnaît actuellement 7 embranchements de protistes « de type protozoaire », dont 5 intéressent la parasitologie vétérinaire.

Dans cette thèse, nous nous intéresserons à l'embranchement des **sporozoaires** ou **Apicomplexa**, tous parasites obligatoires, caractérisés par l'absence d'organites locomoteurs et par un complexe apical (à l'origine de la dénomination *Apicomplexa*) présent à certains stades, situé à l'extrémité antérieure et constituant apparemment un organe de pénétration dans une cellule-hôte (Bussiéras et Chermette, 1992).

Deux classes sont d'intérêt vétérinaire :

- les **coccidies**, le plus souvent parasites du tube digestif (*Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, *Besnoitia*, *Cryptosporidium*)
- les hématozoaires, parasites sanguins à transmission vectorielle (*Plasmodium*, *Babesia*, *Theileria*)

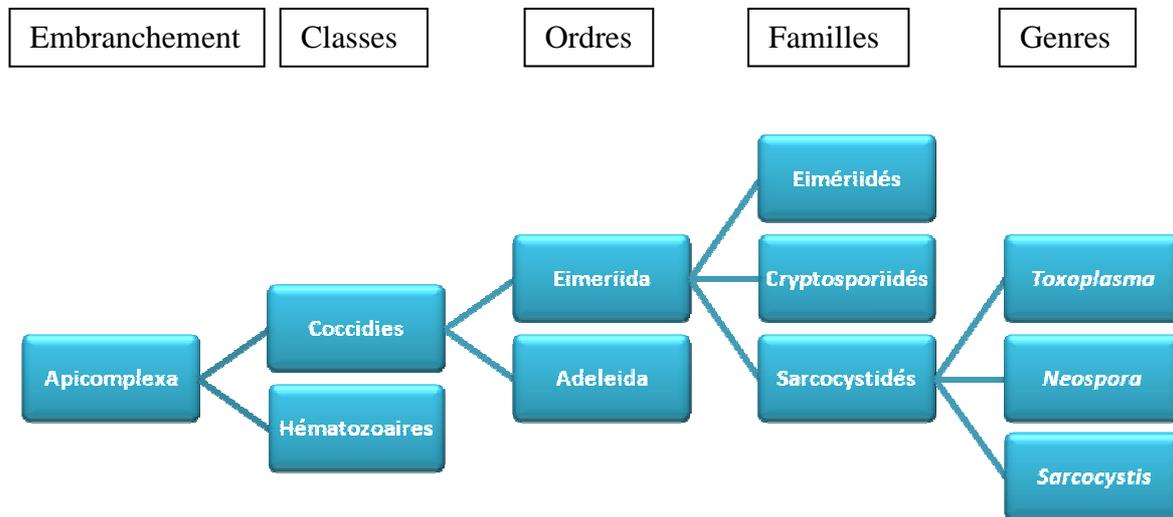
Les coccidies sont caractérisées, au cours de la reproduction sexuée, par la production d'œufs enkystés (oocystes). La reproduction asexuée est de type schizogonie et/ou endogénie. Le cycle peut être homo- ou hétéroxène.

Au sein des coccidies, on reconnaît deux ordres : l'ordre des **Eimeriida**, auquel nous nous intéressons ici et l'ordre des *Adeleida*.

L'ordre des *Eimeriida* comprend 3 familles principales : les Eimériidés et Cryptosporidiidés qui suivent un cycle homoxène et les **Sarcocystidés** qui suivent un cycle hétéroxène.

Au sein de la famille des Sarcocystidés, on distingue plusieurs genres : *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, *Besnoitia*, *Frenkelia* et *Hammondia* (figure 27).

Figure 27. Classification simplifiée des genres *Toxoplasma*, *Neospora* et *Sarcocystis* (d'après Bussiéras et Chermette, 1992)



2.2 *Toxoplasma gondii*

2.2.1 Importance de la toxoplasmose

La toxoplasmose est une maladie cosmopolite affectant pratiquement tous les Vertébrés à sang chaud, mammifères et Oiseaux, répartie mondialement. Elle est due au parasite *Toxoplasma gondii*, découvert sous sa forme tachyzoïte dans les tissus d'un rongeur (*Ctenodactylus gondii*), en Tunisie, par Nicolle et Manceaux en 1908 et simultanément au Brésil chez un lapin par Splendore en 1909.

En 1969, Work et Hutchison démontrent que le cycle évolutif passe par un hôte définitif (HD) : le chat (*Felis catus*) et les félidés sauvages (Bussiéras et Chermette, 1992).

La prévalence de la toxoplasmose est très variable selon les espèces ; elle est cependant toujours plus élevée chez le mouton (*Ovis ammon*), la chèvre (*Capra aegagrus*), le porc (*Sus scrofa domesticus*) (hôtes intermédiaires, HI) et chez le chat (HD) que chez les autres animaux domestiques : bovins (*Bos taurus taurus*), volailles, chiens (*Canis familiaris*) et chevaux (*Equus przewalskii*). Une enquête de surveillance de la prévalence de *T. gondii* chez les ovins consommés en France a été effectuée en 2007. La séroprévalence globale était de 24,3 %, avec une influence significative de l'âge. Des parasites vivants étaient présents dans 5,4 % des carcasses d'origine française (Halos *et al.*, 2010).

Les conséquences de la toxoplasmose en matière de santé publique sont très importantes puisque c'est une zoonose qui peut être à l'origine de troubles catastrophiques, notamment chez des fœtus ou de jeunes enfants (avortements, hydrocéphalie, cécité, retard mental, etc.), ainsi que lors d'immuno-d fici nce (Bussiéras et Chermette, 1992).

2.2.2 Présentation du parasite

Toxoplasma gondii est un protozoaire intracellulaire, appartenant à l'ordre des coccidies, seule espèce du genre *Toxoplasma*, et existant sous 3 formes infestantes : tachyzoïtes, forme de multiplication rapide dans les phases aiguës de l'infection ; bradyzoïtes au sein de kystes dans les tissus ; oocystes. Le cycle hétéroxène est facultatif dans cette espèce. Tous les homéothermes (mammifères et oiseaux) peuvent jouer le rôle d'hôtes intermédiaires (HI), mais seuls le chat et les félinés sauvages peuvent être les hôtes définitifs (HD) du parasite (AFSSA, 2005).

2.2.2.1 Les oocystes

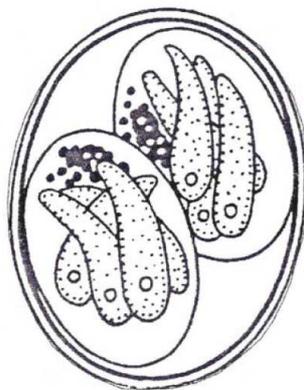
Les oocystes sont observables dans les excréments des HD (chats et autres félinés sauvages). Ce sont les zygotes enkystés issus de la reproduction sexuée du parasite.

De forme subsphérique, ils mesurent en moyenne 10 à 13 μm de diamètre. Après la fécondation, les oocystes non sporulés contiennent une masse unique, le sporoblaste. La sporogonie a lieu sur le sol, dans des conditions favorables (humidité, température), en 1 à 5 jours. Les oocystes deviennent matures, contiennent alors deux sporocystes, abritant chacun quatre sporozoïtes, éléments infectieux (figure 28).

Les oocystes sporulés peuvent rester quiescents pendant plus d'une année dans le sol avant d'infecter un nouvel hôte intermédiaire ou un féliné. Le fait que les chats domestiques aient tendance à déféquer dans des zones ombragées et à enterrer leurs matières fécales augmente les chances de survie des oocystes dans le sol.

Les oocystes sporulés sont inactivés par une température de 60 °C pendant 1 minute. Ils résistent en milieu très acide ($\text{pH} < 1$) et en milieu alcalin ($\text{pH} > 12$) (Bussiéras et Chermette, 1992 ; AFSSA, 2005).

Figure 28. Oocyste sporulé : deux sporocystes renfermant chacun quatre sporozoïtes (Euzéby, 1993)



2.2.2.2 Les tachyzoïtes

Le stade tachyzoïte est la forme libre proliférative infectieuse chez l'hôte intermédiaire ; on peut retrouver cette forme également chez le fœtus. Il se reproduit rapidement par un processus de multiplication asexuée (endodyogénie) chez l'HI qui constitue une forme de multiplication rapide du parasite.

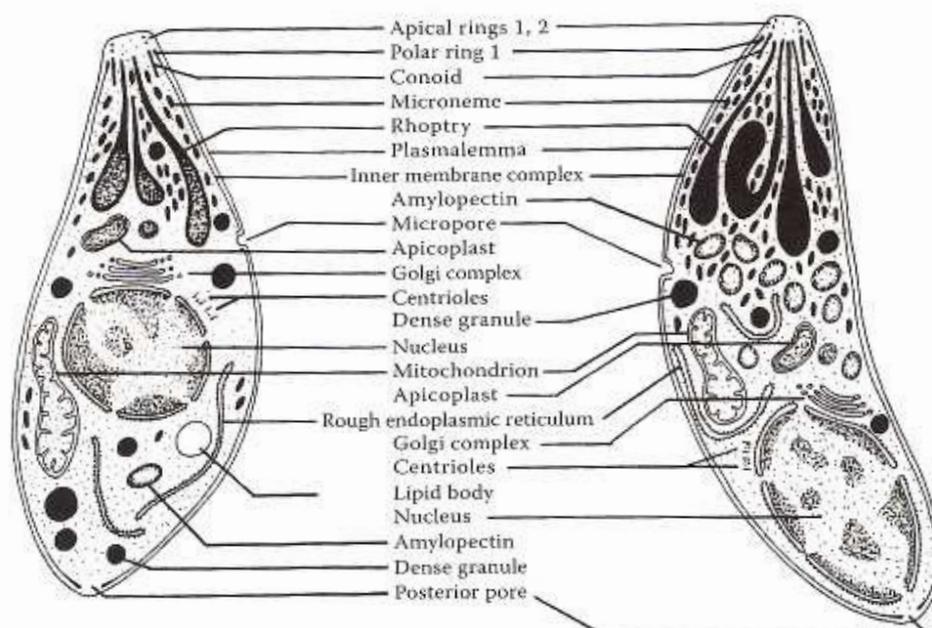
Le tachyzoïte (tachos = vitesse en grec) a la forme d'un croissant de 2 x 6 µm environ. Son extrémité antérieure est effilée et son extrémité postérieure arrondie. Seul un noyau volumineux en position centrale est visible au microscope optique, mais la microscopie électronique permet de retrouver au pôle antérieur un appareil apical complet, qui comporte le conoïde, élément participant à la mobilité du parasite et à sa pénétration dans les cellules et des organelles à activité sécrétoire (rhoptries, micronèmes, granules denses). La sortie hors de la vacuole parasitophore et de la cellule est également un phénomène actif. Les tachyzoïtes se disséminent rapidement dans tous les organes par l'intermédiaire des monocytes/macrophages sanguins et lymphatiques.

Cette phase entraîne des destructions cellulaires parfois associées à des troubles graves, la formation de foyers nécrotiques dans les zones de prolifération et possibilité chez les femelles gestantes de traverser le placenta et d'envahir le fœtus (AFSSA, 2005).

2.2.2.3 Les bradyzoïtes

Après une à deux semaines d'évolution, l'hôte développe généralement des réactions immunitaires, la prolifération se ralentit et l'on passe à la phase kystique, qui reste intracellulaire. Le stade bradyzoïte se distingue du précédent par quelques détails ultrastructuraux, notamment par la position du noyau, situé à l'extrémité postérieure, alors qu'il était plus central dans les tachyzoïtes (figure 29). Cette transformation s'accompagne de modifications de la vacuole parasitophore, dont la membrane et la matrice entre les parasites s'épaississent.

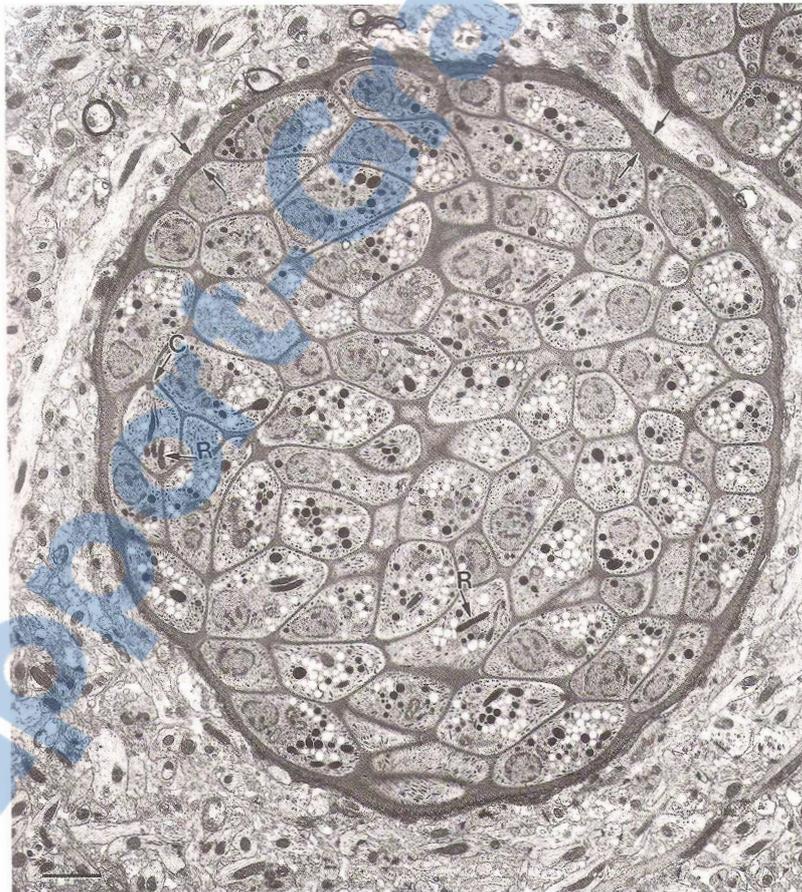
Figure 29. Représentation schématique d'un tachyzoïte (à gauche) et d'un bradyzoïte (à droite) de *T. gondii* (Dubey, 2010)



Ainsi se constitue le kyste toxoplasmique, structure sphérique intracellulaire à paroi mince (épaisseur $< 0,5 \mu\text{m}$) qui peut mesurer de 5 à 100 μm et contenir, au bout de 4 à 10 mois, jusqu'à 3000 bradyzoïtes au métabolisme adapté à une vie quiescente (figure 30). Les kystes peuvent se former dans n'importe quel type cellulaire, dont les cellules pulmonaires, hépatiques et rénales, mais persisteront préférentiellement dans les neurones, les astrocytes, les cellules musculaires, cardiaques et rétiniennes. Il est admis que les kystes peuvent persister pendant toute la vie de l'hôte, constituant de véritables formes de résistance. Leur persistance entretient une immunité cellulaire qui prévient en principe toute ré-infection, mais ils sont aussi susceptibles, à l'occasion d'une baisse d'immunité de l'hôte, de s'activer et de redonner des tachyzoïtes (Bussiéras et Chermette, 1992; AFSSA, 2005).

Les kystes sont tués par une température de 67  C et par une congélation à -12  C (AFSSA, 2005).

Figure 30. Kyste   bradyzoïtes observé au microscope électronique à transmission chez une souris, 6 mois post-infection (Samuel, Pybus, et Kocan, 2001)



2.2.3 Cycles parasitaires et modes d'infection

Le cycle parasitaire comporte une multiplication asexuée, qui s'effectue dans différents tissus chez les homéothermes (mammifères -dont le chat- et oiseaux), appelés hôtes intermédiaires (HI) et un cycle sexué, qui s'effectue dans l'épithélium digestif du chat et de quelques autres félidés (hôtes définitifs, HD).

La particularité du toxoplasme au sein des autres coccidies est la possibilité de transmission du parasite par carnivorerisme entre hôtes intermédiaires, sans l'intervention de l'hôte définitif (AFSSA, 2005).

2.2.3.1 Les différents modes de contamination

Les hôtes intermédiaires et définitifs ont la possibilité de se contaminer de trois façons :

- à partir des oocystes disséminés dans l'environnement : consommation de végétaux souillés par les oocystes, contamination possible d'origine hydrique ou tellurique. Un seul oocyste sporulé peut contaminer un hôte intermédiaire ;
- à partir des kystes tissulaires présents chez les hôtes intermédiaires : consommation de viande infectée d'animaux (mammifères et oiseaux) ;
- par passage transplacentaire des tachyzoïtes : lorsqu'une femelle de mammifère gestante contracte une primo-infection, il y a passage possible des tachyzoïtes au fœtus *via* le placenta, à l'origine d'une toxoplasmose congénitale, sans provoquer de troubles pour la mère. À l'inverse, chez une femelle en phase d'infection latente (hébergeant des kystes à bradyzoïtes), la venue d'une gestation n'entraîne aucun passage au fœtus (Bussiéras et Chermette, 1992).

Le chat a la possibilité de se contaminer après l'ingestion des trois formes infectieuses. Cependant, moins de 50 % des chats libèrent des oocystes dans leurs fèces suite à l'ingestion de tachyzoïtes ou d'oocystes, alors que presque tous en libèrent après l'ingestion de kystes contenus dans les tissus. Ainsi, la transmission par carnivorerisme est la plus efficace chez le chat.

À l'inverse, le mode de contamination le plus efficace pour les hôtes intermédiaires est l'ingestion d'oocystes. Il a été démontré expérimentalement que les bradyzoïtes sont moins infectants pour les souris que les oocystes (Dubey, 2010).

2.2.3.2 Cycle HI-HD

Il s'agit du cycle de base faisant intervenir un hôte définitif : le chat et un hôte intermédiaire, quel qu'il soit.

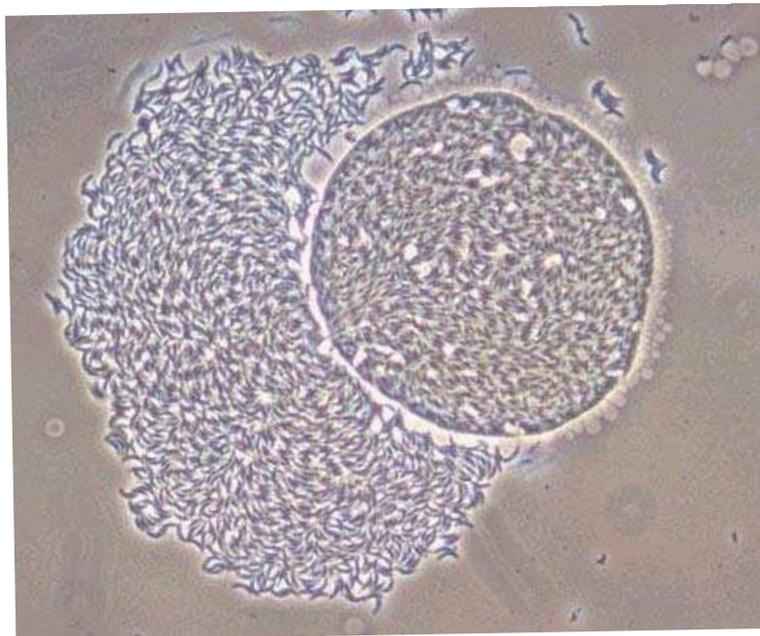
Les hôtes intermédiaires se contaminent par ingestion de végétaux ou d'eau de boisson souillés par des excréments de félidés contenant des oocystes. La paroi des oocystes se rompt dans l'intestin ; les sporozoïtes libérés franchissent l'épithélium intestinal, et grâce à leur appareil apical, vont pénétrer activement et très rapidement (moins de 20 secondes) dans des cellules très diverses. On les retrouve dans des vacuoles parasitophores intracytoplasmiques limitées par une membrane, qui ne fusionnent pas avec les lysosomes de la cellule, ce qui leur permet d'échapper à une digestion intracellulaire. Le parasite se multiplie très activement par

endodyogénies répétées toutes les 5 à 10 heures selon les souches, sous la forme de tachyzoïtes, jusqu'à la rupture de la cellule hôte.

Les tachyzoïtes se disséminent rapidement dans tous les organes par l'intermédiaire des monocytes/macrophages sanguins et lymphatiques. Après une parasitémie brève, les parasites s'enkystent dans les tissus, en particulier les muscles striés et le cerveau, sources de contamination de l'hôte définitif. Les hôtes intermédiaires du toxoplasme abritent, pendant toute la durée de leur vie, les kystes intratissulaires contenant des centaines de bradyzoïtes (Dubey, 2010).

Le chat et les félinés sauvages se contaminent par ingestion de tissus animaux contenant des kystes à bradyzoïtes. Ces derniers, libérés dans l'intestin grêle suite à la digestion de la paroi kystique par les enzymes protéolytiques (figure 31), pénètrent dans les entérocytes et présentent le développement suivant : plusieurs schizogonies (reproduction asexuée) donnant des schizontes, une gamétogonie (transformation des formes asexuées du toxoplasme en gamétocytes mâles et femelles) et production d'oocystes non sporulés suite à la fécondation. Les parois des entérocytes infectés se rompent et les oocystes sont libérés dans la lumière intestinale. La période pré-patente (temps au bout duquel le chat libère des oocystes suite à l'infection) dure de 3 à 10 jours après l'ingestion de kystes tissulaires. La période patente (période pendant laquelle l'animal infecté excrète des oocystes dans le milieu extérieur) dure en moyenne 12 jours avec un rejet maximal des oocystes dans les fèces habituellement entre le 5ème et le 8ème jour (Bussiéras et Chermette, 1992 ; Dubey, 2010).

Figure 31. Rupture de la paroi d'un kyste et libération de centaines de bradyzoïtes de *Toxoplasma gondii* sous l'action des sucs digestifs (AFSSA, 2005)

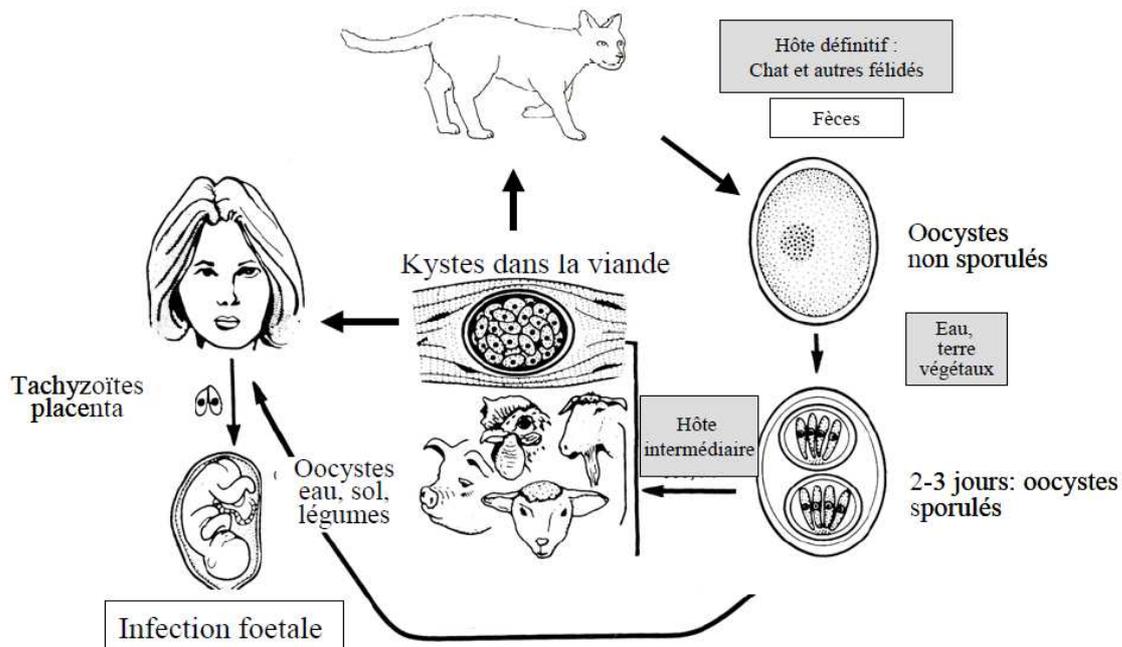


Lors de primo-infection, les chats, et plus particulièrement les chatons, peuvent libérer plus de 100 millions d'oocystes dans leur fèces, sans montrer aucun signe clinique (Frenkel *et al.*, 1991). Ce rejet est très limité dans le temps (quelques jours à quelques semaines). Lors d'une deuxième infection, le rejet des oocystes ne se produit à nouveau que chez 20 % des chats et pendant environ 2 jours (Rommel, 1978). On estime que 1 % des chats sont excréteurs d'oocystes à un moment donné. La co-infection par le virus de l'immunodéficience féline (FIV) ou de la leucémie du chat (FeLV) augmenterait le risque de toxoplasmose chez le chat (Bussiéras et Chermette, 1992).

Si un chat ingère des tachyzoïtes, il se produit également un nouveau cycle intestinal et une nouvelle production d’ocystes. La période prépatente est de 19 jours au minimum (Dubey, 2010).

Le cycle de *Toxoplasma gondii* est résumé sur la figure 32.

Figure 32. Schéma du cycle de *Toxoplasma gondii*, d’après Dubey et Beatty, 1988 (AFSSA, 2005)



2.2.3.3 Cycle HD-HD

Dans ce cas, le cycle se déroule uniquement chez le chat, HD.

Le chat se contamine par ingestion de terre, d’eau ou de végétaux souillés par des oocystes sporulés. Comme chez l’HI, les sporozoïtes se transforment en tachyzoïtes puis en bradyzoïtes dans des kystes. De manière imprévisible, certains bradyzoïtes rompent la paroi des kystes et pénètrent dans les entérocytes. Le chat développe alors un cycle toxoplasmique intestinal : il y a schizogonie, gamétogonie, fécondation puis évacuation d’ocystes immatures avec les fèces. La période prépatente est de 18 jours au minimum, quelle que soit la dose ingérée, mais tous les chats ne libèrent pas d’ocystes dans leurs fèces (Dubey, 2010).

Les différents modes de transmission chez le chat sont rappelés sur la figure 33.

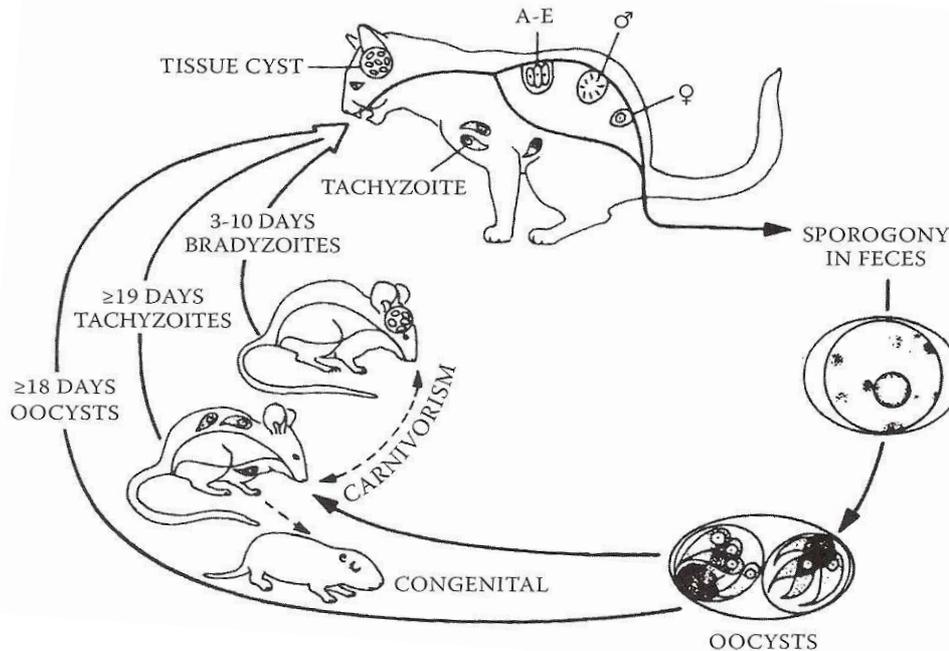
2.2.3.4 Cycle HI-HI

La possibilité de transmission du parasite par carnivorisme entre hôtes intermédiaires par un processus de multiplication asexuée est une des particularités du toxoplasme au sein des coccidies.

Le cycle se déroule sans intervention du chat et donc sans reproduction sexuée. Si un HI ingère un autre HI porteur de kystes, les bradyzoïtes libérés se multiplient dans l’organisme sous forme de tachyzoïtes qui forment des kystes à bradyzoïtes, à nouveau infectants pour d’autres HI.

Figure 33. Cycle de *T. gondii* chez le chat (Dubey, 2010)

(Tissue cyst : kyste tissulaire, oocyst : oocyste, carnivorism : carnivorisme, sporogony in feces : sporogonie dans les matières fécales)



2.2.4 Circulation mondiale des génotypes de *T. gondii*

Le génome du toxoplasme a une taille de 65 Mb, réparti en 14 chromosomes (Dubey, 2010).

Depuis une trentaine d'années, des études ont été entreprises pour analyser la diversité génétique de l'espèce *Toxoplasma gondii*. Les méthodes de typage ont d'abord fait appel à des techniques isoenzymatiques, puis aux techniques de biologie moléculaire : PCR-RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction), analyse des microsatellites. Plus d'une cinquantaine de marqueurs sont actuellement décrits : les plus utilisés ciblent le polymorphisme de gènes codant des antigènes majeurs du toxoplasme (AFSSA, 2005).

Les études concordent pour regrouper la majorité des isolats analysés en 3 génotypes principaux, (types I, II et III) équivalents à des lignées clonales, stables dans le temps et l'espace, qui se différencient par leur virulence chez la souris : les infections dues au type I sont létales pour 100 % des souris, quelle que soit la dose, tandis que les types II et III sont généralement avirulents (Dubey, 2010).

Cette structure clonale n'exclut pas la possibilité de transferts génétiques occasionnels entre les 3 principales lignées comme en témoigne l'existence d'isolats présentant une combinaison différente des allèles classiques.

D'autres isolats atypiques se caractérisent par la présence d'allèles uniques, non retrouvés parmi les allèles des 3 génotypes majeurs. Ces divers isolats atypiques sont plus volontiers retrouvés dans des biotopes éloignés de l'influence humaine et de celle des chats domestiques (AFSSA, 2005).

Les génotypes « classiques » I, II et III seraient, au moins en Europe et aux Etats-Unis d'Amérique, des lignées particulièrement bien adaptées à l'Homme et aux animaux domestiques, sources habituelles de la contamination humaine. Leur expansion aurait été favorisée par le développement de l'élevage il y a environ 10 000 ans (AFSSA, 2005).

La circulation du parasite est mondiale. La majorité des infections chez les vertébrés à sang chaud (~60-80 %) provient du type II. Les types I et III sont à l'origine de la majorité des infections restantes. Tous les génotypes semblent capables d'infecter l'homme, mais on observe une large prédominance du génotype II en France, tant lors des toxoplasmoses bénignes que sévères. En revanche, les infections dues aux types I et III sont plus susceptibles de conduire à une toxoplasmose clinique (AFSSA, 2005 ; Dubey, 2010).

2.2.5 Pathologie

2.2.5.1 Symptômes

La gravité de la toxoplasmose est variable selon les espèces. Les manifestations cliniques les plus fréquentes sont décrites chez les petits ruminants (chèvre et mouton) et chez le chat, puis chez le porc et les rongeurs, enfin chez le chien et le cheval. La plupart des cas sont asymptomatiques, mais les manifestations cliniques peuvent être graves, et potentiellement fatales, particulièrement chez les jeunes et les immunodéprimés (AFSSA, 2005).

La toxoplasmose congénitale (transmission de la mère au fœtus par voie transplacentaire) peut provoquer des avortements, surtout en fin de gestation, des rétentions fœtales et momifications, de la mort-natalité ou encore des lésions graves chez les nouveau-nés (hydrocéphalie, encéphalomyélite, etc.). Elle représente une cause majeure d'avortement chez les petits ruminants.

En cas de toxoplasmose acquise, les formes aiguës se retrouvent essentiellement chez les jeunes animaux, qui présentent des symptômes très polymorphes : fièvre, souvent accompagnée de bronchopneumonie ou parfois de méningoencéphalite, troubles digestifs, lymphadénopathie. L'évolution se fait en général rapidement vers la mort.

Les formes chroniques sont rarement décelées chez les animaux, mais peuvent conduire à des troubles nerveux ou oculaires (uvéite, chorio-rétinite) (Bussiéras et Chermette, 1992).

2.2.5.2 Lésions

Les lésions macroscopiques comprennent des hypertrophies viscérales (foie et surtout rate et nœuds lymphatiques), de multiples foyers inflammatoires à caractère souvent hémorragique ou nécrotique dans les centres nerveux, poumons, foie, ganglions, cœur, muscles, en cas d'atteinte aiguë ou des nodules grisâtres de 1 à 5 mm de diamètre dans le parenchyme pulmonaire, en cas d'atteinte subaiguë.

Au niveau microscopique, on retrouve les foyers inflammatoires et nécrotiques, ainsi que la présence de toxoplasmes sous la forme de tachyzoïtes ou de kystes (Bussiéras et Chermette, 1992).

2.2.5.3 Action antigénique

Le développement de l'immunité acquise marque la fin de la phase proliférative aiguë ; elle est de nature à la fois cellulaire et humorale (d'abord à IgM puis à IgG). Elle se maintient pendant toute la phase d'infection latente. Les tachyzoïtes peuvent réapparaître dans l'organisme à la faveur d'une immuno-dépression (Bussiéras et Chermette, 1992).

2.2.6 Diagnostic de laboratoire

Le diagnostic est avant tout épidémiologique, clinique, différentiel, puis de laboratoire. Ce dernier peut être indirect (mise en évidence des anticorps), par sérologie, ou bien direct (mise en évidence du parasite (directe ou par bio-essai) ou de son ADN), par PCR, histologie, coprologie et culture.

Le diagnostic biologique de la toxoplasmose chez l'animal est rarement fait en pratique vétérinaire courante : il reste limité aux études de séroprévalence et à la recherche étiologique des avortements chez les brebis.

2.2.6.1 Diagnostic indirect

Le diagnostic sérologique de la toxoplasmose chez l'animal est basé sur la détection d'anticorps (IgG principalement). Les techniques sérologiques sont identiques à celles décrites chez l'homme, mais plusieurs d'entre-elles présentent d'importantes limites.

Méthodes de première génération :

- ✓ le **dye-test** ou **test de lyse** (Sabin et Feldman, 1948), considéré comme le plus spécifique en médecine humaine n'est pas applicable chez les bovins en raison de son manque de fiabilité. Ce test reste valable pour les autres espèces animales. Son utilisation est cependant peu fréquente en pratique courante vétérinaire.
- ✓ l'**hémagglutination indirecte** et le test d'agglutination sur latex sont abandonnés en raison de problèmes de sensibilité (titres généralement faibles) et de spécificité (réactions croisées avec d'autres coccidies).
- ✓ l'**immunofluorescence indirecte** est employée chez l'animal mais des différences de sensibilité peuvent être observées selon les seuils utilisés et les espèces. Cette

technique est limitée par la nécessité d'utiliser un conjugué spécifique d'espèce ; elle est peu adaptée aux enquêtes de séroprévalence.

Méthodes de deuxième génération :

- ✓ l'**agglutination directe modifiée** (MAT) ou **agglutination directe de haute sensibilité** (ADHS) a été initialement proposée pour le sérodiagnostic de la toxoplasmose chez l'homme par Desmonts et Remington (1980) puis utilisée chez l'animal. L'antigène est une suspension de tachyzoïtes trypsinés puis formolés ; la réaction est réalisée sur des dilutions de sérums. Ce test présente plusieurs intérêts : simplicité de réalisation, bonne sensibilité (82,9 %) et spécificité (90,8 %) (Dubey *et al.*, 1995), et possibilité d'être réalisé pour de nombreuses espèces animales. La validation de la spécificité de la MAT pour la toxoplasmose a été établie dans une autre étude (Dubey, 1997) qui a recherché la présence de réactions croisées entre *T. gondii* et d'autres agents pathogènes (*Sarcocystis miescheriana*, *Neospora caninum*, *Ascaris suum*, *Trichuris suis*, *Trichinella spiralis* et divers virus). La valeur-seuil de 1/25^{ème} a été sélectionnée arbitrairement. Ce test est largement employé dans des études de dépistage et de prévalence sur de très nombreuses espèces de la faune domestique ou sauvage. A l'heure actuelle, cette technique paraît la meilleure en termes de sensibilité et de spécificité et est considérée comme la méthode de référence.
- ✓ les techniques **ELISA** ont été proposées pour la recherche d'anticorps anti-*T. gondii* chez les porcs, les bovins, les moutons, les chevaux et les chats. Comme pour l'immunofluorescence, les techniques ELISA nécessitent l'emploi d'un conjugué spécifique pour chaque espèce animale et ne sont donc pas applicables à toutes les espèces. En revanche, elles présentent l'intérêt d'être disponibles en kits commercialisés, facilement automatisables (AFSSA, 2005).

2.2.6.2 Diagnostic direct

2.2.6.2.1 Histologie

L'étude histologique peut être réalisée sur les prélèvements de tissus animaux pour la mise en évidence de tachyzoïtes ou de kystes. Des colorations par immunohistochimie peuvent être alors utilisées. La difficulté réside dans le diagnostic différentiel entre *T. gondii* et d'autres protozoaires très proches, *Neospora caninum* et *Sarcocystis neurona*, responsables d'affections pathologiques similaires chez de nombreux animaux. Toutefois, une amélioration de la qualité des anticorps permet de limiter voire d'exclure toute réaction croisée (au moins vis-à-vis de *N. caninum*) (AFSSA, 2005).

2.2.6.2.2 Culture cellulaire

Cette technique n'est pas utilisée pour le diagnostic chez l'animal car la sensibilité n'est pas suffisante (AFSSA, 2005). Une étude fait cependant état de cette technique pour l'isolement de *T. gondii* chez des loutres de mer (Miller *et al.*, 2002a).

2.2.6.2.3 Biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire (PCR) sont employées pour la détection d'ADN dans les tissus animaux et sur différents types de produits pathologiques (organes ou liquides biologiques). La PCR a été évaluée dans des infections expérimentales chez le mouton et proposée dans le cadre du diagnostic étiologique des avortements chez les ovins et chez les bovins, permettant notamment la distinction avec *Neospora caninum*.

La PCR est également d'une grande aide dans le diagnostic, surtout chez les individus gravement immunodéprimés qui produisent peu d'anticorps, puisqu'elle est assez sensible pour détecter la présence d'un unique toxoplasme. Plusieurs marqueurs peuvent être utilisés comme l'amplification du gène B1 (gène répété 35 fois dans le génome du toxoplasme permettant d'augmenter la sensibilité de la détection), l'amplification du gène SAG1 (codant l'antigène majeur du toxoplasme), très spécifique mais dont la présence dans le génome sous forme d'une copie unique est à l'origine d'une moindre sensibilité. Récemment, le développement de la PCR en temps réel a permis de pouvoir quantifier la quantité d'ADN.

Les tissus les plus intéressants pour la recherche de toxoplasmes par ces diverses méthodes sont le coeur et le cerveau dans un contexte de dépistage systématique ou le placenta et les produits d'avortements dans le contexte de la recherche étiologique d'un avortement (AFSSA, 2005).

2.2.6.2.4 Bio-essai

La souris et le chat peuvent être employés pour des bio-essais.

La technique utilisant la souris consiste en l'inoculation des prélèvements pathologiques (sang, jus ganglionnaire, exsudat péritonéal, cotylédons placentaires chez les Ruminants, cerveau ou bien digestat de fœtus). Les souris infectées développent rarement des signes cliniques. Leur infection, témoin de la présence de toxoplasmes dans le produit inoculé, ne peut le plus souvent être détectée qu'après 3 à 4 semaines, par la mise en évidence d'une synthèse d'anticorps et confirmée par la présence de kystes dans leur cerveau, 8 à 10 semaines après l'inoculation. L'inoculation à la souris fournit donc des résultats tardifs, mais elle conserve des avantages majeurs : une bonne sensibilité, une spécificité de 100 %, une confirmation objective des résultats de la biologie moléculaire, voire une complémentarité des résultats de la PCR (notamment lors de faux-négatifs). En outre, elle permet l'isolement des souches pour une caractérisation ultérieure.

Le bio essai sur le chat (méthode optimum de diagnostic ou gold-standard) est rarement utilisé en pratique courante. L'inoculation d'un chat indemne de toxoplasmose (vérification par la sérologie) est faite par ingestion. L'infection du chat, témoin de la présence de toxoplasmes dans le produit inoculé, est attestée par la présence d'oocystes éliminés dans les fèces dès le 3^{ème} jour post-inoculation. Il semble que le bio-essai sur le chat soit plus sensible que sur la souris car la quantité de matériel administrée au chat peut être plus importante et le chat élimine des oocystes même lorsque l'inoculum parasitaire est faible (AFSSA, 2005).

2.2.7 La toxoplasmose chez les humains

La toxoplasmose est une zoonose majeure. La transmission peut se faire par consommation de viande ou de viscères crus ou peu cuits contenant des kystes ou suite à l'ingestion d'oocystes rejetés par les chats et souillant la terre et les légumes. La voie transplacentaire est également possible (Bussiéras et Chermette, 1992).

La toxoplasmose se retrouve sur tous les continents et même en Antarctique.  tant le plus souvent asymptomatique, le recensement des cas cliniques sous-estime la prévalence de l'infection de manière importante. Pour estimer la prévalence de cette infection, il est nécessaire de recourir à des études sérologiques (InVS, 2003).

La prévalence des infections s'étend de 4 % en Corée jusqu'à 92 % au Brésil. Les prévalences inférieures à 30 % s'observent principalement en Amérique du Nord, en Grande-Bretagne, en Scandinavie et en Asie du Sud-Est. Les prévalences supérieures à 60 % s'observent principalement en Afrique et en Amérique Latine. Les conditions climatiques, mais aussi d'autres facteurs de risque, liés aux modes de vie et à l'alimentation (habitude de consommer certaines viandes peu cuites) ont été évoqués pour expliquer ces différences de prévalence entre les pays (InVS, 2003; Dubey, 2010).

La toxoplasmose tient une place particulière en France, pour plusieurs raisons d'ordre épidémiologique, scientifique et sanitaire :

- c'est l'une des infections les plus fréquentes dans la population française : la séroprévalence a longtemps été élevée (82 % en 1960, 66 % en 1982), mais elle a diminué régulièrement depuis 40 ans pour atteindre 54 % en 1995 et 44 % en 2003, avec des variations régionales encore mal expliquées (InVS, 2003). Une corrélation positive entre la prévalence et les zones géographiques où prédomine la consommation de viande de mouton a été mise en évidence (AFSSA, 2005). On estime que 200 000 à 300 000 nouvelles infections surviennent chaque année (2700 cas chez les femmes enceintes), dont 15 à 20 % sont symptomatiques (InVS, 2003).
- la gravité de cette infection est liée au risque de transmission foétale du parasite en cas de contamination en cours de grossesse, avec un nombre de cas estimés de 600 cas de toxoplasmose congénitale par an, dont 175 avec des séquelles. Cette gravité est aussi liée au risque différé de réactivation d'une infection antérieurement acquise, sous l'effet d'une immunodépression. Sur ce dernier point, d'énormes progrès thérapeutiques ont été réalisés ces dernières années, mais le nombre de cas de toxoplasmoses cérébrales survenant chez les patients infectés par le VIH est encore proche de 200 par an (InVS, 2003).

En conséquence des risques identifiés, et principalement celui de toxoplasmose congénitale, la France a pris, dès 1978, un certain nombre de dispositions r glementaires ayant pour objectif de dépister, par la sérologie, les femmes exposées au risque d'infection par *T. gondii*. Ce dépistage est accompagné d'un suivi sérologique des femmes séronégatives pendant toute la grossesse. Ces femmes reçoivent par ailleurs une information sur les mesures hygiéno-diététiques à respecter pour réduire le risque de contamination.

Chez les patients immunodéprimés, un dépistage sérologique de la toxoplasmose est recommandé et l'administration d'une chimioprophylaxie est préconisée chez les sujets séropositifs pour la toxoplasmose en cas de déficit immunitaire très prononcé (AFSSA, 2005).

Malgré ces mesures, les formes graves de toxoplasmose (infection congénitale, toxoplasmose cérébrale des immunodéprimés) restent fréquentes et justifient l'application rigoureuse des mesures de prévention de la contamination.

Des mesures simples peuvent être mises en place pour protéger les personnes à risque :

- surveiller l'alimentation : pas de viande crue ou saignante, laver à grande eau les crudités ;
- se laver soigneusement les mains avant les repas et après avoir manipulé de la viande saignante ou de la terre ;
- porter des gants lors du jardinage, notamment pour les femmes enceintes ;
- couvrir les bacs à sable pour éviter que les chats extérieurs ne viennent les souiller ;
- renouveler la litière du chat de la famille tous les jours (les oocystes mettent 24 h à sporuler et donc à devenir infectants) ;
- éviter l'administration de viande crue au chat, ainsi que la capture et la consommation de souris (Bussiéras et Chermette, 1992).

Rapport-Gratuit.com

2.3 *Neospora caninum*

2.3.1 Présentation du parasite

Neospora caninum est une coccidie très proche de *Toxoplasma gondii* qui fut longtemps confondue avec celle-ci jusqu'à son identification en tant qu'espèce nouvelle par Dubey *et al.* en 1988. Elle appartient également à la famille des Sarcocystidés.

Le chien a été reconnu comme hôte définitif par McAllister *et al.* en 1998. De nombreux mammifères peuvent jouer le rôle d'hôte intermédiaire, mais pas les oiseaux, contrairement à la toxoplasmose.

Neospora caninum était jusqu'en 1998 le seul représentant de son genre. Un autre parasite, *Neospora hughesi*, très peu différent génétiquement a été mis en évidence dans l'espèce équine (Dubey *et al.*, 2007b).

Le cycle de développement de *Neospora caninum* est très proche de celui de *Toxoplasma gondii* : cycle hétéroxène faisant intervenir un carnivore comme hôte définitif. Cependant, la néosporose touche uniquement les mammifères et en premier lieu les espèces canine et bovine, avec un canidé (chien (*Canis familiaris*), coyote (*Canis latrans*), renard (*Vulpes vulpes*), loup (*Canis lupus*), etc.) comme hôte définitif de *Neospora caninum*. *N. caninum* est un parasite difficile à isoler et à mettre en culture, il subsiste de ce fait encore de nombreuses incertitudes concernant son développement.

2.3.2 Description des différentes formes du parasite

Le cycle parasitaire fait alterner les trois mêmes stades infectieux que pour *Toxoplasma* : les tachyzoïtes, les kystes à bradyzoïtes et les oocystes. Les tachyzoïtes et bradyzoïtes sont les formes retrouvées chez les hôtes intermédiaires.

Les tachyzoïtes mesurent environ 6 x 2 µm. Ils se développent dans le cytoplasme de diverses cellules : macrophages, polynucléaires, neurones, cellules musculaires, etc.

Les kystes sont le plus souvent ronds ou ovales et peuvent mesurer jusqu'à 107 µm de longueur. La paroi du kyste mesure de 1 à 4 µm d'épaisseur (ce qui permet de faire la distinction avec *Toxoplasma* chez qui la paroi mesure moins de 0,5 µm) et les bradyzoïtes à l'intérieur font en moyenne 7 à 8 x 2 µm. On peut retrouver les kystes dans le système nerveux central, dans les muscles, etc.

Les oocystes, forme de résistance parasitaire dans l'environnement, sont rejetés par l'intermédiaire des fèces de chiens ou autres canidés sauvage sous une forme non sporulée, 5 jours ou plus après l'ingestion des tissus contaminés. La sporulation a ensuite lieu dans le milieu extérieur en moins de 24 h. La survie de *N. caninum* dans l'environnement est inconnue jusqu'à présent (Dubey *et al.*, 2007b).

2.3.3 Cycle parasitaire et modes d'infection

Les trois formes parasitaires sont impliquées dans la transmission du parasite, laquelle peut se faire de manière horizontale ou verticale (figure 34).

2.3.3.1 Transmission horizontale

Les canidés s'infectent suite à l'ingestion de tissus contenant des tachyzoïtes ou des kystes à bradyzoïtes et les hôtes intermédiaires suite à l'ingestion de nourriture ou d'eau contaminée par des oocystes sporulés.

Contrairement à la toxoplasmose, il n'existe pas de données concernant la possibilité d'une infection d'un hôte définitif après ingestion d'oocystes et la transmission d'un HI à un autre HI par l'intermédiaire des tissus contenant des kystes à bradyzoïtes (carnivorisme) n'existe pas (Dubey *et al.*, 2007b).

2.3.3.2 Transmission verticale

Actuellement, le parasite *Neospora caninum* est reconnu comme étant l'un des parasites transmis le plus efficacement à la descendance au cours de la gestation chez les bovins. Il faut distinguer deux modes de transmission transplacentaire : endogène et exogène.

Le terme de transmission transplacentaire exogène désigne la transmission du parasite après une primo infection de la mère durant la gestation, alors que le terme de transmission transplacentaire endogène désigne la transmission résultant de la réactivation du parasite au cours de la gestation chez une mère infectée de manière persistante (Dubey *et al.*, 2007b).

2.3.3.2.1 Transmission transplacentaire exogène

Concernant le mécanisme de transmission exogène du parasite (comparable au mode de transmission transplacentaire de *T. gondii*), il est probable qu'après l'ingestion, il y ait relargage dans l'intestin des huit sporozoïtes contenus au sein de l'oocyste, comme c'est le cas pour *T. gondii*. Les sporozoïtes colonisent alors l'épithélium intestinal et se transforment en tachyzoïtes. Il s'ensuit une phase de multiplication, qui pourrait avoir lieu dans les noeuds lymphatiques mésentériques. Les tachyzoïtes gagneraient ensuite la circulation sanguine. La parasitémie serait alors à l'origine de la dissémination de *Neospora caninum* dans l'organisme, dont l'utérus gravide. De nombreuses inconnues subsistent concernant la dissémination du parasite, car la parasitémie est difficile à observer expérimentalement (Dubey *et al.*, 2007b).

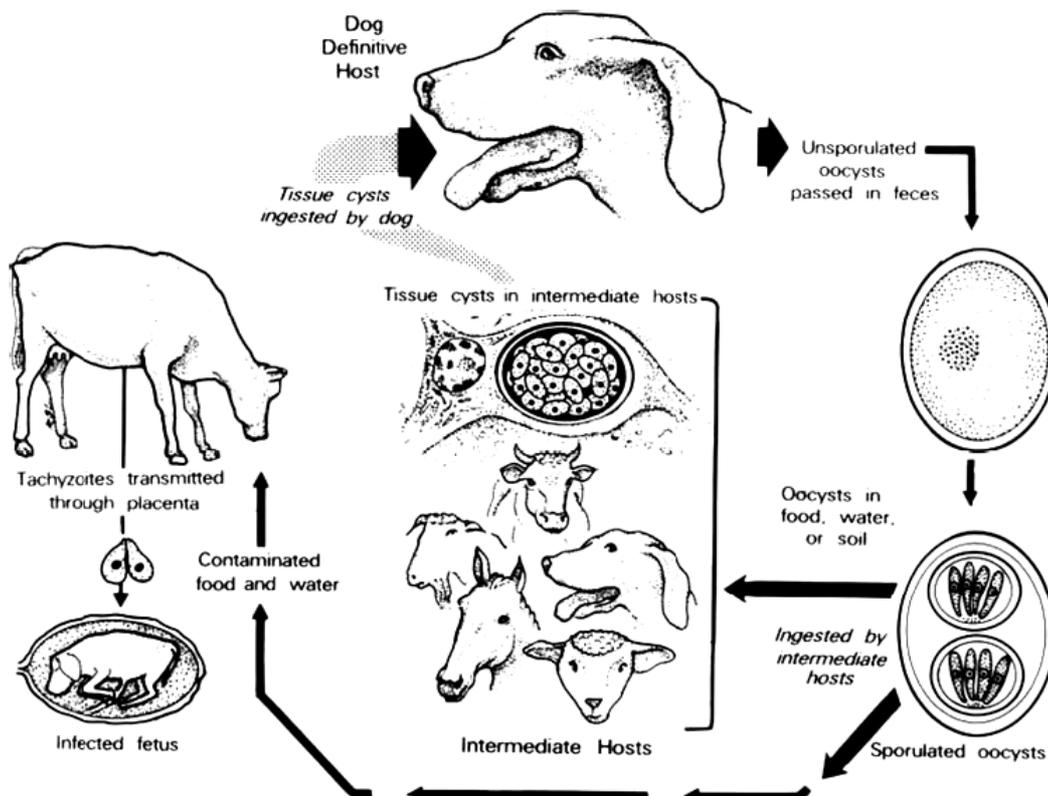
2.3.3.2.2 Transmission transplacentaire endogène

Il est maintenant connu que *Neospora caninum* peut être à l'origine d'avortements répétés, lors de gestations successives ou de manière intermittente au sein du troupeau. La transmission transplacentaire endogène est le mode le plus commun de transmission de l'infection à *Neospora caninum* chez le bovin. Les différentes études épidémiologiques sont

en effet en faveur d'une recrudescence de l'infection au cours de la gestation. Cette recrudescence serait vraisemblablement rendue possible à cause de la baisse d'immunité maternelle survenant à mi-gestation en règle générale (Dubey *et al.*, 2007b).

Figure 34. Schéma du cycle de *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 2007b)

(dog definitive host : chien hôte définitif, intermediate hosts : hôtes intermédiaires, tissue cysts ingested by dogs : kystes tissulaires ingérés par les chiens, unsporulated oocysts passed in feces : oocystes non-sporulés libérés dans les fèces, oocysts in food, water or soil : oocystes dans la nourriture, l'eau ou le sol, sporulated oocysts : oocystes sporulés, tachyzoites transmitted through placenta : transmission des tachyzoïtes *via* le placenta, infected fetus : fœtus infecté, contaminated food and water : nourriture et eau contaminées)



2.3.4 Pathologie

2.3.4.1 Symptômes

L'infection est subclinique le plus souvent, mais une néosporose aiguë peut se développer conduisant à des encéphalites, myosites et avortements.

Chez le chiot, on voit évoluer, sur des sujets d'une même portée, des troubles de paralysie postérieure ascendante, avec contractures musculaires et hyperextension des membres postérieurs. Une survie prolongée de certains malades est possible. Chez le chien adulte, on observe des atteintes multiples du système nerveux central ainsi que des polymyosites (Bussiéras et Chermette, 1992).

Les avortements sont la manifestation clinique principale de la néosporose bovine. Le plus souvent, les fœtus retrouvés morts *in utero* ont entre 3 et 8 mois de gestation et montrent généralement des signes d'autolyse modérée. Il est possible de trouver des foetus momifiés de moins de 5 mois ainsi que des mortalités embryonnaires, avec, en conséquence, des retours en chaleur répétés (Dubey *et al.*, 2006).

Même si les avortements sont la manifestation la plus visible de la néosporose, dans la majorité des cas, une vache atteinte donne naissance à un veau cliniquement sain mais infecté persistant. On estime qu'il y aurait jusqu'à 95 % des veaux nés de mère séropositive qui seraient infectés de manière congénitale, et donc hébergeraient le parasite, mais qui seraient cliniquement sains à la naissance. Ce mode de transmission serait donc à l'origine de la persistance de l'infection au sein des troupeaux. Rarement, on observe des troubles neurologiques chez les veaux âgés de moins d'un mois infectés congénitalement (Sarrazin, 2009).

2.3.4.2 Lésions

Les lésions macroscopiques résultent en de la nécrose ainsi que des dépôts minéraux dans les muscles, une hypertrophie du foie et le développement d'une pneumonie. Au niveau microscopique, on observe des foyers nécrotiques multiples, s'accompagnant d'inflammation locale : encéphalomyélite, myocardite, hépatite et myosite (Bussiéras et Chermette, 1992).

2.3.5 Diagnostic de laboratoire

2.3.5.1 Diagnostic indirect

La sérologie est la méthode la plus couramment employée pour diagnostiquer l'infection à *Neospora caninum*. Les tests sérologiques ont l'avantage de pouvoir être réalisés de manière *ante-mortem* et d'apporter des indications concernant le stade de l'infection ; en revanche, ils ne sont que le témoin indirect de l'infection. Les anticorps apparaissent chez l'animal contaminé quelques jours seulement après l'infection primaire. Les anticorps peuvent persister toute la vie de l'animal chez le bovin, et plus de 4 ans chez le chien, mais de manière fluctuante au cours du temps.

Actuellement, parmi les tests disponibles, deux sont majoritairement utilisés pour diagnostiquer une infection à *Neospora caninum* : l'IFAT et l'ELISA. Il existe de nombreuses variantes de procédures pour ces tests, mais la plupart sont basées sur l'utilisation de souches bovines ou canines de tachyzoïtes issus de cultures cellulaires permettant la détection des anticorps présents dans le sérum et, depuis 2005, dans le lait ou le colostrum (Sarrazin, 2009).

- ✓ L'**IFAT** permet d'analyser des prélèvements de sérum. Les antigènes utilisés en IFAT sont des tachyzoïtes entiers fixés sur lame. Cette technique demande une grande habitude de lecture, car seule la fluorescence complète du tachyzoïte doit être prise en compte. Elle reste cependant la technique de référence concernant la recherche sérologique de *Neospora caninum*. En général, pour l'espèce canine, le seuil de 1/50 est choisi comme seuil de positivité et semble le plus approprié pour diagnostiquer une infection à *Neospora caninum* chez le chien.

- ✓ De nombreux tests **ELISA** ont été décrits et développés pour la recherche des anticorps de *Neospora caninum* et sont disponibles dans le commerce. L'ELISA peut être effectuée sur sérum, lait et colostrum.
- ✓ Une technique d'**immunoblotting** a montré sa haute efficacité en matière de spécificité et de sensibilité, pour l'espèce bovine. Lors de l'immunoblotting, les protéines (ici antigènes de *Neospora*) sont tout d'abord séparées par électrophorèse, transférées sur un filtre (nitrocellulose le plus souvent) puis détectées immunologiquement à l'aide du sérum à tester. Cette technique est recommandée lorsque l'ELISA ou l'IFAT donne des résultats ambigus et elle peut être d'une aide cruciale pour interpréter d'éventuelles réactions croisées ou même pour différencier chez les nouveau-nés les anticorps d'origine maternelle ou fœtale. Cependant, ce test n'est pas utilisé de manière courante.
- ✓ Les **tests d'agglutination directes** (NAT : *Neospora* Agglutination Test, ou DAT : Direct Agglutination Test, équivalents de la MAT pour le diagnostic de la toxoplasmose), qui ne nécessitent pas d'anticorps secondaires spécifiques d'espèce, sont également utilisés pour le diagnostic des affections à *Neospora caninum* (Romand, Thulliez, et Dubey, 1998).

2.3.5.2 Diagnostic direct

2.3.5.2.1 Histologie

Le diagnostic anatomo-pathologique est une procédure intéressante pour orienter une suspicion de néosporose. En effet, la multiplication du parasite dans les tissus de l'hôte induit des lésions microscopiques typiques, nécrotiques et inflammatoires, retrouvées dans divers organes, mais surtout dans le système nerveux. Cependant, le nombre de parasites est généralement faible et *Neospora caninum* est un parasite difficile à distinguer d'autres parasites proches comme *Toxoplasma gondii* et *Hammondia* sp. (Dubey *et al.*, 2006).

2.3.5.2.2 Immuno-histochimie

Le diagnostic par immuno-histochimie est plus à même de diagnostiquer directement des infections à *Neospora caninum*. Des anticorps poly et mono-clonaux peuvent ainsi être employés pour révéler la présence d'antigènes du parasite sur des coupes histologiques tissulaires. Par immuno-histochimie, le parasite est le plus souvent retrouvé dans le cerveau et le cœur (Dubey *et al.*, 2006).

2.3.5.2.3 Bio-essai et culture cellulaire

Afin d'attribuer de manière certaine les lésions observées au parasite *Neospora caninum*, la viabilité du parasite devrait être démontrée, car il existe de nombreux animaux infectés asymptomatiques. Cependant, les essais d'isolement du parasite vivant par culture cellulaire ou essai biologique sur animal d'expérimentation sont souvent suivis d'échec. Ainsi, des souches viables du parasite n'ont pu être isolées que pour une vingtaine de bovins

analysés (Dubey *et al.*, 2006), quelques isolats de cheval, chien et de ruminants sauvages, ce qui est très faible par rapport au nombre de cas rapportés. Ce diagnostic, même s'il apporte plus de certitudes concernant l'infection, car il démontre la présence de parasites pathogènes dans l'organisme étudié, est difficile à mettre en place de manière courante (Sarrazin, 2009).

2.3.5.2.4 PCR

La PCR joue un rôle de plus en plus important dans le diagnostic des infections à *Neospora caninum*, car elle permet la détection directe la plus facile du parasite. La plupart des protocoles utilisés permettent la détection de l'ADN du parasite dans les tissus des avortons ou des hôtes intermédiaires, mais certains tests peuvent s'effectuer sur fluide amniotique ou cérébrospinal ou sur fèces de chien ou de coyote. Il semblerait que le cerveau soit le plus à même d'être utilisé pour une détection du parasite par PCR, suivi du coeur, des poumons et des reins (Dubey *et al.*, 2006).

2.3.6 Transmission aux humains

La transmission du parasite chez le macaque rhésus (*Macaca mulatta*) ayant été réalisée expérimentalement (Barr *et al.*, 1994), la question concernant l'éventuel rôle zoonotique de *Neospora caninum* est soulevée.

Une étude menée par McCann *et al.* (2008) n'a pas mis en évidence de séropositivité à *N. caninum* en Angleterre, où la séroprévalence à *T. gondii* est également faible. Cependant, une étude française (Robert-Gangneux et Klein, 2009) mérite d'être citée. Ils ont recherché des anticorps anti-*T. gondii* et anti-*N. caninum* à partir de 500 échantillons de sérums provenant de femmes en bonne santé suivies dans le cadre de leur grossesse et 400 sérums provenant de patients infectés par le VIH, par immunofluorescence indirecte. À une dilution de 1/80, aucun des 500 échantillons provenant du groupe immunocompétent ne s'est révélé positif, en revanche, 3 patients atteints par le VIH étaient séropositifs et un quatrième était également positif à un seuil de 1/160. Parmi ces 4 patients, 3 présentaient en parallèle des titres très élevés d'anticorps anti-*T. gondii*.

D'après cette étude, la présence de néosporose chez des humains en bonne santé semble improbable. En revanche, les résultats positifs retrouvés chez 4 patients atteints par le VIH pourraient suggérer une circulation du parasite au sein de la population immunodéprimée. Des études à grande échelle seront nécessaires pour déterminer plus précisément le rôle du parasite au sein de cette population et isoler le parasite ou détecter son ADN.

2.4 *Sarcocystis* spp.

2.4.1 Présentation du parasite

De même que les genres *Toxoplasma* et *Neospora*, le genre *Sarcocystis* (Lankester, 1882) appartient à l'embranchement des *Apicomplexa* et à la famille des sarcocystidés. Il a été identifié pour la première fois en Suisse par Miesher en 1843 dans le muscle squelettique d'une souris (Samuel *et al.*, 2001).

Il regroupe environ 200 espèces de coccidies à cycle hétéroxène, formant des kystes tissulaires. Certaines espèces sont encore non caractérisées pour l'instant. Les espèces du genre *Sarcocystis* sont des parasites d'une grande variété de vertébrés (mammifères, oiseaux, reptiles et poissons). L'hôte définitif est un carnivore ou un omnivore et l'hôte intermédiaire est un herbivore ou un omnivore. Les espèces diffèrent par leur cycle, leur spécificité d'hôte (chaque espèce est associée à un couple HI/HD spécifique), leur morphologie et leur pathogénicité. La répartition du genre est mondiale, mais certaines espèces sont limitées à une zone géographique particulière en fonction de la présence de leur hôte définitif (par exemple, *S. neurona*, dont l'hôte définitif est l'opossum (*Didelphis* sp.), ne se retrouve qu'en Amérique).

La sarcosporidiose (également appelée sarcocystose) est très fréquente chez tous les animaux de rente, en particulier chez les bovins et les porcs. Deux espèces présentent un risque zoonotique : *S. bovi-hominis* et *S. sui-hominis*.

2.4.2 Description des formes infectantes du parasite

2.4.2.1 *Les oocystes*

Les oocystes, résultat de la reproduction sexuée chez l'hôte définitif, sporulent au niveau de la *lamina propria* de l'intestin grêle. Les oocystes sporulés sont généralement incolores, ont une paroi très fine (< 1 µm) et contiennent deux sporocystes allongés (11-20 x 8-16 µm selon les espèces) (Bussiéras et Chermette, 1992).

Chaque sporocyste contient quatre sporozoïtes allongés et un résidu granuleux, qui peut être compact ou dispersé. Chaque sporozoïte possède un noyau en position centrale ou en périphérie, plusieurs granules cytoplasmiques et un corps cristalloïde (Samuel *et al.*, 2001).

La paroi de l'oocyste est très fine et se rompt fréquemment. Les sporocystes sont alors libérés et peuvent être observés directement dans les matières fécales. Les oocystes et les sporocystes sont viables pendant des mois dans l'environnement. Comme ils sont excrétés sous une forme directement infectante, ils ne dépendent pas des conditions environnementales pour la sporulation.

2.4.2.2 *Les bradyzoïtes*

Les bradyzoïtes représentent la forme de contamination des hôtes définitifs. Ils sont logés au sein des muscles lisses et striés des hôtes intermédiaires dans des kystes.

Les kystes tissulaires (également nommés sarcocystes ou tubes de Miescher) ont des dimensions très variables, de quelques microns à plusieurs millimètres, selon l'espèce et l'état de développement. Ils se forment à l'intérieur d'une fibre musculaire et sont entourés d'une paroi kystique primaire, hérissée extérieurement de protubérances et tapissée intérieurement d'une substance basale granuleuse, à l'origine de cloisons dans la cavité interne, divisant cette dernière en logettes. Celles-ci sont remplies de mérocytes, présents en périphérie du kyste, se multipliant par endodyogénie et de bradyzoïtes, situés vers le centre, qui ne se multiplient plus et qui constituent la forme infectante pour l'hôte définitif. Les sarcocystes immatures contenant uniquement des mérocytes ne sont pas infectants (Bussiéras et Chermette, 1992).

Les bradyzoïtes ont une forme de croissant. Ils contiennent des granules d'amylopectine bien visibles et qui deviennent rouge vif sous la coloration à l'acide périodique de Schiff (Samuel *et al.*, 2001).

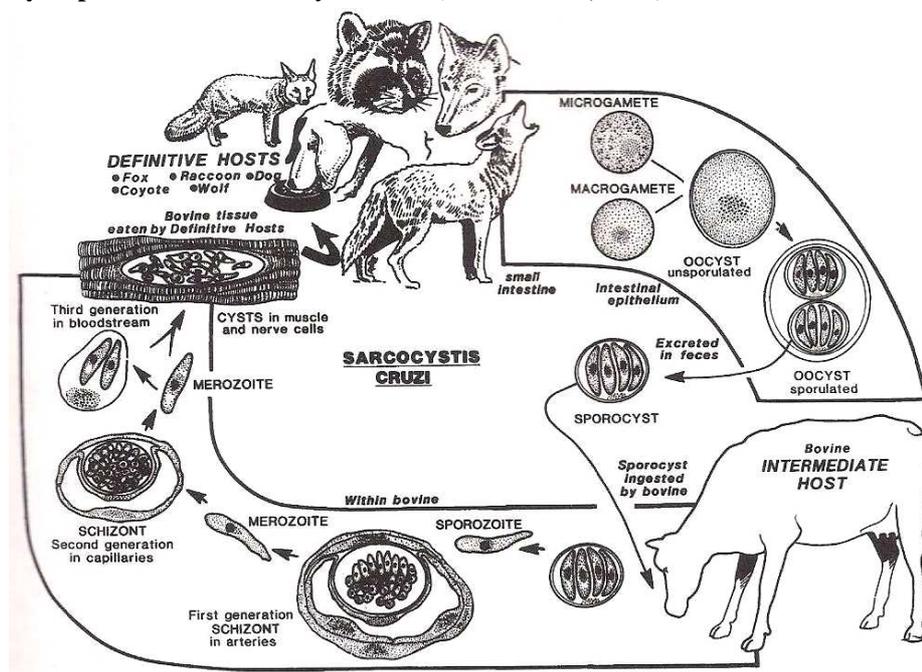
La taille des kystes dépend de l'espèce : elle est en moyenne de 100  m de diamètre, pour 400 à 700  m de longueur. Les kystes peuvent confluer, se regrouper et former des lésions visibles à l'œil nu (Institut de l'élevage, 2008).

Les kystes sont très résistants, ils sont détruits par la congélation ou par la cuisson à 65-70 C, en revanche ils résistent aux désinfectants (Samuel *et al.*, 2001).

2.4.3 Cycle parasitaire et modes d'infection

Sarcocystis spp. regroupe des protozoaires intracellulaires obligatoires, qui présentent un cycle coccidien classique, consistant en l'alternance des phases de schizogonie (ou mérogonie), gam togenie et sporogonie. La multiplication asexuée par schizogonie et la formation des kystes tissulaires ont lieu chez l'hôte intermédiaire, tandis que la reproduction sexuée (gam togenie) et la sporogonie se déroulent chez l'hôte définitif. La sporogonie entraine la formation de sporocystes résistants, libérés dans l'environnement *via* les fèces de l'hôte définitif. Le cycle de *Sarcocystis cruzi* est résumé sur la figure 35.

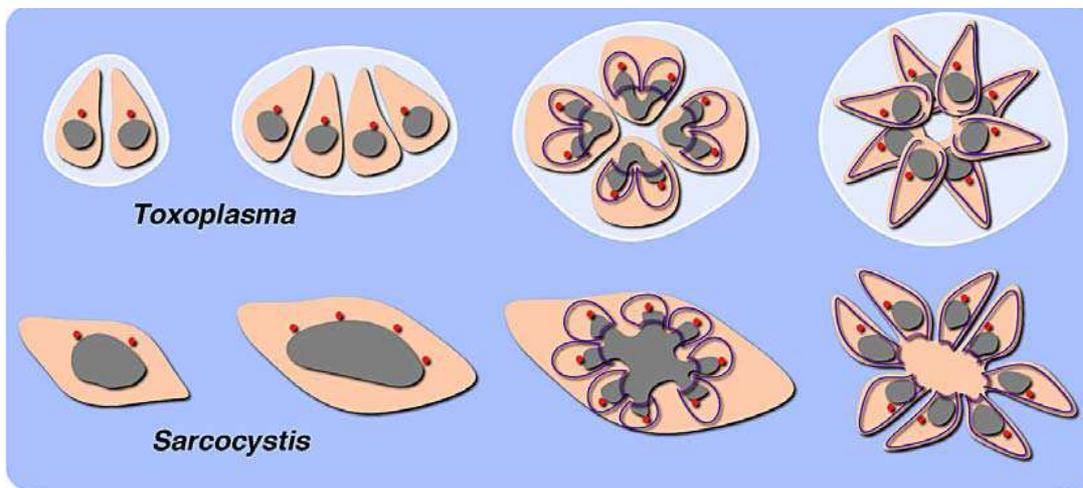
Figure 35. Cycle parasitaire de *Sarcocystis cruzi* (Samuel *et al.*, 2001)



L'hôte intermédiaire (généralement un herbivore ou un omnivore) s'infecte par ingestion d'eau ou de nourriture contaminés par des sporocystes spécifiques de son espèce, qui libèrent des sporozoïtes dans l'intestin grêle. Ceux-ci vont pénétrer dans la paroi intestinale puis dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Le parasite se multiplie par reproduction asexuée d'abord dans les tissus endothéliaux des vaisseaux et enfin dans l'organe cible (musculature striée principalement). La première phase de multiplication rapide conduit à la formation de tachyzoïtes dans l'endothélium vasculaire. Ceux-ci se transforment ensuite en métrocytes par multiplication lente, qui s'accumulent dans la cellule sans la détruire, la paroi s'épaissit et conduit à la formation d'un kyste tissulaire (sarcocyste ou tube de Miesher) immature. Les métrocytes se transforment ensuite en bradyzoïtes, le kyste devient mature. Les sarcocystes sont résistants et constituent la voie de contamination pour les hôtes définitifs. Ils contiennent plusieurs milliers, voire millions, de bradyzoïtes.

Les caractéristiques de la reproduction asexuée diffèrent de celle de *T. gondii* (figure 36). Ceci peut être utilisé pour la distinction de ces parasites en microscopie. Les divisions de *T. gondii* se font par endodyogénies, c'est-à-dire que les deux nouveaux parasites sont formés suite à une division latérale du cytoplasme de la cellule mère. Les schizogonies de *S. neurona* s'effectuent quant à elles par endopolygénies : le noyau forme des lobulations et se divise en de nombreux noyaux (jusqu'à 37), puis les cellules filles (tachyzoïtes ou mérozoïtes) bourgeonnent à la surface de la cellule mère, ce qui forme une rosette.

Figure 36. Comparaison de la reproduction asexuée par endodyogénie pour *Toxoplasma* et par endopolygénie pour *Sarcocystis* (Striepen *et al.*, 2007)



Lorsqu'un hôte définitif carnivore ingère de la viande contaminée, les bradyzoïtes contenus dans les kystes sont libérés dans l'intestin et s'installent dans la paroi intestinale. Les parasites s'y multiplient, forment des microgamontes et des macrogamontes et la reproduction sexuée s'achève par la formation d'oocystes qui sporulent dans l'intestin. Comme la paroi des oocystes est fine, il arrive fréquemment qu'elle se rompe, ce qui libère les sporocystes dans la lumière intestinale. Les oocystes ou les sporocystes sont éliminés sporadiquement avec les matières fécales pendant plusieurs mois. Les périodes patente et prépatente varient, mais pour la plupart des espèces, les oocystes commencent à être éliminés dans les fèces entre 7 et 14 jours après l'ingestion du parasite (Samuel *et al.*, 2001).

2.4.4 Pathologie

2.4.4.1 Symptômes

La sarcocystose intestinale est généralement subclinique. On peut observer des nausées, des douleurs abdominales, de l'anorexie, de la diarrhée, des trémulations musculaires, de la prostration.

La sarcocystose musculaire est le plus souvent asymptomatique ; dans quelques cas, on peut observer faiblesse musculaire, myosite éosinophilique (chez les bovins), périartérite ainsi que tuméfaction sous-cutanée. Dans l'espèce équine, *S. neurona* est responsable de l'encéphalomyélite équine (ou EPM : equine protozoal myeloencephalitis).

Chez les hôtes intermédiaires, les espèces virulentes du genre *Sarcocystis* peuvent conduire à des symptômes aigus lors des premiers stades de l'infection. La sévérité des signes cliniques dépend de la dose de sporocystes ingérés et du statut immunitaire de l'hôte. Les espèces affectant les moutons, chèvres et bovins semblent être les plus virulentes.

Les signes d'une infection aiguë sont les suivants : diathèse hémorragique (troubles de la coagulation), encéphalite et encéphalomyélite, pouvant conduire au décès de l'animal. Chez les femelles gestantes, on observe fréquemment des avortements, des naissances prématurées ou des mort-nés.

Les animaux qui résistent à une première infection acquièrent généralement une immunité qui les protégera lors d'une future réinfection par une espèce homologue, mais pas en cas d'infection par une espèce virulente hétérologue (Ortega-Mora *et al.*, 2007).

Les sarcosporidies ne sont en général pas pathogènes pour les carnivores. Il peut être observé une diarrhée, bénigne, passagère, sans hyperthermie qui rétrocede d'elle-même en quelques jours.

2.4.4.2 Lésions

Lors d'une infection aiguë, on peut observer des zones inflammatoires dans le système nerveux central (méningoencéphalite non suppurée), avec parfois des lésions bien visibles dans la moelle épinière. Le cœur, la langue et le foie peuvent abriter une inflammation à cellules mononuclées, tandis que les muscles squelettiques, les poumons et les reins sont habituellement moins touchés (Ortega-Mora *et al.*, 2007). Des lésions hémorragiques sont observées chez les bovins ayant succombé à une sarcosporidiose aiguë (pétéchies sur les séreuses, ecchymoses myocardiques, adénites généralisées). On peut retrouver des nécroses, en particulier musculaires, cardiaques et rénales, souvent associées à des vasculites (Bussiéras et Chermette, 1992).

À l'abattoir, les carcasses d'animaux à sarcosporidiose latente présentent des kystes dans les muscles squelettiques, le myocarde et l'œsophage (Bussiéras et Chermette, 1992).

À l'examen microscopique, on peut retrouver les formes prolifératives des parasites, dans les cellules endothéliales des vaisseaux de la plupart des organes (Bussiéras et Chermette, 1992).

2.4.5 Diagnostic de laboratoire

Le diagnostic sérologique repose sur deux techniques principales : l'immunofluorescence indirecte (IFAT) et l'ELISA. La sensibilité de ces tests est très élevée dans les derniers stades d'une infection. Néanmoins, ils ne permettent pas de distinguer les différentes espèces du genre *Sarcocystis*. Les tests d'agglutination sont également utilisés (Samuel *et al.*, 2001).

Plusieurs méthodes de diagnostic direct peuvent être envisagées : histopathologie et immunohistochimie puis microscopie électronique pour effectuer le diagnostic différentiel avec *T. gondii*, détection de kystes tissulaires chez les hôtes intermédiaires, PCR.

L'isolement de kystes tissulaires intacts à partir de prélèvements musculaires est difficile. Si le taux d'infection est élevé, les kystes mesurant plus de 500 µm peuvent être isolés par dissection du muscle sous loupe binoculaire. L'écrasement des kystes permet d'observer les bradyzoïtes. La méthode la plus efficace est tout de même la digestion artificielle par la trypsine (Ortega-Mora *et al.*, 2007).

2.4.6 Transmission aux humains

L'Homme est l'hôte définitif de deux espèces : *S. bovi hominis* et *S. sui hominis*. L'être humain peut ingérer les kystes en consommant de la viande de boeuf ou de porc crue ou insuffisamment cuite. C'est l'une des zoonoses transmises par consommation de viande les plus fréquentes. La prévalence de *S. bovi hominis* est de 4 à 60 % selon les études chez les bovins. Elle entraîne chez l'Homme des troubles digestifs modérés, des douleurs abdominales et de la diarrhée, pouvant se prolonger durant 4 à 15 jours. Le cycle évolutif se poursuit par la contamination de l'environnement par les matières fécales humaines (Institut de l'Elevage, 2008).

La prophylaxie consiste à interrompre le cycle évolutif des parasites par prévention de l'infestation des animaux de rente en empêchant les contacts avec les déjections de carnivores et des humains. Pour cela, il est nécessaire de limiter la circulation des carnivores au sein des bâtiments d'élevage (pour restreindre la dispersion des sporocystes par les fèces) et des abattoirs (pour éviter l'ingestion de viande contaminée) (Institut de l'Elevage, 2008).

La prévention de l'infection de l'être humain consiste à éviter la consommation de viande de porc ou de boeuf crue ou saignante. La congélation de la viande (température à cœur de -20°C) ou la cuisson à cœur à 65 °C inactivent les kystes.

2.5 Caractères généraux des helminthes

Les helminthes, nom vernaculaire désignant les vers parasites, sont répartis en trois embranchements : les plathelminthes, vers plats divisés en deux classes (les trématodes, vers plats non segmentés et les cestodes, vers plats segmentés), les nématodes, vers ronds non segmentés, et les acanthocéphales.

Les nématodes sont recouverts d'une épaisse cuticule. Ils possèdent un tube digestif complet (bouche et anus), en revanche, ils ne possèdent ni appareil respiratoire (respiration par diffusion passive), ni appareil circulatoire, ni tunique musculaire. Ils peuvent mener une vie libre ou parasiter des plantes, des invertébrés ou des vertébrés (Bussiéras et Chermette, 1995).

2.6 *Trichinella* spp.

2.6.1 Importance de la trichinellose

La trichinellose est une helminthose non contagieuse, frappant divers mammifères, essentiellement des carnivores et des omnivores, dont l'espèce humaine, de répartition mondiale. Elle est notamment liée aux habitudes alimentaires (consommation de viande crue ou insuffisamment cuite). Elle est due à la présence et au développement de nématodes microscopiques du genre *Trichinella* dans l'intestin grêle à l'état adulte et dans les muscles striés du même hôte à l'état larvaire.

Elle ne provoque généralement pas l'apparition de symptômes nets chez les animaux, mais est à l'origine de lésions microscopiques typiques. L'Homme est très réceptif et cette maladie peut être à l'origine de troubles très graves, parfois mortels. La prévalence de la maladie est difficile à estimer, mais 11 millions de personnes dans le monde pourraient être infectées (Dupouy-Camet, 2000).

2.6.2 Position systématique

Le genre *Trichinella* appartient à l'embranchement des Nématodes, à la classe des *Enoplea*, à l'ordre des *Trichocephalida* et à la famille des *Trichinellidae*. Neuf espèces (*Trichinella spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *T. papuae*, *T. zimbabwensis*, *T. patagoniensis* n. sp.) et 3 génotypes (T6, T8 et T9) ont été décrits à ce jour dans le genre *Trichinella* selon leur distribution géographique, leurs propriétés biologiques, leur morphologie et différents marqueurs génétiques (Kapel, 2000 ; Pozio et Zarlenga, 2005 ; Krivokapich *et al.*, 2012)

Les trichines sont des vers de forme cylindrique, ayant un pseudocoelome, un tube digestif individualisé et des sexes séparés. Les femelles sont vivipares et les mâles sont dépourvus de spicule.

2.6.3 Répartition et espèces affectées

Les espèces les plus fréquentes en Europe sont *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. nativa* et *T. pseudospiralis*.

T. spiralis (T1) est l'espèce la plus fréquente, retrouvée dans les pays tempérés d'Europe et d'Amérique du Nord. Elle infeste essentiellement le porc domestique et certains rongeurs.

T. nativa (T2) se retrouve en zone arctique, surtout chez les morses, les phoques et les ours blancs. Les larves musculaires sont très résistantes au froid et à la congélation (-30°C pendant plusieurs semaines/mois) dans le muscle d'ours ou de morse.

T. britovi (T3) est la seconde espèce rencontrée en Europe, surtout chez les renards, mais aussi chez d'autres carnivores, ainsi que chez le sanglier, le porc, le cheval et l'homme.

T. pseudospiralis (T4) se distingue de *T. spiralis* par l'absence de kyste autour des larves musculaires (pas de formation de la capsule de collagène à la périphérie de la cellule nourricière) ainsi que la possibilité d'infester les oiseaux. Cette espèce est cosmopolite et a été identifiée dans les monts du Caucase, en Asie centrale, en Espagne, en Amérique et en Australie.

T. murelli (T5) est isolée en Amérique du Nord, principalement dans la faune sauvage, parfois chez le cheval et l'Homme. Son pouvoir infectieux chez le porc est limité.

T. nelsoni (T7) est une espèce parasite de carnivores et d'omnivores (phacochères (*Phacochoerus africanus*)) d'Afrique tropicale. On ne la trouve jamais chez le porc domestique ou les rongeurs. Contrairement à *T. nativa*, cette espèce est très sensible au froid mais possède une forte résistance à la putréfaction à des températures élevées (> 40°C).

Les autres espèces ont une localisation géographique très limitée.

Actuellement, en France, on retrouve des trichines dans la faune sauvage (sangliers (*Sus scrofa*), renards, belettes (*Mustella nivalis*), rats gris (*Rattus norvegicus*), campagnols et musaraignes). Au niveau des mammifères domestiques, le chien est rarement touché, le porc parfois (provenant d'élevages plein air). Des chevaux venus d'Europe de l'Est peuvent exceptionnellement être infestés.

2.6.4 Cycle parasitaire et modes d'infection

Nous décrivons le cycle de *Trichinella spiralis* comme exemple type du cycle de *Trichinella* spp (figure 38).

Les adultes vivent dans l'intestin grêle, surtout le jejunum, chez des mammifères ; les femelles sont deux fois plus abondantes que les mâles.

Le cycle évolutif fait intervenir un seul hôte, successivement hôte définitif, qui héberge les parasites adultes dans sa muqueuse intestinale, puis hôte intermédiaire avec

apparition de larves infestantes, parasites des fibres musculaires striées. Le cycle s'effectue par conséquent sans passage dans le milieu extérieur (de Bruyne *et al.*, 2006).

L'infestation débute par l'ingestion de viande crue ou faiblement cuite contenant le parasite encapsulé dans sa cellule nourricière. Le kyste est dissous sous l'action du suc gastrique, ce qui libère la larve L1 musculaire. Celle-ci pénètre dans l'épithélium intestinal. Elle y provoque la fusion d'une centaine d'entérocytes, qui donnent un *syncytium*, où s'installe la larve (Bussiéras et Chermette, 1995).

Dans les 30 heures suivant l'invasion, les larves effectuent les 4 mues habituelles des Nématodes et deviennent adultes. Les adultes femelles mesurent jusqu'à 3 mm de longueur et ont un diamètre de 36 μm . Les mâles adultes ont un diamètre semblable à celui des femelles, mais sont légèrement plus courts (entre 1,0 et 1,5 mm). Les accouplements ont lieu dans la lumière intestinale, dans les 3 jours suivant l'infestation. Les mâles succombent et les femelles fécondées s'enfoncent dans la muqueuse, particulièrement dans les formations lymphoïdes (plaques de Peyer, etc.). La ponte commence deux jours après l'accouplement et dure 5-6 semaines. Les œufs éclosent avant la ponte, les femelles produisent des larves L1 nouveau-nées (L1NN), pourvues d'un petit éperon céphalique. Ce premier stade mesure 0,08 mm de long et 7 μm de diamètre. Chaque femelle donne naissance en moyenne à 1500 larves.

Les L1NN migrent par voie sanguine ou lymphatique, ou même par la cavité péritonéale, puis passent par le cœur droit, les poumons, le cœur gauche (atteint en 1 à 4 semaines), qui les disperse dans la circulation générale. C'est le seul stade parasitaire « libre » non présent dans le cytoplasme d'une cellule.

Celles qui atteignent des muscles striés (les muscles les plus irrigués sont généralement les plus infestés) pourront poursuivre leur développement. En effet, dans ce cas, la larve quitte les vaisseaux et pénètre à l'intérieur d'une fibre musculaire, qui survit, perd sa fonction et se transforme en cellule nourricière. On observe alors une augmentation du nombre et une hypertrophie des noyaux qui deviennent plus centraux. La cellule perd ses caractères de cellule musculaire : diverses protéines des myofibrilles ne sont plus décelables ; une capsule de collagène ainsi qu'un réseau vasculaire entourant la cellule se développent ; les activités enzymatiques augmentent dans le cytoplasme (lysosomes, appareil de Golgi) (Bussiéras et Chermette, 1995).

La larve se développe rapidement, en s'enroulant en spirale (figure 37 a), sa croissance est terminée en 19 jours (0,8-1 mm x 30 μm). Il se produit ensuite un processus plus lent de synthèse de collagène pendant des mois, à l'origine d'une capsule épaisse de plusieurs microns. L'ensemble constitue alors un kyste trichineux (figure 37 b), en forme de citron et qui mesure en moyenne 400 x 250 μm . Le kyste est totalement formé en 3 mois, mais la larve est infectieuse dès le 15^{ème} jour suivant l'infestation, donc bien avant la formation du kyste. Plusieurs larves sont parfois présentes dans un même kyste. Les larves (au stade L1) y survivent pendant de nombreuses années, même après la mort de l'hôte (3 semaines, voire davantage, malgré la putréfaction).

Le passage à un nouvel hôte a lieu après ingestion par un mammifère réceptif d'un muscle parasité.

En résumé, les modes d'infestation sont essentiellement la voie buccale, par ingestion de larves infestantes présentes dans les muscles. Occasionnellement, il y a possibilité de passage des larves par voie placentaire ou dans le lait.

Figure 37. Stades infectieux de *T. spiralis* (photos ANSES)

- a) Larves L1 musculaires de *T. spiralis* collectées après digestion chlorhydrique de muscles infestés. Le parasite mesure environ 1 mm x 36 µm
- b) Larves L1M encapsulées. La cellule nourricière est bien visible.

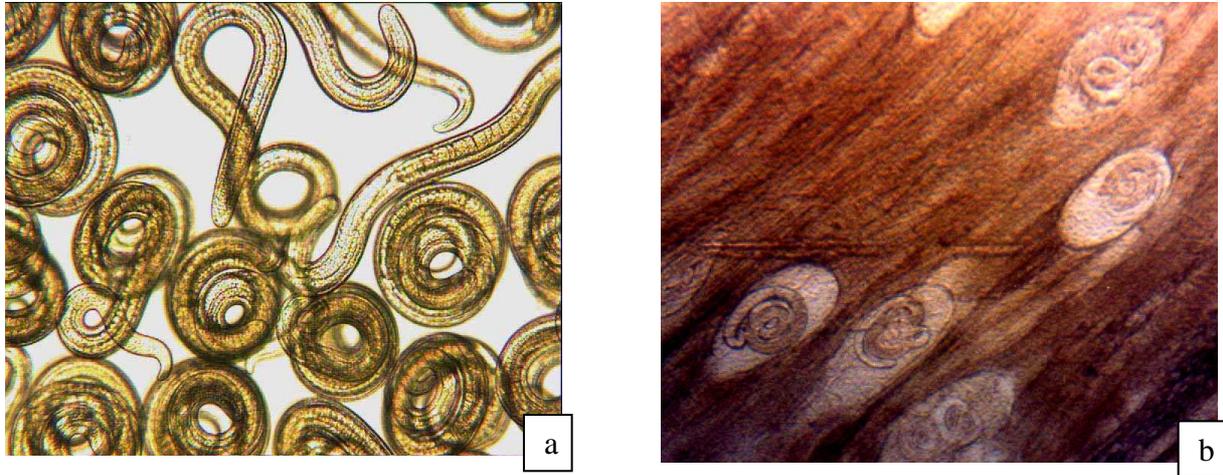
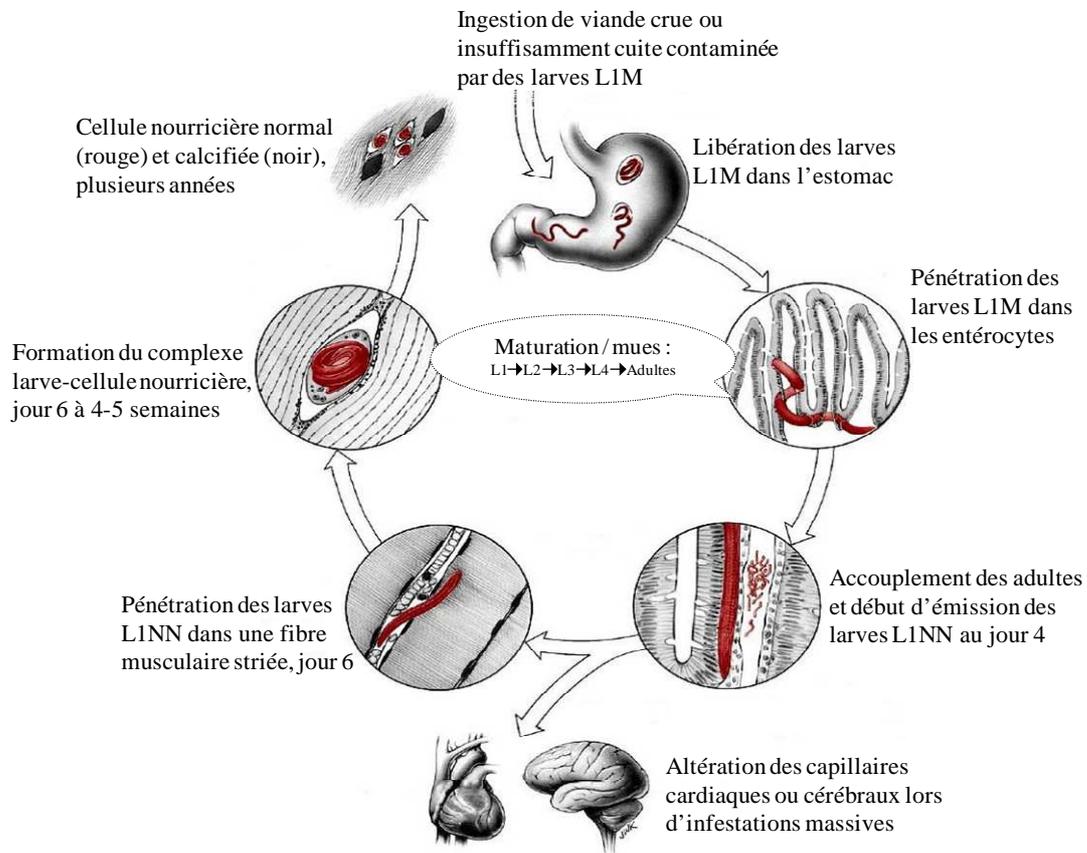


Figure 38. Cycle parasitaire de *T. spiralis* (Zocevic et al., 2010)



2.6.5 Épidémiologie

T. spiralis a été la première espèce identifiée dans la faune domestique (le porc), et toutes les autres espèces sont, à l'origine, des parasites de la faune sauvage. Il est fortement suspecté que la faune sauvage constitue un réservoir pour toutes les espèces de *Trichinella*.

2.6.5.1 Cycle sauvage

Le cycle sauvage est présent sur tous les continents. Des infestations naturelles par toutes les espèces de *Trichinella* ont été rapportées pour plus de 100 espèces de mammifères, 7 espèces aviaires et 3 espèces de reptiles. Les principales espèces animales impliquées sont les carnivores et les suidés omnivores (porcs sauvages et sangliers) (Gottstein *et al.*, 2009). Le principal facteur de transmission est la capacité de persistance des larves de *Trichinella* spp. dans les muscles des carcasses en décomposition. Le cycle sauvage peut être influencé par l'activité humaine, notamment lors de l'abandon de carcasses dans l'environnement après la chasse. Les régions ayant une population importante de sangliers ont un risque plus élevé de propagation du parasite à la faune sauvage et aux porcs « plein air », en contact étroit avec le milieu sauvage.

2.6.5.2 Cycle domestique

Le cycle domestique est lié à la contamination des porcs d'élevage, principale source de contamination humaine au niveau mondial. Les porcs domestiques dans les élevages non industrialisés se contaminent principalement suite à l'exposition non-intentionnelle à des carcasses de porcs ou d'animaux sauvages. Les animaux vivant au voisinage de l'Homme (rats, chiens, chats, renards, etc.) contribuent à favoriser les échanges entre les deux cycles épidémiologiques.

2.6.6 Pathologie

2.6.6.1 Symptômes

Ils sont discrets chez les animaux.

Chez le porc, l'infection est toujours asymptomatique, même à fortes doses infectantes.

Chez le chien, les vomissements sont fréquents au cours de la première phase, puis, lors de la seconde phase, on observe des troubles locomoteurs accompagnés d'une faiblesse générale, mais sans douleur.

2.6.6.2 Lésions

La trichinellose intestinale a peu d'intérêt vétérinaire ; elle provoque une entérite aiguë. Au contraire, la trichinellose musculaire est essentielle pour le vétérinaire, surtout dans le cas du porc. Il n'y a pratiquement rien de visible à l'œil nu, l'examen microscopique est donc nécessaire pour identifier la maladie. Les lésions se retrouvent au niveau des muscles les plus irrigués. Chez le porc, ce sont essentiellement les piliers du diaphragme, les muscles laryngiens, les muscles masticateurs, les intercostaux et la langue ; chez le cheval, l'infestation se fait surtout au niveau de la langue, des masséters et du diaphragme. On observe de petits kystes blancs, en forme de citron mesurant en moyenne 400 x 250 µm, allongés dans le sens des fibres. Les kystes sont généralement isolés (Bussiéras et Chermette, 1995).

2.6.7 Diagnostic de laboratoire

Chez l'Homme, le diagnostic épidémiologique est essentiel pour mettre en évidence une habitude du patient à la consommation de viande généralement peu cuite. Le diagnostic clinique est évoqué face à des douleurs musculaires, de la fièvre, un œdème de la face. Cependant, ces symptômes sont non spécifiques de la maladie et le diagnostic de laboratoire est nécessaire. Le diagnostic de certitude de la trichinellose inclut, selon les possibilités, le diagnostic parasitologique, le sérodiagnostic et l'identification par PCR.

Chez l'animal, le diagnostic direct par digestion artificielle est un examen de routine réglementé pour les carcasses de porcs à l'abattoir.

2.6.7.1 Diagnostic direct

- ✓ **Le diagnostic parasitologique** consiste à visualiser les larves de *Trichinella*. Cet examen est réalisé à partir d'une biopsie et demeure exceptionnel chez l'Homme étant donné le caractère invasif du prélèvement. Il est en revanche effectué régulièrement en *post-mortem* chez l'animal sur les carcasses d'abattoir. Il est fondé sur une digestion artificielle dans de la pepsine chlorhydrique. La recherche des larves s'effectue à la loupe binoculaire. La trichinelloscopie (écrasement de muscle entre deux lames et observation au microscope) est abandonnée, selon la législation, depuis 2006 en raison de son manque de sensibilité (règlement (CE) n° 2075/2005).
- ✓ **Le diagnostic par PCR** permet d'identifier de manière certaine l'espèce de parasite isolée. Le système le plus simple et le plus sensible décrit est la méthode par PCR multiplex qui permet d'identifier l'espèce en présence à partir d'une seule larve. (Gottstein *et al.*, 2009)

2.6.7.2 *Diagnostic indirect*

Les tests sérologiques indirects sont nombreux. Ils peuvent être effectués sur sérum ou sur fluide musculaire. Ils ne peuvent se substituer à l'inspection individuelle des carcasses mais peuvent être employés pour les enquêtes sérologiques chez les animaux domestiques et sauvages. Le délai de séroconversion est fonction de la dose de larves ingérées. En cas d'ingestion d'une dose élevée de parasites, les IgG apparaissent au bout de 2 à 3 semaines post-ingestion. De très nombreux tests ont été décrits mais les systèmes les plus performants demeurent l'ELISA et le Western blot (Gottstein *et al.*, 2009).

L'**ELISA** est la méthode utilisée habituellement car sa sensibilité est très élevée (elle permet de détecter une larve dans 100 g de muscle). Sa spécificité augmente beaucoup en utilisant des antigènes d'excrétion/sécrétion (Ag E/S). Ce test peut être positif dès la deuxième semaine post infestation chez l'Homme, mais généralement les réactions sérologiques ne sont clairement positives qu'un mois après l'infestation.

Le **Western blot** pratiqué avec de l'antigène total permet d'obtenir la meilleure spécificité. Cette technique est généralement utilisée comme test de confirmation pour les cas positifs ou pour exclure des faux-positifs.

2.6.8 La trichinellose humaine

La trichinellose est une des maladies zoonotiques les plus répandues dans le monde. D'après les rapports de 55 pays où la trichinellose est habituelle, le nombre total de cas cliniques par an serait de 10 000 et le taux de mortalité de 0,2 % (Gottstein *et al.*, 2009).

C'est une zoonose grave et très douloureuse, qui peut parfois conduire à la mort, pendant la phase intestinale ou la période des migrations larvaires. La maladie prend souvent l'allure d'une petite épidémie, affectant tous les consommateurs d'une même carcasse.

La prévalence est en relation stricte avec les pratiques alimentaires culturelles : la transmission se fait par consommation de viande crue ou peu cuite d'animaux domestiques (porc, cheval occasionnellement) ou sauvages (sanglier, phacochère, renard, phoque, ours, etc.).

On a dénombré 6500 cas cumulés en Europe sur 25 ans. Les pays européens ont des prévalences très contrastées en fonction des espèces susceptibles d'être contaminées par la trichine (porc, renard, cheval, sanglier...) et des habitudes culinaires. La pratique consistant à consommer la viande chevaline crue, spécifique à la France et à l'Italie, est à l'origine de la moitié des cas européens (Gottstein *et al.*, 2009). Depuis 25 ans, la plupart des cas ont été observés en France sous forme d'épidémies de plusieurs dizaines voire centaines de cas (1975, 1985, 1998), liées à la consommation de viande de cheval, provenant d'Europe de l'Est et du continent américain. Parmi les 2400 cas observés depuis 1975, cinq ont entraîné la mort. On a également dénombré des cas groupés liés à la consommation de viande de sanglier (Midi, Est de la France). La trichinellose humaine en tant que toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est une maladie à déclaration obligatoire (Ministère en charge de la santé, 2009). La France n'a plus connu de cas de trichinellose chez l'Homme liés à de la viande contrôlée depuis 1998. Depuis cette date, plus de 1000 cas humains ont été « évités » grâce à l'identification de viande contaminée avant consommation (2 chevaux, 9 porcs, plusieurs sangliers). Les cas autochtones survenant en France résultent de l'ingestion de viande non

contrôlée de sanglier et de porc dans une moindre mesure, mais les cas importés (cheval, sanglier, ours) ou contractés à l'étranger (suidés (Turquie, Égypte, Sénégal), Ours (Québec, Groenland) et chacal (un cas en Algérie)) sont les plus fréquents (ANSES, 2007).

La trichinellose constitue également un important problème de santé publique en Europe de l'Est (Roumanie) et du Sud, en Asie (Chine) et sur le continent américain ; des foyers endémiques existent en Afrique (Kenya), en Amérique du Sud (Chili) et en Asie du Sud (Thaïlande, Tanzanie) (Ministère en charge de la santé, 2009).

Les traitements sont quasi inexistantes chez les animaux. Chez les humains, les benzimidazoles sont actifs sur les vers adultes, mais très peu sont efficaces contre les larves enkystées. La prévention est donc essentielle.

La France a considérablement renforcé son système de prévention au niveau des abattoirs et s'est dotée, depuis 2002, d'un Centre national de référence des *Trichinella*. Les mesures prophylactiques consistent à éviter l'infestation des porcs par une dératisation, un enfouissement correct des carcasses et la stérilisation des déchets d'abattoir destinés aux porcs (ou à d'autres espèces). Par ailleurs, les vétérinaires jouent un rôle essentiel lors du contrôle sanitaire des viandes à l'abattoir : pour les porcs industriels, le dépistage est limité à un sondage portant sur une carcasse sur 1000, mais pour les porcs plein air, les chevaux et les sangliers, la recherche de trichinellose est obligatoire sur toutes les carcasses, par digestion artificielle.

Au niveau individuel, une cuisson suffisante de la viande (65°C pendant plus de 2 minutes, viande grise à cœur) est la méthode de prévention idéale. La congélation de la viande n'est pas suffisante pour éliminer tout risque de transmission de la trichinellose (Ministère en charge de la santé, 2009).

3 État des lieux de ces infections parasitaires chez les mammifères marins

3.1 Les infections à *T. gondii* chez les mammifères marins

3.1.1 Les cas rapportés de toxoplasmose chez des mammifères marins

3.1.1.1 Descriptions chez les Cétacés et chez les Pinnipèdes

Les descriptions de toxoplasmose sont nombreuses chez les mammifères marins et remontent à 1951. Il s'agissait le plus souvent de cas ponctuels observés sur des animaux captifs ou isolés.

Les premiers cas ont été rapportés chez des pinnipèdes : deux lions de mer de Californie (Ratcliffe et Worth, 1951 ; Migaki *et al.*, 1977), un jeune phoque veau-marin (Van Pelt et Dieterich, 1973), une otarie à fourrure du nord (Holshuh *et al.*, 1985), mais également chez un membre de l'ordre des Siréniens, le lamantin des Caraïbes (Buergelt et Bonde, 1983).

À partir de 1990, des cas sont décrits chez des cétacés : grands dauphins (Cruickshank *et al.*, 1990 ; Inskip *et al.*, 1990 ; Di Guardo *et al.*, 1995), dauphin à long bec (Migaki *et al.*, 1990), dauphins bleus et blancs (Domingo *et al.*, 1992 ; Di Guardo *et al.*, 1995), dauphin de Risso (Di Guardo *et al.*, 1995 ; Resendes *et al.*, 2002a), bélougas (Mikaelian *et al.*, 2000), etc. Tous ces cas sont résumés dans le tableau 2.

Ces animaux venaient aussi bien de l'océan Atlantique que Pacifique, certains étaient sauvages, d'autres retenus en captivité. Inskip *et al.* (1990) décrivent le cas d'une femelle grand dauphin de l'Atlantique, accompagnée par son petit. Les deux individus révèlent à l'autopsie une toxoplasmose, le delphineau s'est probablement infecté suite au passage transplacentaire du parasite. Le premier cas de toxoplasmose congénitale confirmée a été décrit (Jardine et Dubey, 2002) chez un grand dauphin du Pacifique maintenu en captivité, qui a donné naissance à un foetus mort-né. Miller *et al.* (2008a) ont également décrit un autre cas chez une loutre de mer nouveau-né.

La toxoplasmose semblait être dans certains cas la cause même de la mort. Migaki *et al.*, (1990) décrivent le cas d'un dauphin à long bec présentant une toxoplasmose disséminée fatale. Au contraire, le jeune phoque veau-marin décrit par Van Pelt et Dieterich (1973) était sujet à la fois à la toxoplasmose et à une infection à Staphylocoques. Cette dernière pourrait avoir conduit à l'exacerbation de la prolifération du parasite. Des cas sont également décrits en association avec le *Morbillivirus* (Domingo *et al.*, 1992 ; Di Guardo *et al.*, 1995).

Tableau 2. Résumé des principaux cas cliniques rapportés de toxoplasmose chez les mammifères marins (d'après Dubey *et al.*, 2003)

Espèces	Pays	Remarques	Références
Pinnipèdes			
Lion de mer captif	États-Unis d'Amérique (Pennsylvanie)	Dix ans, toxoplasmose disséminée	Ratcliffe et Worth, 1951
Phoque veau-marin sauvage	États-Unis d'Amérique	Un an, hépatite	Van Pelt et Dieterich, 1973
Otarie à fourrure du nord sauvage	États-Unis d'Amérique (Californie)	Encéphalite	Holshuh <i>et al.</i> , 1985
Cétacés			
Grands dauphins sauvages	États-Unis d'Amérique (Floride)	Jeune mâle, hépatite	Cruickshank <i>et al.</i> , 1990
	États-Unis d'Amérique (Floride)	Femelle et son petit, toxoplasmose disséminée	Inskeep <i>et al.</i> , 1990
	Italie	Deux adultes	Di Guardo <i>et al.</i> , 1995
	Australie	Fœtus mort-né, myocardite, encéphalite	Jardine et Dubey, 2002
Dauphins bleu et blanc sauvages	Espagne	Lymphadénopathie, encéphalite chez 4 dauphins échoués sur 110	Domingo <i>et al.</i> , 1992
	Italie	Quatre adultes, encéphalite et co-infection avec le <i>Morbillivirus</i>	Di Guardo <i>et al.</i> , 1995
Dauphins de Risso sauvages	Espagne	Femelle et son petit, toxoplasmose disséminée	Di Guardo <i>et al.</i> , 1995
	Italie	Un adulte	Resendes <i>et al.</i> , 2002a
Bélouga	Canada	Six mois, encéphalite	Mikaelian <i>et al.</i> , 2000
Siréniens			
Lamantin des Caraïbes	États-Unis d'Amérique (Floride)	Encéphalite	Buergelt et Bonde, 1983

3.1.1.2 Signes cliniques observés lors de toxoplasmose chez les mammifères marins

L'importance clinique des infections à *T. gondii* est significativement plus importante chez les cétacés et les loutres de mer. Au contraire, les phoques et otaries sont rarement malades et les symptômes sont associés la plupart du temps à une maladie concomitante ou à une immunosuppression. Aucun cas de mortalité de mysticète n'a été relié à une infection à *T. gondii* jusqu'à présent, ce qui peut être le reflet de la faible susceptibilité de ces espèces à ce parasite ou de la difficulté d'obtenir des échantillons adéquats lors des autopsies sur de si grands animaux.

Pour une grande partie des mammifères marins échoués présentant une infection à protozoaires, les données cliniques ne sont pas disponibles puisque ces animaux sont déjà décédés ou bien meurent très rapidement après l'échouage. Néanmoins, le long de la côte Pacifique d'Amérique du Nord, les cas rapportés d'échouages de mammifères marins vivants et infectés par *T. gondii* ou *S. neurona* sont courants (Miller, 2007).

Les signes cliniques les plus fréquents sont les suivants : atteintes générale (anorexie, dépression, hyperthermie, lymphadénopathie), hépatique (ictère), cardiaque (arythmies, tachycardie, pouls filant, symptômes d'insuffisance cardiaque avec ascite, œdème pulmonaire...). Des avortements, des mort-nés et des mortalités néonatales sont également observés en cas de transmission transplacentaire du parasite.

Les atteintes neurologiques sont souvent les signes les plus visibles : cécité, mydriase, épisodes soudains d'arrêt d'activité, absence ou augmentation des comportements d'agression, comportements stéréotypiques, déficits ambulatoires et de proprioception, ataxie, parésie et paralysie, trémulations musculaires, convulsions et coma (Miller, 2007).

Des infections latentes à *T. gondii* auraient par ailleurs été réactivées lors des épidémies de *Morbillivirus*, augmentant la sévérité de l'infection virale et le taux de mortalité.

3.1.1.3 Lésions observées à l'autopsie

À l'autopsie, les lésions les plus fréquemment rencontrées sont une lymphadénopathie et une splénomégalie. On peut également observer les lésions suivantes : œdème pulmonaire et pneumonie interstitielle (lors d'insuffisance cardiaque), atrophie musculaire, distension vésicale, congestion généralisée des organes (notamment les poumons, les méninges et le cerveau) (Miller, 2007).

3.1.1.4 Lésions observées à l'examen microscopique

À l'examen microscopique, les lésions de méningoencéphalite sont les plus fréquemment rapportées. Des kystes tissulaires à paroi fine sont observés en histopathologie, accompagnés d'infections chroniques ou recrudescences. Cependant, ces kystes ne sont pas rapportés comme étant à l'origine de la réponse inflammatoire et sont parfois observés dans des zones sans infiltrats inflammatoires à proximité. Lorsqu'ils sont présents, ces infiltrats se présentent sous forme de larges nodules inflammatoires dispersés au hasard au niveau du cerveau et du cervelet. Les nodules sont composés d'un centre nécrosé associé à une gliose,

des cavitations et des minéralisations. Les parasites (kystes à bradyzoïtes ou tachyzoïtes) se concentrent en périphérie des lésions (Miller, 2007).

D'autres lésions sont rapportées : myosites ou myocardites non suppurées, nécroses musculaires, pneumonies interstitielles et œdèmes, gastroentérites, nécroses des organes lymphatiques (nœuds lymphatiques, thymus et rate).

Les parasites sont généralement observés dans le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques, les glandes surrénales, les poumons et les organes lymphoïdes. La présence de tachyzoïtes au niveau des nœuds lymphatiques, des poumons, du foie ou de la rate associée à une faible prévalence de kystes est en faveur d'une exposition récente (Miller, 2007).

3.1.1.5 Lésions observées chez le fœtus lors d'infection transplacentaire

Peu d'informations sont disponibles sur le placenta des femelles gestantes, cependant on sait que les infections à *T. gondii* des fœtus ou nouveau-nés peuvent conduire à des toxoplasmoses disséminées aiguës et sévères (Miller, 2007).

La première description d'infection transplacentaire a eu lieu chez une femelle grand dauphin accompagnée par son delphineau (Inskeep *et al.*, 1990). Les deux animaux se sont échoués et sont décédés malgré les soins. À l'autopsie, le jeune présentait une pneumonie sévère, une lymphadénopathie, ainsi qu'un foie hypertrophié et décoloré. *T. gondii* a été identifié à l'immunohistochimie chez les deux dauphins. Le parasite était associé à une nécrose lymphoïde.

Jardine et Dubey (2002) rapportent le cas d'un grand dauphin mort-né, présentant de multiples zones de nécrose au niveau du myocarde caractérisées par une fragmentation des fibres musculaires et une lyse associée à une inflammation non suppurée. Des protozoaires étaient présents dans les tissus voisins ainsi que dans le cerveau, où ils ont mis en évidence une encéphalite nécrotique multifocale non suppurée. Des kystes à bradyzoïtes ainsi que des tachyzoïtes ont été observés en association étroite avec les lésions, le plus fréquemment en périphérie de ces lésions.

Resendes *et al.* (2002a) rapportent un autre cas de transmission transplacentaire chez un dauphin de Risso. Le fœtus présentait des zones de coagulation et de nécrose au niveau des reins, des poumons et du cœur. La plupart des lésions étaient associées à des tachyzoïtes et des kystes tissulaires à *T. gondii*.

3.1.1.6 Cas particulier des loutres de mer de Californie (*Enhydra lutris nereis*)

La loutre de mer appartient à la famille des mustélidés et à l'ordre des carnivores, au même titre que les pinnipèdes et l'ours blanc.

C'est la plus aquatique et la plus massive des loutres, la seule à pouvoir vivre en permanence dans la mer. Chassées intensivement pour leur fourrure à partir de 1741, la population mondiale a considérablement diminué et l'espèce est légalement protégée depuis 1911. La CITES (Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction ou Convention de Washington) a placé la sous-espèce de Californie (*Enhydra lutris nereis*) en annexe I (espèces menacées d'extinction), les deux autres sous-espèces sont classées en annexe II (espèces pas nécessairement menacées

d'extinction actuellement, mais qui pourraient le devenir si le commerce de leurs spécimens n'était pas étroitement contrôlé).

La sous-espèce de Californie n'ayant pas été capable de retrouver un taux de croissance comparable aux autres sous-espèces depuis la mise en place des mesures de protection, de nombreux scientifiques se sont intéressés à la population et aux dangers la menaçant *via* des études sérologiques et nécropsiques. C'est dans cette espèce que la toxoplasmose est la plus documentée.

On considère que les méningoencéphalites à protozoaires sont une importante cause de mortalité dans la population de loutres de mer de Californie. La première description a été faite par Thomas et Cole (1996). Ils ont mis en évidence que 38,5 % des cas de mortalité étaient dus à une infection (parasitaire, mycosique ou bien bactérienne), les encéphalites à protozoaires étant impliquées dans 8,5 % des cas. Celles-ci peuvent être dues à *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis neurona* ou bien à l'association des deux protozoaires.

Cole *et al.* (2000) ont isolé *T. gondii* chez 15 des 67 loutres de mer testées par cultures cellulaires puis bio-essai sur souris et chats. Les 15 individus présentaient une méningoencéphalite, mais à l'exception de 2 cas où l'infection était très sévère, la toxoplasmose n'était pas responsable de la mort. Une étude (Miller *et al.*, 2004) a permis d'isoler *T. gondii* chez 33 loutres. Parmi celles-ci, les auteurs ont considéré que les méningoencéphalites dues à *T. gondii* étaient la cause principale du décès pour 12 loutres et une cause primaire ou ayant contribué au décès pour 18 loutres.

Kreuder *et al.* (2003) ont autopsié 105 carcasses de loutres de mer. Dans cette étude, les maladies infectieuses étaient la cause principale de la mort dans 63,8 % des cas. Les encéphalites dues à *T. gondii* étaient l'une des deux causes majeures ayant conduit au décès de l'animal. Dans 16,2 % des cas, l'encéphalite à *T. gondii* était la cause primaire et dans 11,4 % des cas, c'était un facteur ayant contribué au décès. Les encéphalites à *Sarcocystis neurona* avaient causé la mort de l'animal dans 6,7 % des cas. Ils ont observé d'autre part que l'infection par *T. gondii* accroissait le risque de maladie cardiaque (les loutres ayant une maladie cardiaque avaient 2,9 fois plus de risque d'être également infectées par *T. gondii* que les loutres sans cardiopathie). Par ailleurs, des attaques de requins ont été recensées dans 13,3 % des cas. Sur les 14 attaques, 8 loutres (soit 57 %) souffraient d'une encéphalite. Ainsi, les loutres atteintes par une encéphalite due à *T. gondii* avaient 3,7 fois plus de risques de succomber à une attaque de requin. Ceci pourrait être expliqué par des comportements anormaux observés chez les loutres souffrant d'une encéphalite, ainsi que par une moindre capacité à fuir lors de danger, comportements observés également chez les souris infectées, qui se laissent chasser plus facilement par les chats (Kreuder *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2002b).

3.1.2 Les enquêtes sérologiques

3.1.2.1 Méthodes de diagnostic sérologique utilisables chez les mammifères marins

Aucune étude comparative n'a été réalisée pour étudier la sensibilité et la spécificité des différents tests sérologiques chez les mammifères marins. Il a fallu se baser sur les études effectuées chez le porc (Dubey *et al.*, 1995; Dubey, 1997).

La seule méthode sérologique testée chez des mammifères marins est l'IFAT. La méthode a été testée et validée par comparaison avec l'immunohistochimie (Miller *et al.*, 2002b) sur 77 loutres autopsiées entre 1997 et 2001. Dans cette étude, 36 % des individus (28 sur 77) étaient positifs d'après l'immunohistochimie, alors que d'après l'IFAT, avec un seuil de 1/320, 61 % des loutres (47 sur 77) étaient séropositives. La spécificité était donc moyenne (67 %) puisque l'IFAT a donné lieu à 20 faux positifs, mais la sensibilité était très bonne (96 %). En fixant le seuil de positivité à 1/640, la spécificité aurait été un peu augmentée (75 %), mais au détriment de la sensibilité (82 %). C'est donc cette valeur de 1/320 qui a été retenue pour les études suivantes se basant sur l'utilisation de l'IFAT.

L'un des inconvénients de l'IFAT provient du fait que sa spécificité dépend du conjugué spécifique d'espèce. Dans cette étude, ils ont utilisé un conjugué anti-furet.

À l'inverse, la MAT est une méthode simple à mettre en œuvre : l'antigène est stable pendant des mois à 4°C et le test fonctionne chez toutes les espèces de mammifères et d'oiseaux infectés par *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2003).

Dans la plupart des études sérologiques effectuées chez les mammifères marins, c'est la MAT, l'ELISA ou bien l'IFAT qui ont été utilisées.

3.1.2.2 Enquêtes sérologiques chez les loutres de mer de Californie

L'IFAT a été testée et validée par comparaison avec l'immunohistochimie (Miller *et al.*, 2002b) (*cf.* partie précédente) sur 77 loutres autopsiées entre 1997 et 2001. D'après l'IFAT, avec un seuil de 1/320, 61 % des loutres (47 sur 77) étaient séropositives. Dans la deuxième partie de leur étude, les auteurs ont récupéré des échantillons sanguins entre 1997 et 2000 sur des loutres vivantes provenant de Californie, de l'état de Washington et d'Alaska. La séroprévalence chez les loutres vivantes de Californie était plus basse (29 sur 80 soit 36 %) que chez les loutres décédées évaluées dans la première partie de l'étude (61 %). Par ailleurs, cette valeur de séroprévalence était sensiblement comparable à celle de la population de loutres de Washington (8 sur 21, soit 38 %). En revanche, les 65 loutres provenant d'Alaska étaient séronégatives.

Une deuxième étude (Miller *et al.*, 2002a) a été menée en parallèle par les auteurs entre 1997 et 2001. Ils ont inclus 223 loutres dans cette enquête. Parmi celles-ci, 107 ont été retrouvées échouées et mortes sur les côtes de Californie et 116 ont été capturées vivantes afin de récupérer du sérum. La séroprévalence a été déterminée par l'IFAT avec un seuil de positivité de 1/320 comme défini dans l'étude précédente. La séroprévalence de 62 % chez les loutres décédées (66/107) était comparable à celle retrouvée dans l'étude précédente (61 %). Chez les loutres vivantes, la séroprévalence était plus élevée (42 % (49 sur 116) contre 36 %).

Dans une autre étude basée sur l'utilisation de la MAT entre 1992 et 2002 (Dubey *et al.*, 2003), les valeurs de séroprévalence sont encore plus élevées, puisque des anticorps anti-*T. gondii* ont été retrouvés chez 77 % (89/115) et 60 % (18/30) des loutres de mer respectivement mortes et vivantes, provenant aussi bien de Californie que de Washington.

Dans tous ces cas, si l'on compare les populations vivantes et mortes, on remarque que la prévalence du parasite *T. gondii* est plus importante dans les populations de loutres décédées. Ceci n'est guère étonnant si l'on se réfère à l'étude de Thomas et Cole (1996), considérant les encéphalites protozoaires comme une grande cause de mortalité chez les loutres.

3.1.2.3 Enquêtes sérologiques chez les Pinnipèdes

Des enquêtes sérologiques ont été réalisées sur des effectifs variables de pinnipèdes. Les études sont résumées dans le Tableau 3.

Tableau 3. Principales enquêtes de séroprévalence réalisées chez des Pinnipèdes

Espèces	Pays	Nombre d'animaux testés	Nombre de positifs et %	Test utilisé	Seuil de positivité	Références
Phoques veaux-marins	États-Unis d'Amérique (Washington)	380	29 (7,6 %)	MAT	1/25	(Lambourn <i>et al.</i> , 2001)
Lions de mer de Californie	États-Unis (Alaska)	27	8 (30 %)	MAT	1/25	(Dubey <i>et al.</i> , 2003)
	États-Unis d'Amérique (Californie)	18	11 (61 %)			
Phoques veaux-marins	États-Unis d'Amérique (Alaska)	311	51 (16 %)			
Phoques annelés		32	5 (16 %)			
Phoques barbus		8	4			
Phoques veaux-marins tachetés		9	1			
Morses		53	3 (6 %)			
Phoques à ruban		14	0			
Phoques gris	Canada	122	11 (9 %)	MAT	1/25	(Measures <i>et al.</i> , 2004)
Phoques veaux-marins		34	3 (9 %)			
Phoques à capuchon		60	1 (2 %)			
Phoques du Groenland		112	0			
Phoques veaux-marins	Japon	322	3 (1 %)	ELISA		(Fujii <i>et al.</i> , 2007)
Phoques veaux-marins tachetés		46	0			
Phoques à ruban		4	0			
Phoques barbus		1	0			

Espèces	Pays	Nombre d'animaux testés	Nombre de positifs et %	Test utilisé	Seuil de positivité	Références
Phoques gris	Royaume-Uni	32	7 (22 %)	MAT	1/25	(Cabezón <i>et al.</i> , 2011)
	France	15	4 (27 %)			
Phoques veaux-marins	Royaume-Uni	56	6 (5 %)			
Éléphants de mer	Antarctique	13	10 (77 %)	MAT	1/25	(Rengifo-Herrera <i>et al.</i> , 2012)
Phoques de Weddell		31	13 (42 %)			
Otaries à fourrure antarctique		165	4 (2 %)			
Phoques crabiers		2	1			
Lions de mer de Californie	Mexique (captivité)	4	2	MAT	1/25	(Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2012)

Une première étude de séroprévalence (Oksanen *et al.*, 1998) avait été réalisée chez différentes espèces du nord de l'Atlantique entre 1991 et 1996 (phoques du Groenland, phoques annelés, phoques à capuchon et baleines de Minke, représentant au total 645 individus) en utilisant la MAT. Aucun échantillon ne s'était révélé positif.

En revanche, toutes les études suivantes ont toujours mis en évidence la présence d'anticorps chez une ou plusieurs espèces étudiées, mais les prévalences ne sont pas toujours très élevées. Au sein d'une même espèce, des différences sont observées en fonction du lieu de prélèvement, avec parfois de grandes différences comme dans l'étude de Dubey *et al.* (2003). On remarque effectivement que seulement 30 % des lions de mers provenant d'Alaska répondent positivement alors que 61 % de la population de Californie est séropositive. Ce résultat est intéressant puisque les analyses ont été effectuées dans la même étude, on ne peut donc pas mettre en cause l'utilisation de différents protocoles qui auraient pu fausser le résultat.

C'est au sein des populations de phoques veaux-marins que le plus grand nombre d'individus a pu être testé (1103 individus au total). Trois études (Lambourn *et al.*, 2001 ; Dubey *et al.*, 2003 ; Fujii *et al.*, 2007) ont analysé chacune plus de 300 phoques de cette espèce et peuvent donc être considérées comme plus représentatives que les autres. On observe une différence de prévalence importante entre le Japon où seulement 3 individus sur 322 se sont révélés positifs, alors que les séroprévalences sont de 7,6 % dans l'état de Washington et de 16 % en Alaska. Une hypothèse pour expliquer ces différences pourrait être que l'ELISA utilisée dans l'étude de Fujii *et al.* (2007) est moins sensible que la MAT utilisée dans les autres études. La présence du parasite *T. gondii* pourrait être également plus limitée dans les eaux japonaises.

Une étude (Cabezón *et al.*, 2011) nous intéresse particulièrement puisqu'elle a recherché la séroprévalence de *T. gondii* chez 47 phoques gris et 56 phoques veaux-marins des côtes atlantiques du Royaume-Uni et de la France (15 phoques gris de Molène, Finistère) par MAT. L'étude a été menée entre 1998 et 2004. Des anticorps ont été retrouvés chez 14 des 103 phoques testés. Les résultats ont montré des valeurs de prévalence plus élevées chez les phoques gris (11 sur 47 soit 23 %) que veaux-marins (3 sur 56 soit 5 %).

À Molène, 4 des 15 phoques gris (27 %) étaient séropositifs. Par ailleurs, une augmentation de la séroprévalence a été observée entre 1999 et 2002 : les 6 échantillons de 1999 étaient négatifs alors que sur les 9 de 2002, 4 présentaient des anticorps (44 %). Aucune autre étude de ce genre n'a été réalisée en France jusqu'à présent, mais il semble probable que des anticorps anti-*T. gondii* puissent être détectés chez les pinnipèdes et peut-être également chez les cétacés des eaux françaises.

3.1.2.4 Enquêtes sérologiques chez les cétacés

De la même façon que chez les pinnipèdes, de nombreuses enquêtes sérologiques ont été réalisées chez les cétacés et sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4. Principales enquêtes de séroprévalence réalisées chez des cétacés

Espèces	Pays	Nombre d'animaux testés	Nombre de positifs et %	Test utilisé	Seuil de positivité	Références
Grands dauphins	États-Unis d'Amérique (Californie)	94	91 (97 %)	MAT	1/25	(Dubey <i>et al.</i> , 2003)
	États-Unis d'Amérique (Floride)	47	47(100 %)			
Bélugas	États-Unis d'Amérique (Californie)	3	0			
Grands dauphins	États-Unis d'Amérique (Californie et Floride)	146	146 (100 %)	MAT	1/25	(Dubey <i>et al.</i> , 2005)
Grands dauphins	États-Unis d'Amérique (Caroline du Sud)	49	26 (53 %)	MAT	1/25	(Dubey <i>et al.</i> , 2008)
Grands dauphins	Canada (captivité)	7	7	MAT	1/25	(Dubey <i>et al.</i> , 2009)
Grands dauphins	Mexique (captivité)	66	58 (88 %)	MAT	1/25	(Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2012)
Bélugas	Canada	22	6 (27 %)	MAT	1/25	(Mikaelian <i>et al.</i> , 2000)
Grands dauphins	Japon	58	8 (14 %)	LAT		(Omata <i>et al.</i> , 2005a)
Orques	Japon	8	0	LAT		(Omata <i>et al.</i> , 2006)

Espèces	Pays	Nombre d'animaux testés	Nombre de positifs et %	Test utilisé	Seuil de positivité	Références
Grands dauphins	Espagne	7	4	MAT	1/25	(Cabezón <i>et al.</i> , 2004)
Dauphins bleu et blanc		36	4 (11 %)			
Dauphins communs		4	2			
Marsouin commun		1	1			
Dauphins de Risso		9	0			
Globicéphale noir		1	0			
Dauphins bleu et blanc	Italie	8	4	IFAT	1/80	(Di Guardo <i>et al.</i> , 2009)
Dauphins communs	Royaume-Uni	21	6 (29 %)	Dye-Test	1/4	(Forman <i>et al.</i> , 2009)
Baleine à bosse		1	1			
Marsouins communs		70	1			

D'après le tableau 4, on remarque que, contrairement aux pinnipèdes, les séroprévalences peuvent être très élevées, particulièrement dans la population de grands dauphins en Californie et en Floride (jusqu'à 100 %). Dubey *et al.* (2005) ont comparé les valeurs qu'ils avaient obtenues par MAT à d'autres tests sérologiques (immunofluorescence indirecte, Dye Test et hémagglutination indirecte, ELISA et Western-Blot). Cela leur a permis de confirmer les valeurs de séroprévalence particulièrement élevées chez les grands dauphins dans cette région et de valider la sensibilité et la spécificité de la MAT chez les dauphins.

La séroprévalence est plus élevée au Japon chez les grands dauphins (Omata *et al.*, 2005a) que chez les phoques ; en revanche, aucun anticorps anti-*T. gondii* n'a été détecté chez les 8 orques testées (Omata *et al.*, 2006). Cette étude est intéressante puisqu'elle s'intéresse à l'infection de super prédateurs qui se nourrissent de mammifères marins, pouvant eux-mêmes être infectés par ces parasites. Des restes de phoques ont été retrouvés dans les contenus stomacaux de 6 de ces orques, ce qui conduit à deux hypothèses : soit les parasites sont peu présents chez les phoques de cette région (ce qui est le cas si l'on se réfère à l'étude de Fujii *et al.* (2007), soit les orques ont une résistance élevée à l'infection par ces parasites. Cette différence de susceptibilité au parasite chez les mammifères marins et terrestres a d'ailleurs été mise en évidence chez des phoques gris (Gajadhar *et al.*, 2004).

Deux études se sont intéressées aux mammifères marins élevés en captivité (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2012; Dubey *et al.*, 2009) et ont révélé des séroprévalences élevées chez les grands dauphins : 58 positifs sur les 66 grands dauphins analysés dans différents établissements du Mexique et 7 sur 7 grands dauphins d'un delphinarium du Canada. Dans la première étude, tous les animaux étaient en bonne santé et aucun cas clinique de toxoplasmose n'avait été rapporté dans ces établissements au cours des 15 dernières années. En revanche, au Canada, 2 des 7 individus sont morts et leurs cerveaux ont été analysés : ils présentaient tous les deux une encéphalite.

En Europe, plusieurs études ont été menées. La prévalence semble bien moins importante que celle observée aux États-Unis d'Amérique. L'étude de Di Guardo *et al.* (2009) est intéressante puisqu'elle s'est concentrée sur les causes de mortalité de 8 dauphins bleus et blancs échoués sur les côtes de Ligurie en Italie, entre août et décembre 2007. Le taux de mortalité était particulièrement élevé cette année-là. Il a été rapproché de l'épisode de 1990 correspondant à une épidémie provoquée par le *Morbillivirus*. Les auteurs ont analysé le sérum des 8 dauphins par IFAT. La moitié des 8 dauphins présentait des anticorps, néanmoins l'un d'entre eux n'avait pas atteint le seuil de 1/80. Ces 4 dauphins présentaient en parallèle des lésions de méningoencéphalite et des kystes ont été mis en évidence dans leur cerveau. Les sérums ont été également analysés pour rechercher des anticorps anti-*Morbillivirus*. Ces anticorps ne furent pas retrouvés chez les dauphins présentant une méningoencéphalite, mais chez les 4 autres dauphins. Cette absence d'infection par le *Morbillivirus* en parallèle suggère que *T. gondii* a joué un rôle primaire dans le développement de méningoencéphalites sévères chez ces 4 dauphins.

L'étude de Forman *et al.* (2009) est la première à démontrer la présence d'anticorps anti-*T. gondii* chez les cétacés dans les eaux britanniques. Par ailleurs, tous les individus positifs ont été découverts dans la Manche, au sud de l'Angleterre, ce qui suggère que des individus séropositifs pourraient être découverts dans le nord-ouest de la France.

3.1.3 Le génotypage des souches chez les mammifères marins

3.1.3.1 Chez les loutres de mer

Différentes études ont été menées chez les mammifères marins pour caractériser la souche de *T. gondii* lors d'infection. L'étude de Cole *et al.* (2000) a déterminé le génotype de 13 isolats de *T. gondii* retrouvés chez des loutres de mer par PCR/RFLP aux locus SAG1 et SAG2. Toutes appartenaient à la souche II. Néanmoins, ils ont mis en évidence deux allèles différents au locus SAG1, ce qui suggère que les isolats provenaient au moins de 2 sources différentes.

Un nouveau génotype a été mis en évidence par Miller *et al.* (2004). Ils ont analysé par PCR/RFLP 35 échantillons de loutres de mer de Californie et ont identifié deux génotypes : le type II et un nouveau génotype, qu'ils ont appelé X. Celui-ci était responsable de 60 % des infections. Parmi les 12 loutres chez qui la méningoencéphalite avait été classée comme une cause primaire de décès, 9 étaient infectées par le type X. Conrad *et al.* (2005) ont génotypé 15 nouveaux échantillons de loutres de mer. Les auteurs ont identifié uniquement le génotype X, ce qui porte à 38/50 (soit 72 %) le nombre de loutres présentant ce génotype atypique.

Sundar *et al.*, (2008) ont mis en évidence, en utilisant 10 PCR/RFLP, 3 génotypes de *T. gondii* chez 37 loutres de Californie et de Washington. Treize d'entre eux étaient de type II, 4 étaient de type X et 14 étaient d'un nouveau type, appelé type A.

3.1.3.2 Chez les phoques et les dauphins

Chez le dauphin, les infections proviennent essentiellement du type II. Dubey *et al.* (2007a) ont isolé le type II chez un dauphin bleu et blanc. En 2008, ils ont isolé *T. gondii* chez 3 grands dauphins et identifié le type II chez 2 d'entre eux (Dubey *et al.*, 2008). Le troisième

présentait un génotype unique, différent du type X isolé chez les loutres de mer. En 2009 (Dubey *et al.*, 2009), ils ont à nouveau isolé le type II chez un autre grand dauphin.

Di Guardo *et al.* (2011) ont génotypé trois dauphins bleus et blancs échoués sur les côtes italiennes en 2007-2008 qui présentaient une méningo-encéphalite et étaient séropositifs au 1/320^{ème} par IFAT. Ils ont retrouvé le type II chez un des dauphins et un type II atypique chez les deux autres dauphins. Néanmoins, les lésions cérébrales ne différaient pas dans les deux cas. Jusqu'à présent, les types I ou III n'ont pas été détectés chez des mammifères marins.

Concernant les pinnipèdes, Conrad *et al.* (2005) ont détecté le génotype X chez un lion de mer de Californie et un phoque veau-marin du Pacifique.

3.1.3.3 Émergence du type I chez les mammifères marins ?

La prévalence importante du type II est cependant remise en question par l'étude de Gibson *et al.* (2011), qui a mis en évidence une abondance de génotypes de *T. gondii* possédant les allèles de type I (45 % soit 37/85 mammifères marins testés), par PCR-RFLP. Ce type I est considéré pour l'instant comme étant très rare. Il présente une virulence très élevée sur les souris de laboratoire. Néanmoins, l'identification de ce type I au niveau du Nord-Ouest du Pacifique est cohérente avec la mise en évidence de ce même type lors d'une épidémie de toxoplasmose humaine en 1995 en Colombie britannique (Bowie *et al.*, 1997).

3.1.4 Modes de contamination chez les mammifères marins

Le mode de contamination des mammifères marins est intrigant car la plupart des espèces se nourrissent de poissons ou d'invertébrés, animaux à sang froid (or *T. gondii* ne se développe que chez les espèces homéothermes) ou sont exclusivement herbivores. L'ingestion de kystes *via* la viande est donc peu probable (Dubey *et al.*, 2003). Par ailleurs, la plupart des cétacés et pinnipèdes boivent très peu d'eau. La transmission la plus plausible serait donc l'ingestion d'oocystes rejetés par les chats sur le sol puis qui atteindraient l'eau de mer et pourraient être concentrés par des mollusques filtreurs ou des invertébrés ou bien transportés par des poissons.

3.1.4.1 Le rejet des oocystes dans l'eau de mer

Les oocystes proviendraient de leur rejet par les félidés sauvages et domestiques sur le sol, puis atteindraient l'eau de mer suite au lessivage des sols. Miller *et al.* (2002a) ont établi un lien entre la séropositivité des loutres de mer de Californie et l'écoulement de grandes quantités d'eaux douces. Ils ont démontré que le lessivage des sols par les pluies pourrait apporter des oocystes de *T. gondii* dans la mer, près du rivage.

Les oocystes peuvent aussi provenir des eaux usées contaminées par des chats. La présence de *T. gondii* dans les eaux usées pourrait être liée à l'évacuation des déjections des chats domestiques dans les réseaux urbains. Les stations d'épuration ne détruisent pas tous les oocystes toxoplasmiques et l'évacuation des rejets de certaines stations en mer conduirait à la contamination du milieu marin par des oocystes non sporulés. Un questionnaire a été adressé à 212 employés du Service National de Santé Publique du Pays de Galles et à l'université de

Swansea (Forman *et al.*, 2009) pour tester l'hypothèse selon laquelle la présence d'oocystes dans l'environnement pourrait provenir du rejet des matières fécales de chats dans les toilettes. Ils ont mis en évidence que 12 % des personnes ayant répondu avaient l'habitude de vider la litière de leur chat dans leurs toilettes. Ceci devrait être souligné afin de faire prendre conscience aux propriétaires d'animaux domestiques de la contamination environnementale qu'ils engendrent en agissant de la sorte (Fujii *et al.*, 2007).

L'impact dû au rejet des eaux usées non municipales, telles celles provenant de bateaux et rejetées en pleine mer n'a pas été évalué jusqu'à présent, mais pourrait être significatif. Des rongeurs, des chats ou de la terre contaminée pourraient également être présents à bord et contribuer à la contamination marine (Van Bresse *et al.*, 2009).

Dans l'étude de Cabezón *et al.* (2004), les espèces habituées à se rapprocher des côtes (grand dauphin et dauphin commun) avaient une séroprévalence significativement plus élevée (6/11, soit 54 %) que les espèces pélagiques, vivant plus au large (dauphins bleus et blancs et dauphins de Risso) (4/45, soit 9 %). L'habitat pourrait donc influencer la probabilité d'infection et les espèces se rapprochant des côtes seraient plus susceptibles d'être en contact avec des oocystes de chats rejetés dans la mer.

3.1.4.2 Etude expérimentale de la survie des oocystes dans l'eau de mer

Des études expérimentales ont eu pour objet d'étudier la sporulation puis la survie des oocystes sporulés dans l'eau de mer. Dans la première étude (Lindsay *et al.*, 2003), des oocystes non sporulés rejetés par des chats infectés expérimentalement ont été divisés en trois échantillons et placés dans une solution d'acide sulfurique à 2 % (témoin positif) ou une solution artificielle d'eau de mer à 15 ou 32 ppt de NaCl et laissés à incuber à 24°C. Au bout de trois jours de sporulation, la viabilité des oocystes a été testée en les faisant ingérer à des souris (2 souris pour chacun des 3 lots). Par ailleurs, des oocystes sporulés ont été conservés dans de l'eau de mer à 15 ppt de NaCl à 4°C ou bien à température ambiante puis ont été administrés à des souris au bout de 1, 2, 3 ou 6 mois de stockage. Les sérums des souris survivantes ont été analysés par MAT 6 à 8 semaines après l'ingestion. Ils ont observé que les oocystes avaient sporulé dans les 3 échantillons, de manière similaire dans les deux solutions d'eau de mer (le taux de sporulation atteignait 75 %). Les souris nourries par ces 3 lots d'oocystes ont toutes développé une toxoplasmose aiguë et sont décédées au bout de 6 à 8 jours. Les souris nourries par les oocystes sporulés conservés de 1 à 6 mois dans l'eau de mer, à 4°C ou bien à température ambiante, ont également développé une toxoplasmose aiguë. Ces résultats indiquent que les oocystes de *T. gondii* ont la capacité de sporuler dans l'eau de mer et d'être infectieux pour des hôtes intermédiaires. Par ailleurs, les oocystes sporulés peuvent survivre au moins 6 mois dans l'eau de mer et rester infectieux.

La seconde étude (Lindsay et Dubey, 2009) est partie de la conclusion de l'étude précédente. Ils ont voulu étudier la survie des oocystes dans l'eau de mer pendant une période supérieure à 6 mois. Les oocystes ont été conservés dans de l'eau de mer à 15 ppt de NaCl à 4°C ou à température ambiante pendant 12, 15, 18 ou 24 mois. Chaque lot a été administré à des souris. L'infectiosité des oocystes conservés à température ambiante a commencé à diminuer entre 15 et 18 mois de stockage. À 18 mois de conservation, seule une des 2 souris s'est infectée et à 24 mois, aucune des 2 souris ne s'est infectée. À l'inverse, les oocystes conservés jusqu'à 24 mois à 4°C sont restés infectieux pour les souris et toutes les souris sont mortes ou ont développé une toxoplasmose aiguë. En conclusion, les oocystes sporulés de *T.*

gondii ont la capacité de survivre dans l'eau de mer à 4°C pendant au mois 24 mois et à la température ambiante pendant 15 mois.

3.1.4.3 Etude expérimentale de la survie des oocystes dans les mollusques

La dilution inévitable que subissent les oocystes lors de leur entrée dans l'eau de mer a de grandes chances de conduire à des concentrations trop faibles pour pouvoir contaminer directement les mammifères marins.

Ainsi, des espèces aquatiques pourraient servir d'hôtes intermédiaires ou paraténiques en concentrant les oocystes de *T. gondii*. Les mollusques, tels les huîtres ou les moules filtrent de grandes quantités d'eau et peuvent par conséquent concentrer les agents pathogènes présents dans l'eau de mer. Ce pourrait être un mode de contamination des loutres de mer qui consomment l'équivalent de 25 % de leur poids vif par jour en invertébrés (Conrad *et al.*, 2005). La transmission aux phoques pourrait se faire indirectement *via* l'ingestion de poulpes, qui eux-mêmes auraient auparavant consommé des invertébrés (Fujii *et al.*, 2007). Pour les dauphins, le mode de contamination est plus difficile à déterminer ; une hypothèse serait l'ingestion d'eau contaminée par des oocystes, des oiseaux aquatiques ou de la viande infectée jetée dans la mer (Cabezón *et al.*, 2004).

3.1.4.3.1 Les huîtres

Des études ont analysé la capacité des huîtres de filtrer les oocystes, puis la survie de ces oocystes. Lindsay *et al.*, 2001a ont placé des huîtres de Virginie (*Crassostrea virginica*) dans de l'eau de mer (32 ppt de NaCl) et les ont mis en présence d'oocystes de *T. gondii*. Ils ont remplacé l'eau contaminée au bout d'une journée, puis ont prélevé des huîtres au bout de 1, 3 ou 6 jours PI et les ont ensuite administrées à des souris. Des souris positives ont été observées dans les trois lots, ce qui indique que les oocystes de *T. gondii* peuvent être filtrés par les huîtres dans l'eau de mer et maintenir leur capacité d'infection pendant au moins 6 jours.

Une seconde étude (Lindsay *et al.*, 2004) a étudié la survie des oocystes dans ces mêmes huîtres. Ils ont exposé des huîtres à des oocystes de *T. gondii* pendant 24 heures puis ont conservé ces huîtres en eau claire. Ils les ont examinées à différents intervalles jusqu'à 85 jours post-exposition, en les administrant à des souris. Des kystes ont été observés dans le cerveau des souris inoculées jusqu'à 21 jours post-exposition. Les souris nourries par des huîtres conservées 85 jours n'ont pas développé de kystes. En revanche, la réaction immunitaire détectée par la MAT a pu mettre en évidence la présence des oocystes chez 2 des 3 huîtres examinées. Ceci démontre que les huîtres sont capables de retenir des oocystes infectieux pendant 85 jours, bien au-delà des 6 jours démontrés dans l'étude précédente.

Dans cette étude, les auteurs ont également mis des groupes de 10 huîtres en présence de 100 000, 50 000 ou 10 000 oocystes pendant 24 h, les ont ensuite conservées en eau claire puis les ont administrées à des souris. Toutes les souris (10 sur 10) ayant consommé les huîtres mises en présence de 100 000 oocystes se sont infectées ainsi que 6 des 10 souris du groupe associé aux huîtres mises en présence de 50 000 oocystes. Le taux d'infection était beaucoup plus faible pour le dernier groupe. La deuxième partie de cette étude a donc démontré que les huîtres étaient effectivement capables de filtrer et retenir des oocystes dans leurs tissus.

3.1.4.3.2 Les moules

Une troisième étude (Arkush *et al.*, 2003) s'est quant à elle intéressée à la détection d'oocystes dans les moules méditerranéennes (*Mytilus galloprovincialis*). En complément des bio-essais sur des souris, ils ont développé une technique de PCR quantitative en temps réel (TaqMan) pour détecter l'ARN de *Toxoplasma* directement dans les moules et ainsi se passer de l'expérimentation animale, très sensible, mais posant des problèmes de temps, coût et éthique. Les moules ont été exposées aux oocystes pendant 6 heures. Trois moules ont été prélevées au bout de 1, 3, 7, 14, 21 et 35 jours post-exposition et analysées par PCR. L'ARN de *T. gondii* a été détecté chez 50 % des moules à 1 jour et chez 33 % à 21 jours. Par ailleurs, ils ont inoculé à des souris des extraits de branchies, hémolymphe ou glandes digestives prélevées sur des moules récupérées à 6 h, 1 et 3 jours post-exposition. Des souris positives ont été détectées à 6 h dans les trois groupes, mais seules celles inoculées par des extraits de glandes digestives étaient positives à 3 jours, ce qui suggère que la clairance des oocystes survient aux alentours de 24 heures pour les branchies et l'hémolymphe. Ces résultats indiquent que les moules peuvent filtrer et concentrer des oocystes de *T. gondii* à partir d'eau de mer contaminée. Par ailleurs, une fois que le parasite est présent dans les tissus et l'hémolymphe du bivalve, il reste infectieux pour des souris jusqu'à 21 jours post-exposition.

Par conséquent, des huîtres crues ou des moules pourraient être la source d'infection de mammifères marins ou d'humains.

Il faut cependant faire attention au fait que tous les mammifères marins que l'on a découvert atteints par le parasite (isolement ou séropositivité) ne consomment pas de bivalves (les bélougas par exemple (Mikaelian *et al.*, 2000)). Il faut donc rechercher d'autres modes d'ingestion d'oocystes, comme le comportement de « grooming » qui faciliterait l'ingestion d'oocystes présents sur le pelage ou bien l'ingestion d'autres proies que les bivalves qui contiendraient également le parasite (Conrad *et al.*, 2005).

3.1.4.4 Etude expérimentale de la survie des oocystes dans les poissons

Une étude a étudié le développement de tachyzoïtes dans les cellules épithéliales de l'oviducte de poissons rouges (*Carassius auratus*) (Omata *et al.*, 2005b). Étant donné que les dauphins boivent très peu d'eau de mer et se nourrissent de poissons, calmars et autres animaux à sang froid, ils ont supposé que si *T. gondii* pouvait survivre dans les organes des poissons, alors ceux-ci pourraient jouer un rôle comme vecteur de l'agent pathogène. *T. gondii* n'est pas connu pour parasiter les espèces à sang froid, mais aucune étude n'avait étudié en détail l'infection chez le poisson. Ils ont démontré que *T. gondii* avait la capacité de pénétrer dans les cellules des poissons rouges et d'y proliférer *in vitro*, à 37°C, mais pas à 33°C. En revanche, même à une température de 37°C, le parasite n'a pas pu survivre plus de 7 jours PI dans les poissons *in vivo*. D'après cette étude, le parasite n'est donc pas transmissible aux poissons vivant dans des eaux froides et ne serait pas un mode de transmission aux dauphins.

Cependant, une étude plus récente réalisée sur des poissons migrateurs, sardines (*Sardinops sagax*) et anchois (*Engraulis mordax*) a démontré le contraire (Massie *et al.*, 2010). Ils ont exposé expérimentalement ces poissons à des oocystes de *T. gondii* et ont démontré que les deux espèces ont pu filtrer les oocystes dans l'eau de mer, que ces oocystes ont persisté dans le tube digestif pendant au moins 8 h (chez les anchois) et qu'ils sont restés infectieux (chez les sardines). Au total, ils ont détecté par PCR l'ADN de *T. gondii* chez 66 %

(40/61) des poissons exposés. Sept souris sur les 23 ayant ingéré les poissons exposés ont développé une toxoplasmose entre 7 et 13 j PI. Ces deux espèces sont des poissons migrateurs et filtreurs spécialisés dans la consommation de microparticules. Par conséquent, lorsqu'ils sont près des côtes, ils filtrent les oocystes de *Toxoplasma* puis lorsqu'ils migrent au large, ils peuvent servir de vecteurs de la toxoplasmose aux espèces pélagiques.

D'autres recherches sur les interactions entre *T. gondii* et les poissons devront être menées pour valider cette hypothèse, séduisante et plausible pour expliquer la transmission du parasite à travers les océans.

3.1.4.5 Infection expérimentale de phoques gris

Une étude expérimentale (Gajadhar *et al.*, 2004) a montré que des oocystes de *T. gondii* étaient capables d'établir une infection durable chez des phoques gris. Les auteurs ont cherché à déterminer les effets du parasite sur la santé et le comportement de phoques gris infectés expérimentalement par ingestion d'oocystes à une dose faible (100 oocystes) ou élevée (10 000 oocystes). Ils ont capturé 8 jeunes phoques femelles de 8 à 12 semaines. Deux phoques ont reçu les doses élevées d'oocystes, deux autres ont ingéré la dose faible. Les 4 autres phoques ont servi de témoins négatifs. En parallèle, 6 souris ont également ingéré 10 oocystes et 6 autres souris ont servi de contrôle. La moitié des phoques et des souris a été tuée à 5 semaines post-inoculation (PI), l'autre moitié à 10 semaines. Quinze grammes de cerveau ou de muscle ont ensuite servi à nourrir 4 chats. Les sérums des 4 phoques étaient positifs, alors qu'ils étaient négatifs avant l'inoculation, mais aucun phoque n'a rejeté d'oocystes dans ses fèces (test de flottation). La plupart des souris sont devenues malades ou sont mortes 7 à 14 jours PI. Les chats ont tous rejeté des oocystes dans leurs matières fécales et étaient séropositifs.

Cette étude démontre que des oocystes rejetés par des chats qui sporulent dans le milieu extérieur sont capables d'établir une infection chez des phoques. Ces derniers peuvent jouer le rôle d'hôtes intermédiaires et pourraient être acteurs dans la transmission du parasite en milieu marin. Il pourrait également y avoir de grandes différences de sensibilité entre les mammifères marins et les vertébrés terrestres : les souris sont tombées malades avec de faibles quantités d'oocystes, alors que les phoques ont présenté peu de signes cliniques. Par ailleurs, des kystes ont été retrouvés dans le cerveau des souris, alors qu'un seul kyste a été retrouvé chez un phoque. Pourtant, des cas de toxoplasmose dans la nature ont vraisemblablement conduit à la mort de mammifères marins. Ceci pourrait être dû à des souches plus virulentes du parasite, puisqu'il est peu vraisemblable que dans la nature les mammifères marins soient exposés à des doses beaucoup plus importantes du parasite. Dans cette étude, l'absence de symptômes sévères est probablement due à la souche ou bien à la sensibilité individuelle des hôtes. Cela pourrait également indiquer que les souches de *T. gondii* qui sont originaires du milieu terrestre ne se sont pas pleinement adaptées aux espèces marines.

3.1.4.6 Contamination transplacentaire

Le rôle de l'infection transplacentaire est inconnu pour l'instant même si des transmissions verticales ont été observées chez des loutres de mer (Miller *et al.*, 2008a), chez des grands dauphins (Inskeep *et al.*, 1990 ; Jardine et Dubey, 2002), chez un dauphin de Risso

(Resendes *et al.*, 2002a). Cependant, si l'on s'intéresse aux loutres de mer, il semble peu probable que la transmission verticale joue un rôle majeur dans la haute prévalence de toxoplasmose dans cette espèce (Conrad *et al.*, 2005). Néanmoins, ce mode de transmission pourrait maintenir le parasite en vie et l'aider à s'établir durablement dans l'environnement marin (Gajadhar *et al.*, 2004).

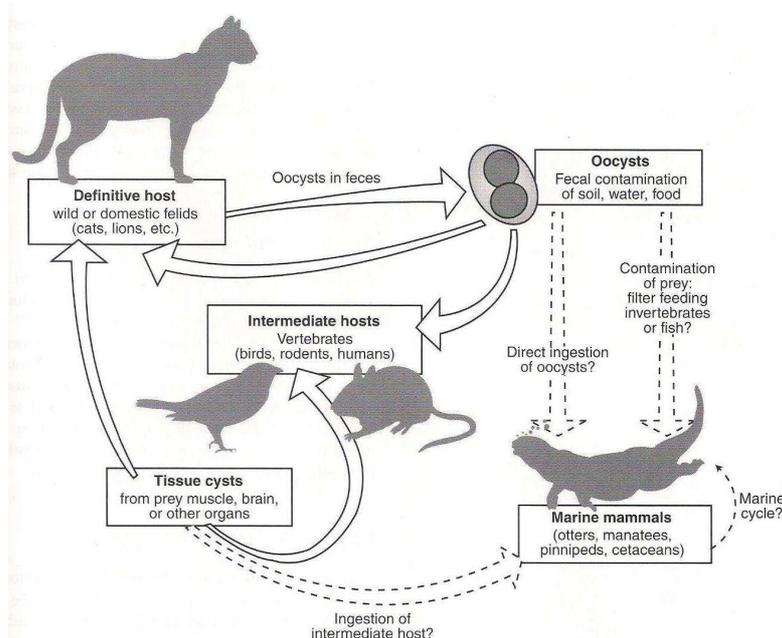
3.1.4.7 Bilan sur la contamination

Le lessivage des sols, contaminés par des oocystes, par la pluie, l'évacuation des déjections des chats domestiques dans les réseaux urbains et les rejets de certaines stations d'épuration en mer conduisent à la contamination du milieu marin par des oocystes non sporulés. Du fait de leur capacité de survie et de sporulation dans l'eau de mer, les oocystes peuvent évoluer en forme infectante et entrer ainsi dans la chaîne de contamination (AFSSA, 2005). Ils seraient filtrés et concentrés par des invertébrés marins ou transportés par des poissons, ce qui conduirait indirectement à la contamination des mammifères marins, suite à la consommation de ces organismes (figure 39). Néanmoins, *T. gondii* n'a été isolé qu'une seule fois d'une moule en milieu naturel (Miller *et al.*, 2008b). Ces études mettent tout de même en évidence un risque potentiel pour la santé humaine en cas de consommation de produits de la mer contaminés et mal préparés.

Par ailleurs, seules les formes asexuées du parasite (tachyzoïtes et bradyzoïtes) ont été observées par histologie, les mammifères marins jouent donc un rôle d'hôtes intermédiaires. Des hôtes définitifs, autres que les félinés, pourraient être impliqués dans l'environnement marin, mais n'ont pas été identifiés jusqu'à présent. Les HD potentiels pourraient être les prédateurs des mammifères marins, comme par exemple les requins, les ours polaires, les orques ou les charognards (Measures *et al.*, 2004).

Figure 39. Schéma du cycle de *T. gondii* chez les mammifères marins (Miller, 2007)

(definitive host : HD, intermediate host : HI, wild or domestic felids (cats, lions, etc.) : félinés sauvages ou domestiques (chats, lions, etc.), fecal contamination of soil, water, food : contamination fécale du sol, de l'eau ou de la nourriture, contamination of prey (filter feeding invertebrates or fish) : contaminations de proies (invertébrés filtreurs ou poissons), vertebrates (birds, rodents, humans) : vertébrés (oiseaux, rongeurs, humains), tissue cyst from prey muscle, brain or other organs : kystes tissulaires dans les muscles, le cerveau ou d'autres organes des proies, marine mammals (otters, manatees, pinnipeds, cetaceans) : mammifères marins (loutres, lamantins, pinnipèdes, cétacés))



3.2 Les infections à *Neospora caninum* chez les mammifères marins

L'étude de Dubey *et al.* (2003) est la première à rapporter des séropositivités à *N. caninum* chez les mammifères marins de Californie, Washington et d'Alaska. Ainsi, en utilisant le test d'agglutination directe (NAT), des anticorps ont été décelés chez 3 des 53 morses (6 %), 28 des 145 loutres de mer (19 %), 11 des 331 phoques veaux-marins (3,5 %), 1 des 27 lions de mer (4 %), 4 des 32 phoques annelés (12,5 %), 1 des 8 phoques barbus et 43 des 47 grands dauphins (91 %). Ces résultats suggèrent que les mammifères marins sont exposés à *N. caninum*, néanmoins aucun isolement du parasite n'a été effectuée.

Une deuxième étude (Omata *et al.*, 2006) a mis en évidence par immunoblotting la présence d'anticorps anti-*N. caninum* chez une des 8 orques testées. Néanmoins, le parasite n'a pas pu être mis en évidence par PCR. Malgré ce résultat sérologique positif, ces données suggèrent que les orques sont peu exposés à ces parasites au Japon.

Fujii *et al.* (2007) ont recherché des anticorps anti-*T.gondii* et anti-*N.caninum* chez différentes espèces de phoques au Japon, dans la région d'Hokkaido, entre 1998 et 2006. Alors que seulement 3 des 322 phoques veaux-marins ont présenté des anticorps anti-*T.gondii* (lors de l'année 2005), 13 étaient séropositifs pour *N. caninum*, avec une augmentation au fur et à mesure des années (1 en 2003, 4 en 2004 et 8 en 2005). Des anticorps ont été également retrouvés chez 2 des 46 phoques veaux-marins tachetés analysés en 2004 et 2005. Ces résultats suggèrent une infection sporadique à *N. caninum* dans ces populations. Parmi les phoques séropositifs, 3 étaient des jeunes âgés de plus de 3 mois. Peu d'informations sont disponibles sur l'immunité des phoques nouveau-nés, mais Ross *et al.* (1994) ont montré que la majorité des anticorps sont transférés aux jeunes phoques *via* le colostrum, comme chez le chat. De manière générale, les anticorps maternels ne sont plus détectables après 2 à 3 mois. Ces anticorps chez les jeunes phoques ne proviennent donc pas de leur mère et suggèrent une infection relativement récente. L'incidence des anticorps anti-*N.caninum* dans cette étude était supérieure à celle des anticorps anti-*T.gondii*. Dans l'étude précédente, aucune orque n'était séropositive à *T.gondii*, en revanche, une orque a présenté des anticorps anti-*N. caninum*, ce qui suggère que les mammifères marins au Japon pourraient être exposés plus fréquemment à ce deuxième parasite. D'autres études seront nécessaires pour isoler l'ADN du parasite.

3.3 Les infections à *Sarcocystis* spp. chez les mammifères marins

3.3.1 Infections à *S. neurona* chez les mammifères marins

3.3.1.1 Présentation de *S. neurona*

Sarcocystis neurona, l'agent responsable d'encéphalomyélite (EPM) chez le cheval, est reconnu comme pathogène des mammifères marins depuis 2000. Contrairement à *Toxoplasma gondii*, qui connaît une répartition mondiale, les descriptions de *S. neurona* sont limitées à la côte Pacifique de l'Amérique du Nord, où ont été introduits l'opossum de Virginie (*Didelphis virginiana*) et l'opossum à oreilles blanches (*Didelphis albiventris*), seuls hôtes définitifs confirmés du parasite. De la même façon que pour les chats, les opossums développent des infections asymptomatiques et disséminent de grandes quantités de sporocystes dans l'environnement sans montrer aucun signe clinique. Cependant, contrairement aux chats chez qui le rejet des oocystes est limité dans le temps, les opossums libèrent de façon prolongée et répétée des oocystes dans leurs fèces. Néanmoins, rien n'explique pour l'instant cette répartition limitée des infections, puisque les opossums capables de disséminer les parasites sont dispersés en Amérique du Nord et du Sud.

De nombreux mammifères et oiseaux, dont les loutres de mer et les phoques veaux-marins, peuvent jouer un rôle d'hôte intermédiaire pour le parasite, mais ça n'est pas une zoonose, ce qui explique que, malgré l'importance de ce parasite, les recherches portant sur la pathologie neurologique chez les loutres de mer se sont d'abord concentrées sur l'agent zoonotique voisin, *T. gondii* (Miller, 2007).

3.3.1.2 Identification de *S. neurona* chez les mammifères marins

Thomas et Cole (1996) ont, les premiers, associé les encéphalites des loutres de mer à une infection protozoaire et ont suggéré qu'un autre parasite que *T. gondii* pourrait également être impliqué. Rosonke *et al.* (1999) ont rapporté la présence de *S. neurona* sur des sections histologiques de cerveau d'une loutre de mer captive dans l'Oregon. Le parasite a par la suite été isolé à partir de loutres de mer sauvages, atteintes d'encéphalites (Lindsay *et al.*, 2000 ; Miller *et al.*, 2001a ; Lindsay *et al.*, 2001b ; Miller *et al.*, 2009). Les isolats ont été comparés à ceux responsable d'EPM chez les chevaux et se sont révélés moléculairement identiques (Miller *et al.*, 2001a).

La première description d'encéphalite associée à *S. neurona* chez des phoques veaux-marins a eu lieu en 1998 (Lapointe *et al.*, 1998). Miller *et al.* (2001b) ont isolé des *S. neurona* viables à partir du cerveau et du liquide cébrospinal d'un phoque veau-marin atteint d'encéphalite. Le parasite était identique à celui touchant l'espèce équine.

Les infections concomitantes à *T. gondii* et *S. neurona* sont également fréquemment décrites (Lindsay *et al.*, 2001b ; Thomas *et al.*, 2007 ; Gibson *et al.*, 2011).

Un cas de mortalité de masse a été rapporté durant le mois d'avril 2004 : pas loin de 1,5 % de la population de loutres de mer a été retrouvée échouée sur les plages de Californie (Miller *et al.*, 2010). Certaines loutres étaient décédées, d'autres présentaient des symptômes neurologiques et sont mortes dans les deux jours suivant la découverte. Une intoxication a d'abord été suspectée, mais les autopsies ont révélé des lésions compatibles avec une infection : lymphadénopathie, décoloration du myocarde, congestion multi-organique et émaciation étaient les symptômes les plus fréquents. L'IFAT a permis de détecter des anticorps anti-*S. neurona* chez les 14 loutres testées à des taux de dilution très élevés (> 1/10 240^{ème}). Des anticorps anti-*T. gondii* ont en outre été détectés chez 12 loutres, à des taux supérieurs à 1/320. Quatre loutres présentaient également des anticorps anti-*N. caninum*, mais ces anticorps n'étaient présents que chez les animaux fortement séropositifs pour *T. gondii*. La PCR a permis de confirmer la présence de *S. neurona* chez 8 des 14 animaux testés (57 %). C'est la première épizootie marine à *S. neurona* décrite dans la littérature.

Aucun cas d'infection à *S. neurona* n'a été rapporté chez les autres espèces de mammifères marins partageant le même environnement marin côtier. Par ailleurs, aucun cas d'infection asymptomatique n'est décrit dans la littérature, ce qui résulte d'une part de l'absence de publication des cas mineurs et d'autre part de la difficulté à distinguer les kystes tissulaires à *S. neurona* des autres espèces du genre *Sarcocystis* à l'histopathologie (Miller, 2007).

3.3.1.3 Prévalence des parasites *T. gondii* et *S. neurona* lors d'encéphalite chez les mammifères marins

Kreuder *et al.* (2003) ont autopsié 105 carcasses de loutres de mer. Dans cette étude, les maladies infectieuses étaient la cause principale de la mort dans 63,8 % des cas. Dans 16,2 % des cas, l'encéphalite à *T. gondii* était la cause primaire et dans 11,4 % des cas, c'était un facteur ayant contribué au décès. Les encéphalites à *Sarcocystis neurona* avaient causé la mort de l'animal dans 6,7 % des cas. Cette étude est la première à grande échelle à pointer l'intérêt de s'intéresser de plus près à ce protozoaire, étroitement lié à *T. gondii*.

L'étude de Thomas *et al.* (2007) remet en cause la prévalence des deux parasites démontrée précédemment (Kreuder *et al.*, 2003). Les auteurs ont autopsié 344 loutres de mer entre 1985 et 2004 et ont diagnostiqué une encéphalite chez 50 cadavres. Parmi celles-ci, 39 étaient dues à une infection à protozoaires active lors du décès. Dans 56 % des cas (22/39), la méningoencéphalite était causée par *S. neurona* alors qu'elle n'était due à *T. gondii* que dans 13 % des cas (5/39). Une infection concomitante par *T. gondii* et *S. neurona* était présente chez 12 de ces 39 loutres (31 %) et dans la plupart des cas, seul *S. neurona* était associé aux lésions retrouvées dans le cerveau. Au total, on retrouvait *S. neurona*, seul ou en association avec *T. gondii*, dans 85 % des cas (33/39). En conclusion de cette étude, *S. neurona* serait le protozoaire retrouvé le plus fréquemment lors d'encéphalite chez les loutres de mer et *T. gondii* causerait la plupart du temps des infections latentes.

Cette étude est confirmée par une plus récente (Gibson *et al.*, 2011). Six mille mammifères marins échoués sur les côtes des états de Washington, de l'Oregon aux États-Unis d'Amérique et de la Colombie britannique au Canada ont été recueillis entre 2004 et 2009. Parmi ceux-ci, 151 ont été suspectés de présenter une encéphalite protozoaire, parmi lesquels de nombreux pinnipèdes, dont 81 phoques veaux-marins et 5 loutres de mer. Dix

individus en bonne santé ont également été inclus dans l'étude. Au total, 91 % des individus (147 sur 161) se sont révélés positifs en PCR à un parasite, selon la répartition suivante : 37 présentaient une infection à *S. neurona*, 32 à *T. gondii* et 62 étaient infectés par les deux parasites simultanément. Par ailleurs, 23 individus étaient infectés par un autre parasite, dont 5 par *Neospora caninum*. Il est intéressant de noter que la fréquence relative des infections à *S. neurona* a augmenté de façon spectaculaire entre 2004 et 2009, dépassant même *T. gondii*. De plus, de nombreuses infections à *S. neurona* étaient asymptomatiques, ce qui suggère que ce parasite n'est pas intrinsèquement virulent chez les mammifères marins. Les cas les plus virulents étaient dus à l'infection concomitante par les deux parasites. L'inflammation tissulaire au niveau du cerveau était bien plus sévère chez ces animaux co-infectés.

Le polyparasitisme soulève deux hypothèses : soit les mammifères marins se sont contaminés à la même source pour les deux parasites, soit, une fois parasités par un premier parasite, ils se retrouvent plus vulnérables à une deuxième infection.

La forte prévalence des infections concomitantes par les deux parasites mise en évidence dans cette étude chez ces espèces sentinelles de la santé humaine nous indique donc le rôle potentiel que pourrait jouer le polyparasitisme dans l'émergence de nouvelles maladies à protozoaires, chez de nouveaux hôtes, dont l'espèce humaine.

3.3.1.4 Signes cliniques observés chez les mammifères marins

Les signes cliniques observés chez les mammifères marins lors d'infection à *S. neurona* sont similaires à ceux observés lors de toxoplasmose. Il n'est pas possible de faire la différence entre *T. gondii* et *S. neurona* sur la base de la clinique. De plus, ces deux parasites sont fréquemment associés et, par ailleurs, les mettre en évidence n'est pas une preuve de leur implication dans la maladie puisque de nombreux cas d'individus porteurs mais cliniquement sains sont rapportés (Miller, 2007).

En Californie, *S. neurona* est une cause majeure de mortalité des loutres de mer, causant des méningo-encéphalites sévères, des lymphadénopathies, des pneumonies, des affections musculosquelettiques et cardiovasculaires, etc. (Miller, 2007).

Dans l'étude de Kreuder *et al.* (2003), les auteurs avaient démontré que l'infection à *T. gondii* était un facteur de risque de l'apparition de maladies cardiaques. Il est intéressant de noter que dans une étude plus récente (Kreuder *et al.*, 2005), ayant pour objet la recherche des facteurs de risque conduisant à des myocardites chez les loutres de mer, *T. gondii* n'a pas été retenu au détriment de *S. neurona* (3,6 fois plus de risque d'être infecté par *S. neurona* chez les loutres présentant une myocardite, par rapport aux loutres saines).

Récemment, Dubey et Thomas (2011) ont associé une rétinocoroïdite présente chez une loutre de mer à l'infection par *S. neurona*.

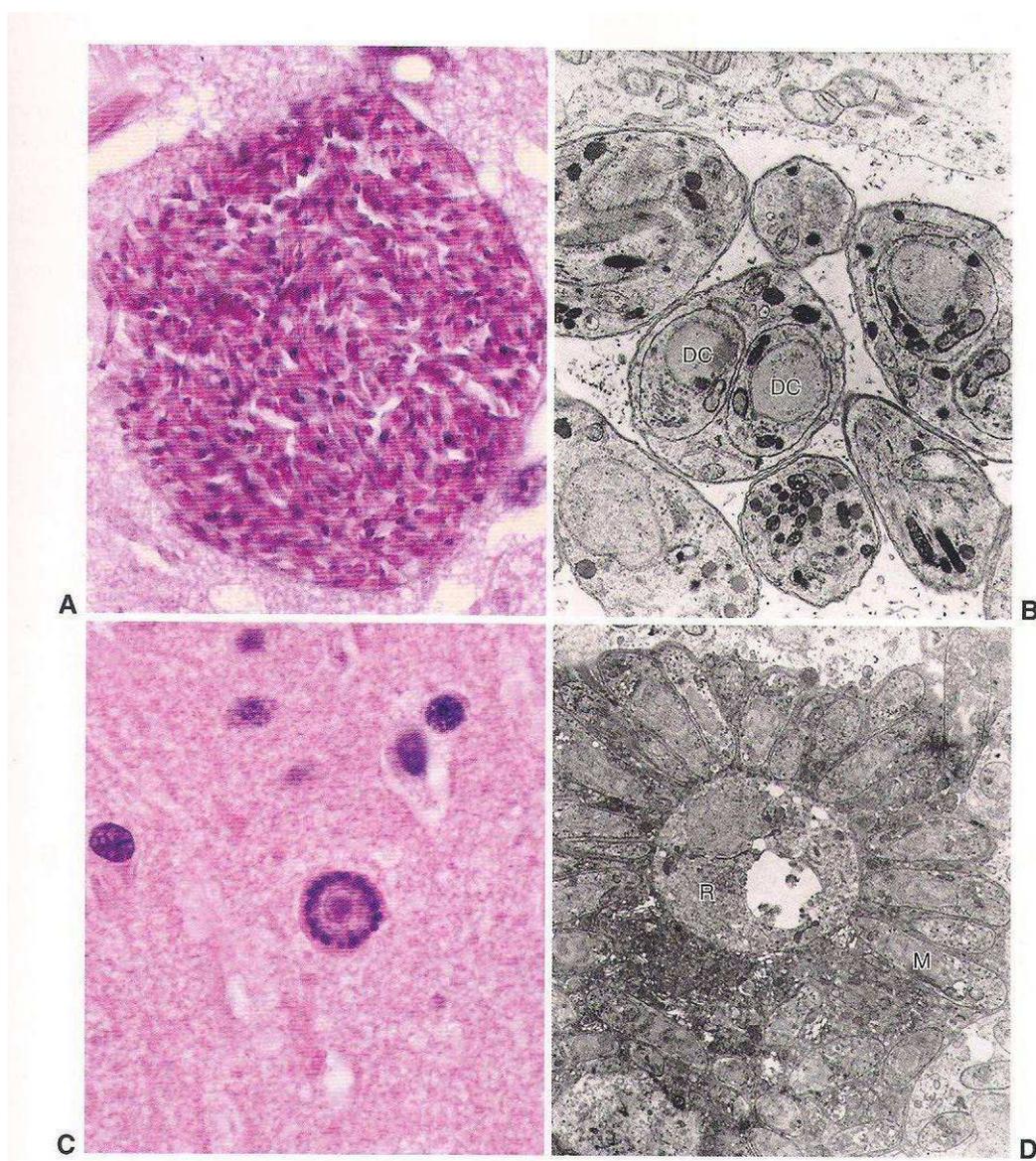
Des méningoencéphalites dues à *S. neurona* ont également été identifiées chez 7 phoques veaux-marins en Californie (Lapointe *et al.*, 1998). Ce parasite est l'une des causes les plus fréquentes de mortalité des phoques veaux-marins adultes et subadultes du plus grand centre de réhabilitation des mammifères marins en Californie (Miller, 2007).

Des kystes tissulaires ont été retrouvés principalement dans le cœur et les muscles squelettiques et les mérozoïtes prolifèrent entre autres dans le cerveau et les poumons (Miller, 2007).

La figure 40 compare différents stades de *T. gondii* et *S. neurona* visualisés dans le cerveau de loutres de mer.

Figure 40. Comparaison d'images typiques de *T. gondii* et *S. neurona* observés en histopathologie et en microscopie électronique en transmission (TEM) (Miller, 2007)

- A. Kyste tissulaire de *T. gondii* isolé du cerveau d'une loutre de mer.
- B. Développement d'un kyste tissulaire, observé par TEM. Au centre, visualisation de la multiplication d'une cellule mère en deux cellules filles (DC) par endodyogénie.
- C. Schizonte de *S. neurona* isolé du cerveau d'une loutre de mer. Visualisation de la division de la cellule mère par endopolygénie, avec les mérozoïtes disposés autour du noyau.
- D. Visualisation au TEM d'un schizonte en forme de rozette isolé du cerveau d'une loutre de mer.



3.3.1.5 Mode de contamination des mammifères marins

Les deux parasites *T. gondii* et *S. neurona* sont très proches et il est vraisemblable que les modes de transmission de ces agents pathogènes terrestres jusqu'à l'environnement marin soient similaires et pourraient avoir sélectionné des souches adaptées au milieu marin (Wendte *et al.*, 2010). Les sporocystes libérés dans les matières fécales des opossums peuvent atteindre le milieu marin et conduire à la contamination des invertébrés, puis des mammifères marins, tout comme *T. gondii*. Shapiro, Miller, et Mazet (2012) ont fait le lien entre les épisodes de tempête conduisant à une augmentation du lessivage des sols vers la mer et les épidémies de sarcocystose chez les loutres de mer. Par ailleurs, Wendte *et al.* (2010) ont découvert le même génotype de *S. neurona* chez un phoque veau-marin et chez des rats-laveurs infectés, ce qui confirme le lien entre les infections marines et terrestres.

Dubey *et al.* (2001) ont identifié par PCR le parasite chez une loutre de mer. Ils ont fait ingérer à un opossum de laboratoire du muscle de cette loutre, ce qui a conduit au rejet de sporocystes dans les matières fécales de l'hôte définitif. Ces sporocystes ont par la suite conduit à l'infection de souris, ce qui prouve que les loutres de mer exposées à *S. neurona* peuvent être le siège du développement de sarcocystes infectieux pour les hôtes définitifs et est en faveur d'un cycle de transmission du parasite entre opossums et mammifères marins.

Contrairement à *T. gondii*, aucune transmission transplacentaire de *S. neurona* n'a été rapportée (Miller, 2007).

3.3.2 Infections à *Sarcocystis* spp. chez les mammifères marins

Des infections musculaires dues à d'autres parasites du genre *Sarcocystis* spp. sont rapportées depuis plus de 130 ans chez plus de 14 espèces (phoques, otaries, odontocètes et mysticètes, loutres de mer et ours blancs). La première description d'une coccidie ayant conduit à la formation de kystes tissulaire chez un mammifère marin a eu lieu en 1882 (Huet, 1882), dans les muscles squelettiques d'un lion de mer, décédé en captivité en France. Peu d'informations sont disponibles sur l'identité de ces parasites et leurs hôtes. Néanmoins, certains ont été distingués de *S. neurona* en se basant sur l'ultrastructure du parasite, l'immunohistochimie, les caractéristiques moléculaires et la distribution au sein des tissus. Beaucoup d'incertitudes demeurent sur le cycle et les hôtes des espèces touchant les mammifères marins (Miller, 2007).

Des hépatites nécrotiques sévères dues à des parasites du genre *Sarcocystis*, mais distincts de *S. neurona*, sont rapportées chez des ours polaires (Garner *et al.*, 1997), des lions de mer (Mense *et al.*, 1992 ; Dubey *et al.*, 2003), un phoque moine (Yantis *et al.*, 2003) et un dauphin bleu et blanc (Resendes *et al.*, 2002b). Les signes cliniques rapportés sont les suivants : anorexie, léthargie, affection gastro-intestinale et ictère. L'issue est généralement fatale.

3.4 Les infections à *Trichinella* spp. chez les mammifères marins

La trichinellose chez les mammifères marins est restreinte à la zone arctique et se limite à quelques espèces hôtes. Elle est uniquement due à l'espèce *Trichinella nativa*. Elle présente un risque zoonotique non négligeable dans cette région.

3.4.1 Espèces hôtes du parasite en Arctique

Le parasite *Trichinella nativa* fut identifié en Arctique dès 1934 chez le renard polaire (*Alopex lagopus*) et l'ours blanc. En 1947, des épidémies humaines de trichinellose au Groenland (295 cas enregistrés) ont été associées à la consommation de viande de morse mal cuite. Une grande étude de surveillance du parasite a alors été effectuée sur plus de 10 200 mammifères marins et terrestres autour du Groenland (Madsen, 1961). Cette étude a confirmé la prévalence importante du parasite chez l'ours blanc et l'a identifié chez trois espèces de pinnipèdes : le morse, le phoque barbu et le phoque annelé, ainsi que chez des mammifères terrestres : loups, renards, chiens de traîneau. D'autres études ont confirmé par la suite la présence de *T. nativa* chez ces espèces de pinnipèdes, le morse étant toujours l'espèce la plus affectée, mais n'ont pas mis en évidence de nouvelles espèces-hôtes, jusqu'en 2011 où un phoque gris s'est révélé positif (Isomursu et Kunnasranta, 2011). Le parasite a également été identifié chez un béluga (*Delphinapterus leucas*) en 1950 au niveau des côtes d'Alaska. C'est le seul cas confirmé de trichinellose chez un cétacé jusqu'à présent (Forbes, 2000).

3.4.2 Susceptibilité des phoques à l'infection par *T. nativa*

3.4.2.1 Infection expérimentale

Une étude (Kapel *et al.*, 2003) a eu pour objet l'étude de la susceptibilité des phoques à l'infection par *T. nativa* et les capacités de tolérance au froid des kystes larvaires dans la viande de phoque. Ils ont choisi des phoques gris car leur population est abondante et c'est une espèce relativement facile à maintenir en captivité. Ils ont élevé 8 jeunes phoques gris femelles, 4 témoins négatifs et 4 pour l'étude expérimentale. À 9 semaines d'âge, ils ont inoculé 5000 larves (100 larves/kg) de *T. nativa* à deux phoques et 50 000 (1000 larves/kg) à deux autres. Au cours des premiers jours post-inoculation (PI), trois phoques ont montré une baisse d'activité et une diminution de la consommation alimentaire, par comparaison au groupe témoin. Un phoque ayant reçu 5000 larves a présenté une anorexie totale pendant toute la durée de l'étude et a dû être nourri par sonde. Un phoque de chaque groupe ainsi que deux phoques du groupe témoin ont été tués à 5 puis 10 semaines PI respectivement.

Différents organes ont été prélevés et les échantillons musculaires ont subi une digestion dans de la pepsine chlorhydrique. Des larves musculaires ont pu être mises en évidence chez les 4 phoques infectés, mais chez aucun des phoques témoins. Les phoques inoculés à haute dose présentaient une plus grande quantité de larves musculaires et pour les 2 niveaux d'infection, la quantité de larves était plus importante au bout de 10 semaines qu'au bout de 5, ce qui montre que les femelles continuaient à produire des larves dans l'intestin après 5 semaines PI. Un dosage des anticorps par Elisa a montré que tous les phoques avaient subi une séro-conversion entre 2 et 5 semaines PI.

Pour déterminer la tolérance des larves au froid, des échantillons musculaires de chaque phoque infecté ont été collectés puis conservés à 5, -5 ou -18°C. Au bout de 1, 4 ou 8 semaines, un échantillon de chaque groupe a été digéré afin de récupérer des larves. Celles-ci ont été inoculées à 5 souris pour chaque groupe. Les souris ont été sacrifiées au bout de 5 semaines et leurs muscles ont été digérés pour récupérer les larves. L'infectiosité des larves conservées à -18°C était moindre que celle des autres groupes. Par ailleurs, les larves récoltées au bout de 10 semaines PI présentaient une meilleure tolérance au froid que celle récupérées à 5 semaines pi.

Cette étude prouve donc bien que les phoques gris sont susceptibles d'être infectés par *T. nativa*. Par ailleurs, le fait que des larves congelées à -18°C pendant 8 semaines soient encore infectieuses suggère un risque lors de la consommation de viande de phoque infectée, même congelée.

3.4.2.2 Infection naturelle

Une étude (Isomursu et Kunnasranta, 2011) a été menée au cours des dix dernières années parmi les populations de phoques gris (n=171) et de phoques annelés (n=56) en mer Baltique, sur les côtes finlandaises. Les échantillons musculaires ont été analysés par digestion artificielle. Seul un phoque gris s'est révélé positif, ce qui prouve que l'infection naturelle des phoques gris, suggérée dans l'étude précédente, est bien possible. Cette découverte vient confirmer l'importance d'une inspection sanitaire des carcasses avant consommation, car la population de phoques gris dans la région a atteint un tel niveau récemment que la chasse est actuellement possible pour cette espèce.

3.4.3 Modes de contamination des mammifères marins

Plusieurs facteurs ont été mis en évidence pour expliquer la présence de *Trichinella* dans l'environnement marin. Les carcasses d'ours, renards et pinnipèdes infectées sont une source potentielle de larves pour de nouveaux hôtes. En effet, ces carcasses, si elles n'ont pas été complètement décomposées ou consommées par les charognards, pénètrent dans l'océan et deviennent accessibles aux crustacés, poissons et mammifères marins.

Les pratiques humaines pourraient perpétuer ce cycle dans certaines zones géographiques : les communautés arctiques ont l'habitude de nourrir leurs chiens avec les portions non consommées des mammifères chassés ou de laisser les carcasses dépecées sur la banquise, les rendant disponibles pour la faune sauvage. On estime que la principale source de contamination des morses est la consommation de carcasses d'ours blanc (Forbes, 2000).

Une fois dans l'eau de mer, de nombreux amphipodes se pressent rapidement autour des carcasses et cette concentration de petits crustacés pourrait être très attractive pour les pinnipèdes et les poissons qui s'en nourrissent. Plusieurs études ont démontré que ces amphipodes peuvent transmettre ensuite le parasite soit directement aux mammifères qui les ingèrent, soit indirectement aux mammifères *via* la consommation de poissons qui ont eux-mêmes ingéré des amphipodes infectés (Britov, 1962). À l'exception du morse qui se nourrit directement sur les carcasses, les pinnipèdes, dont le régime alimentaire fait une grande place aux crustacés, se contaminent donc vraisemblablement indirectement à partir de ces carcasses.

3.4.4 Risque zoonotique

Les mammifères marins sont fréquemment associés à des cas de trichinellose humaine en Arctique : 295 cas ont été enregistrés en 1947, 127 entre 1949 et 1959. Le nombre de cas a par la suite diminué, mais une petite épidémie a eu lieu en 2001 (Møller *et al.*, 2005), ce qui montre que cette infection est toujours d'actualité au Groenland. Le morse est aujourd'hui désigné plus fréquemment que l'ours polaire comme la source de l'infection, bien que la prévention chez l'ours polaire soit beaucoup plus importante. La viande d'ours est généralement cuite avec attention, alors que celle de morse est parfois consommée congelée, fermentée ou séchée. Comme nous l'avons vu, *T. nativa* est une espèce relativement tolérante aux basses températures et la congélation ne suffit donc pas à inactiver le parasite. Comme il est difficile de faire changer les habitudes culinaires, des mesures de contrôle sanitaire de la viande de morse et d'ours polaire avant consommation ont été mises en place dans certaines communautés d'Arctique (Forbes, 2000; Møller *et al.*, 2005). Les études de Kapel *et al.* (2003) et d'Isomursu et Kunasranta (2011) suggèrent que ces contrôles devraient être étendus à la viande de phoque gris qui devient une ressource abondante dans cette région.

DEUXIÈME PARTIE :

ENQUÊTE SUR LA PRÉVALENCE DES INFECTIONS PARASITAIRES À *TOXOPLASMA GONDII* ET *TRICHINELLA* SPP. CHEZ LES MAMMIFÈRES MARINS ECHOUÉS SUR LES CÔTES FRANÇAISES ET ROUMAINES

De nombreuses études de recherche de la toxoplasmose chez les mammifères marins ont été menées jusqu'à présent en Amérique du Nord, au Japon et en Europe (Grande Bretagne, Italie et Espagne). Excepté une étude britannique ayant inclus des phoques de la colonie de Molène en Bretagne (Cabezón *et al.*, 2011), aucune équipe n'a jusqu'à présent recherché ce parasite sur les côtes métropolitaines. La façon la plus simple et la moins invasive d'accéder à des prélèvements de mammifères marins étant de s'intéresser aux animaux morts échoués, nous avons choisi de rechercher le parasite *T. gondii* dans les carcasses de mammifères marins échoués sur les côtes françaises, à la fois par sérologie et par biologie moléculaire. Nous n'avons pas pu rechercher les parasites *N. caninum* et *Sarcocystis* spp. par manque de moyens matériels (pas d'antigènes disponibles au laboratoire).

Une opportunité de stage au sein de l'association Oceanic club à Constanța en Roumanie, sur la côte de la Mer Noire, nous a donné l'occasion de pouvoir obtenir des prélèvements supplémentaires et d'effectuer une comparaison des résultats entre les côtes françaises et roumaines.

D'autre part, malgré l'absence de description d'infections à *Trichinella* spp. chez les mammifères marins ailleurs qu'en Arctique, il nous a semblé intéressant de pouvoir analyser les échantillons pour rechercher ces parasites.

À notre connaissance, cette étude est la première à rechercher ces parasites chez les mammifères marins en France et en Roumanie.

1 Matériel et méthodes

1.1 Echantillons analysés

1.1.1 Pré-requis : étude chez des chats

En pré-requis, une étude a été effectuée sur des prélèvements de cœur et de diaphragme de 23 chats autopsiés à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA) entre février et mai 2012. Ces chats ont tous été autopsiés à l'ENVA et ont été inclus dans l'étude au hasard, sans prendre en compte les commémoratifs.

Cette espèce a été choisie pour les raisons suivantes : le fait que le chat soit l'hôte définitif de *Toxoplasma gondii*, nous donnant ainsi plus de probabilité de rencontrer des résultats positifs et la facilité d'obtention des prélèvements, étant donné le nombre de chats autopsiés à l'ENVA.

Cette étude nous a permis de nous former aux différentes techniques utilisées au laboratoire dans le cadre de cette thèse.

1.1.2 Collecte des échantillons de mammifères marins

Les échantillons proviennent de cadavres de mammifères marins échoués pour une part sur les côtes françaises de l'Atlantique et autopsiés par les équipes du Centre de Recherche sur les mammifères Marins (CRMM) de la Rochelle (17) et d'Océanopolis à Brest (29) et d'autre part échoués sur les côtes de la Mer Noire en Roumanie et autopsiés par l'équipe Oceanic club de Constanța.

1.1.2.1 Le RNE (Réseau National Échouage) en France

Le CRMM est un observatoire environnemental datant de 1972 dont le principal objectif est de rassembler les informations relatives aux échouages et observations de cétacés et de pinnipèdes. Ces données constituent la seule série historique concernant ces espèces en France et une des plus longues d'Europe. Les populations de mammifères marins des côtes françaises sont suivies en termes d'abondance relative, de distribution, de paramètres démographiques et écologiques et de causes de mortalité.

Les échouages de mammifères marins constituent la principale source de données et de prélèvements biologiques. La stratégie principale consiste alors à collecter, centraliser et traiter les informations scientifiques relatives aux mammifères marins. Pour assurer la collecte d'informations, le RNE (Réseau National Échouage) a été mis en place en 1972, ce qui en fait un des plus anciens au niveau mondial. Le CRMM coordonne et anime ce réseau avec le soutien du Ministère chargé de l'Environnement. Le RNE couvre toutes les côtes de France métropolitaine, dont la façade maritime atteint pratiquement 5000 km, répartis sur 3 façades (Atlantique, Manche et Mer du Nord, Méditerranée). Elle possède aussi 265 000 km² de surface maritime en mer comprenant à elle seule 50 % de la biodiversité mondiale en matière de mammifères marins.

Le RNE est composé d'une cinquantaine d'organismes (associations, organismes publics, aquariums, etc.) Plus d'une centaine de volontaires interviennent sur 300 à 1000 échouages par an.

Le réseau est composé d'un coordinateur national (le CRMM), de 5 coordinateurs régionaux : le CMNF pour le Nord (Coordination Mammalogique du Nord de la France, Groupe mammifères Marins), le GMN pour les côtes normandes (Groupe Mammalogique Normand), OCEANOPOLIS, Laboratoire d'Etude des mammifères Marins pour la Bretagne, le CRMM pour le Sud-Ouest et le GECM pour la Méditerranée (Groupe d'Etude des cétacés de Méditerranée). Enfin, des correspondants locaux (personnes volontaires ayant suivi une formation, conduisant à la délivrance d'une autorisation d'activité portant sur les mammifères marins) sont présents dans chaque département du littoral (figure 41).

L'appartenance au RNE est subordonnée à la possession d'une carte verte délivrée par le ministère de l'écologie autorisant son détenteur à intervenir sur les échouages.

Cette carte verte ne peut être obtenue qu'après une formation dispensée par le CRMM ou les coordinateurs régionaux. Toute personne ne possédant pas de carte verte doit appliquer l'arrêté ministériel du 27 juillet 1995 qui stipule que "sont interdits sur tout le territoire national, ..., et en tout temps, la destruction, la mutilation, la capture ou l'enlèvement intentionnels, la naturalisation des cétacés ou, qu'ils soient vivants ou morts, leur transport, leur colportage, leur utilisation, leur mise en vente, leur vente ou leur achat" (Garletti, 2004).

Les découvertes d'échouages de mammifères marins doivent être systématiquement signalées au RNE. À ce titre, une circulaire interministérielle (DNP/CFE du 18 octobre 2001) rappelle aux collectivités et autorités la nécessité de transmettre les avis d'échouages au CRMM, ainsi que la démarche à suivre.

Pour chaque échouage de mammifère marin signalé sur l'ensemble du littoral, un examen est effectué par un correspondant du RNE et une fiche d'échouage est remplie. Les informations relatives aux commémoratifs de l'échouage (date, lieu, circonstance de l'observation, observateur) et les informations concernant l'animal (espèce, sexe, biométries, blessures, état de décomposition, indice de condition, etc.) sont relevées. L'examen peut être complété par la collecte de prélèvements voire par une autopsie si l'état de l'animal le permet. L'ensemble de ces données est stocké dans une base de données nationale de référence entretenue par le CRMM (Van Canneyt *et al.*, 2011).

Figure 41. Les associations du Réseau National Échouage (Garletti, 2004)



Au cours de l'année 2010, 490 échouages de cétacés appartenant à 12 espèces différentes ont été recensés sur le littoral français. Le dauphin commun est l'espèce dominante dans la composition des échouages, dont la majorité des effectifs concerne la façade atlantique. Depuis 2005, le marsouin commun est devenu la seconde espèce rencontrée dans la composition des échouages sur l'ensemble du littoral. Le dauphin bleu et blanc se place en troisième position ; il est retrouvé essentiellement en Méditerranée. Il est suivi par le grand

dauphin. Les échouages des autres espèces sont anecdotiques (moins de 8 échouages par an sur l'ensemble du territoire) (Van Canneyt *et al.*, 2011).

Entre novembre 2009 et octobre 2010, 91 phoques échoués ont été répertoriés sur l'ensemble du littoral français. Les deux espèces les plus communes sur les côtes françaises composent la quasi-totalité de ces échouages : le phoque gris, totalisant 42,3 % des échouages et le phoque veau-marin, 56,5 % des échouages (Van Canneyt *et al.*, 2011).

1.1.2.2 Oceanic Club à Constanța, en Roumanie

L'ONG Oceanic Club a été fondée le 28 février 1992 à Constanța, le principal port de la Roumanie, situé sur la côte de la Mer Noire. Il s'agit d'une association d'exploration océanographique et de protection du milieu marin. Une de ses missions consiste à intervenir sur les échouages de cétacés sur les plages. Il existe un accord écrit entre cette association, la police de frontière, la gendarmerie, l'autorité de l'eau, l'inspection sanitaire vétérinaire et des institutions de recherche (Faculté de Médecine vétérinaire de Cluj, Museum National d'Histoire Naturelle de Bucarest, Université Ovidius de Constanța, etc.)

Trois espèces sont susceptibles de s'échouer : le marsouin commun, le dauphin commun et le grand dauphin. La majorité des échouages a lieu au mois de mai. Comme en France, les commémoratifs sont notés et une autopsie est réalisée si possible.

Nous y avons réalisé un stage au mois de mai 2012, ce qui nous a permis de nous rendre sur de nombreux échouages (annexe 4), de participer à quelques autopsies (annexe 5) et d'obtenir des échantillons à analyser.

1.1.3 Échantillons analysés

Des échantillons ont pu être obtenus *via* :

- le département « mammifères marins et oiseaux de mer » d'Océanopolis à Brest en juin 2011 (muscles et cœurs collectés entre 2001 et 2011 pour la quasi-totalité et en novembre 1991 pour un phoque gris) ;
- l'association Oceanic club en mai 2012 (échantillons collectés en 2011 et 2012, prélèvement de plusieurs organes à chaque autopsie (muscle inter-costal, diaphragme, cœur, foie, langue) ;
- le CRMM de La Rochelle en juillet 2012 (muscles dorsaux collectés au cours des années 2011 et 2012).

Les caractéristiques des individus obtenus (espèces et organismes de collecte des échantillons) sont résumées dans le tableau 5.

Pour la recherche de *T. gondii*, tous les prélèvements provenant de La Rochelle et de Constanța ont été analysés à la fois par sérologie et PCR. Concernant les prélèvements d'Océanopolis, 13 échantillons ont pu être analysés par sérologie. La PCR a été effectuée sur les échantillons ayant donné un résultat positif en sérologie, ainsi que sur ceux qui n'avaient pas pu être analysés par sérologie, soit 16 prélèvements au total.

La recherche de *Trichinella* spp. a été effectuée sur 11 échantillons musculaires de cétacés de la Rochelle et sur 5 échantillons musculaires de phoques gris provenant d'Océanopolis.

Tableau 5. Nombre d'individus obtenus, espèces et centres de collecte

	Océanopolis, Brest		CRMM, La Rochelle	Oceanic club, Constanța (Roumanie)	Nombre total d'individus
	Muscles	Coeur			
Phoques gris (<i>Halichoerus grypus</i>)	11	6			17
Phoque veau-marin (<i>Phoca vitulina</i>)		1			1
Dauphins communs (<i>Delphinus delphis</i>)	3	4	5	2	13 *
Marsouins communs (<i>Phocoena phocoena</i>)			4	7	11
Grands dauphins (<i>Tursiops truncatus</i>)				3	3
Dauphins bleu et blanc (<i>Stenella coeruleoalba</i>)			2		2
Cachalot (<i>Physeter macrocephalus</i>)			1		1
Total	24*		12	12	48

* Parmi les prélèvements provenant d'Océanopolis, un échantillon de cœur et un échantillon de muscle provenaient du même dauphin.

1.2 Techniques utilisées

1.2.1 Laboratoire d'analyse des résultats

Dans le cadre de cette thèse, nous avons réalisé un stage à l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) au sein de l'unité UMR BIPAR, Biologie moléculaire et immunologie parasitaires et fongiques, basée à Maisons-Alfort. Cette unité créée en 1999 regroupe quatre équipes : une équipe de l'ENVA, une unité INRA (Institut national de la recherche agronomique), une unité propre de Parasitologie de l'ANSES et le laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Créteil.

C'est au sein de l'équipe de recherche «Nématodes et protozoaires transmis par les aliments» que nous avons effectué la partie expérimentale de notre thèse.

1.2.2 Recherche de la présence de *Toxoplasma gondii*

1.2.2.1 L'ADHS, description de la méthode

L'ADHS (Agglutination Directe de Haute Sensibilité), indiquée dans la littérature anglo-américaine sous le nom de MAT (Modified Agglutination Test) est une technique sérologique reposant sur la détection des anticorps anti-*T. gondii*, notamment les IgG, que l'on retrouve dans le sérum tout au long de l'infestation parasitaire. On utilise des antigènes figurés : les tachyzoïtes trypsinés, puis formolés, qui s'agglutineront au fond des cupules en présence d'anticorps. La réaction est réalisée sur des dilutions de sérums. Cette méthode dérive de l'AG (Toxoplasma agglutination test), mais qui manquait de sensibilité et de spécificité, conséquence de la présence des IgM.

L'antigène est préparé selon le protocole de Desmonts et Remington (1980) par le Centre National de Référence de la toxoplasmose de Reims. L'antigène de *Toxoplasma gondii* (souche RH) est obtenu chez la souris par multiplication des tachyzoïtes dans des cellules sarcomateuses (TG 180) dans la cavité péritonéale. Les tachyzoïtes sont lavés, sensibilisés par trypsination, puis formolés.

Les prélèvements musculaires nous ont été expédiés congelés. Leur décongélation nous a permis de récupérer les fluides dans des tubes Falcon de 15 mL, que nous avons ensuite centrifugés 10 mn à 3000 rpm. Les surnageants ont été transvasés dans des tubes Eppendorf de 2 mL.

Nous avons effectué une première dilution du serum au 1/3 dans du tampon PBS (tampon phosphate salin). Les dilutions suivantes, au 1/6^{ème}, au 1/12^{ème}, au 1/24^{ème} et au 1/48^{ème}, ont été réalisées dans du 2-ME (2 mercaptoéthanol) ou du DTT (dithioérythritol) (les deux molécules sont apparentées) dilué au 1/50^{ème} dans une solution de PBS. Les différentes dilutions de sérum ont été mises en présence de l'antigène dilué au 1/17^{ème} dans du tampon BABS (Borate Albumine Buffer Saline). La lecture des plaques a eu lieu le lendemain. (Pour un protocole plus détaillé, cf. annexe 1.)

Si le sérum contient des IgG, celles-ci vont se fixer sur les cibles antigéniques et s'agglutiner, à l'origine d'un voile au fond de la cupule. En l'absence d'anticorps, les tachyzoïtes vont sédimenter au fond et forment un petit point blanc (cf. annexe 6). En cas de résultat positif au 1/48^{ème}, 12 dilutions (1/6^{ème}, 1/12^{ème}, 1/24^{ème}, 1/48^{ème}, 1/96^{ème}, 1/192^{ème}, 1/384^{ème}, 1/768^{ème}, 1/1536^{ème}, 1/3072^{ème}, 1/6144^{ème}, 1/12 288^{ème}) sont alors effectuées de la même manière.

1.2.2.2 Digestion enzymatique trypsique

En préalable à la PCR, une digestion enzymatique artificielle des tissus est nécessaire, pour permettre la « libération » des parasites et leur concentration (annexe 2). La digestion trypsique des échantillons musculaires est réalisée sur des prélèvements préalablement broyés dans une moulinette de Moulinex pendant quelques secondes. Les échantillons sont homogénéisés dans une solution de trypsine diluée en eau physiologique stérile (pour 200 g d'organe : 30 mL de trypsine et 270 mL d'eau physiologique stérile) puis incubés pendant 1h30 à 37°C. Après cette incubation, le broyat est filtré au travers de 2 épaisseurs de gaze

(éliminant les plus gros débris) ; le filtrat est réparti dans des tubes Falcon de 50 mL puis centrifugé (3000 rpm pendant 10 mn). Le surnageant est éliminé et plusieurs lavages en eau stérile et centrifugations sont effectués afin de récupérer un culot, qui peut être conservé au congélateur avant l'étape suivante (*cf.* Annexe 6).

1.2.2.3 Extraction d'ADN

Les culots obtenus à l'étape précédente sont soumis à l'étape d'extraction d'ADN *via* le Mini Kit QIAamp DNA (QIAGEN) en suivant les instructions indiquées pour des échantillons tissulaires. Le protocole est le suivant :

- ✓ Dans chaque tube Eppendorf contenant 300 µL de culot, ajouter 1 mL de tampon TE (tris-EDTA) pour effectuer un dernier lavage,
- ✓ Vortexer puis centrifuger 5 min à 12 500 g,
- ✓ Vider le surnageant, bien essuyer le tube,
- ✓ Ajouter 180 µL de tampon ATL et 20 µL de protéinase K, mélanger pour remettre en suspension, puis vortexer,
- ✓ Mettre au bain-marie à 56°C overnight,
- ✓ Effectuer un short-run (centrifugation très rapide) pendant 1 min,
- ✓ Ajouter 200 µL de tampon AL,
- ✓ Vortexer pendant 15 s,
- ✓ Incuber 10 min, à 70 °C,
- ✓ Effectuer un nouveau short-run pendant 1 min,
- ✓ Ajouter 200 µL d'éthanol pur (100 %) puis vortexer,
- ✓ Short run 1 min,
- ✓ Transvaser le contenu de chaque tube sur une colonne, bien au centre,
- ✓ Centrifuger 1 min à 8000 rpm (6000 g),
- ✓ Jeter les tubes collecteurs et replacer chaque colonne dans un nouveau tube collecteur,
- ✓ Ajouter 500 µL de tampon AW1,
- ✓ Centrifuger 1 min à 8000 rpm (6000 g),
- ✓ Retransvaser chaque colonne dans un nouveau tube collecteur,
- ✓ Ajouter 500 µL de tampon AW2,
- ✓ Centrifuger 3 min à 14 000 rpm (20 000 g),
- ✓ Changer de tube collecteur et refaire une nouvelle centrifugation 1 min à 14 000 rpm,
- ✓ Jeter le tube collecteur et placer la colonne dans un tube Eppendorf de 1,5 mL,
- ✓ Ajouter 100 µL de tampon d'élution (AE) et laisser incuber 5 min à température ambiante,
- ✓ Centrifuger 1 min à 8000 rpm,
- ✓ Ajouter 100 µL de tampon AE,
- ✓ Centrifuger 1 min à 8000 rpm,
- ✓ Jeter les colonnes et conserver les tubes Eppendorf à -80°C.

1.2.2.4 La PCR quantitative en temps réel

1.2.2.4.1 Présentation de la technique

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode de biologie moléculaire mise au point en 1985 par Kary Mullis, qui obtint pour ces travaux le prix Nobel de Chimie en 1993.

La réaction PCR permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour ce faire, une série de réactions permettant la réplique d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle (Borde, 2006).

La PCR quantitative en temps réel est une application de la PCR. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR.

Le profil d'une réaction PCR classique peut se décomposer en 3 étapes :

- une première étape dite de bruit de fond
- une seconde étape de phase exponentielle de croissance
- une dernière étape dite phase de plateau

La phase de bruit de fond s'achève lorsque le nombre de produits PCR néo formés dépasse la valeur seuil de la technique de détection utilisée. Puis, on assiste durant la phase exponentielle au doublement du nombre de produits PCR à chaque cycle. Enfin, la phase de plateau débute lorsque les constituants ou réactifs de la PCR deviennent limitants.

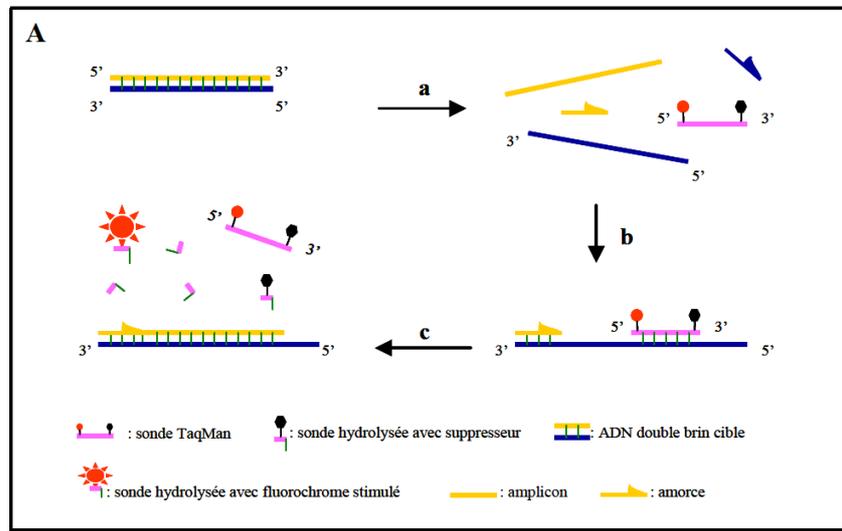
La réaction PCR en temps réel suit exactement le même profil : on enregistre une augmentation de fluorescence (en fait du nombre de produits PCR) au cours du temps.

Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin et les sondes fluorescentes. Pour cette dernière catégorie, il existe actuellement quatre technologies principales : hydrolyse de sondes (Taqman assay), hybridation de 2 sondes (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion (Scorpion primers) (Poitras et Houde, 2002).

La technique la plus fréquemment utilisée jusqu'à maintenant est l'hydrolyse de sondes (Taqman assay). La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3'. Lorsqu'il est stimulé, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (fluorescence resonance energy transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence. Étant donné que l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise. Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. À l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. Le reporter est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde (figure 42) (Poitras et Houde, 2002).

Figure 42. Hydrolyse de sondes (Poitras et Houde, 2002)

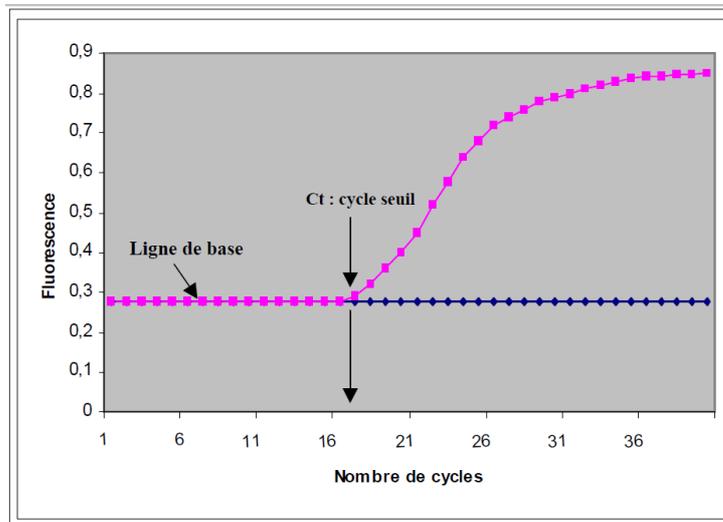
(a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.



Comme la Taq polymérase hydrolysera la sonde seulement lorsque celle-ci est hybridée à sa séquence complémentaire, les conditions de température de l'étape de polymérisation doivent être ajustées de façon à permettre à la sonde de rester hybridée durant cette étape. La majorité des sondes a une température de dissociation autour de 70°C ou de 5 à 10°C plus élevée que les amorces. Par conséquent, la technologie Taqman utilise une étape combinée d'hybridation et de polymérisation à 60-62°C assurant l'hybridation et la stabilité de la sonde durant l'extension. Ceci permet aussi une activité 5-exonucléasique maximale de la Taq polymérase mais l'efficacité de l'activité de polymérisation de l'enzyme sera légèrement réduite à cette température suboptimale (Poitras et Houde, 2002).

Le concept du « cycle seuil » est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction. Plus il y a de matrices (template) à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond. Autrement dit, le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence atteigne une valeur seuil est inversement corrélé au nombre de molécules cibles à l'origine. Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct pour Cycle threshold ou Cp pour Crossing point) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification (figure 43). Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues (Poitras et Houde, 2002).

Figure 43. Modèle graphique de la PCR en temps réel (Poitras et Houde, 2002)



La PCR quantitative en temps réel va permettre d'obtenir une grande précision de calcul (par la valeur décimale du Ct), une standardisation des expériences et une meilleure sensibilité que les techniques de PCR semi-quantitative.

1.2.2.4.2 Application de la PCR en temps réel à la recherche de kystes de toxoplasmes

On utilise un LightCycler 480 Software (Roche Diagnostics) pour la PCR quantitative en temps réel. Le mélange réactionnel est réalisé sous hotte dans une plaque à micropuits. Il est constitué de 12,5 μL de Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen™ life technologies) contenant entre autres la TaqPolymerase ainsi que les desoxyribonucléotides, 0,5 μL de sonde (6FAM-ACG CTT TCC TCG TGG TGA TGG CG-TAMRA), 0,5 μL de chacune des amorces Forward et Reverse (5'-AGA GAC ACC GGA ATG CGA TCT-3' et 5'-CCC TCT TCT CCA CTC TTC AAT TCT-3'), 1 μL du tampon MgCl_2 , 5 μL d' H_2O et de 5 μL d'ADN à analyser, soit 25 μL par puits. La cible est l'élément rep529. Il s'agit d'une séquence non-codante répétée en tandem (nombre de répétitions connu approximativement autour de 300) (Lélu *et al.*, 2011). Chaque échantillon est déposé dans 2 plaques successives. Le témoin positif est constitué d'ADN de tachyzoïtes d'une souche RH de *Toxoplasma gondii*, le témoin négatif contient de l'eau à la place de l'ADN. La plaque est initialement mise à incuber 3 min à 50°C. Cette étape est suivie par une autre étape d'incubation de 3 min 30 à 95°C, pour dénaturer l'ADN et activer la Taq polymérase. Il se produit ensuite 40 cycles successifs constitués de la dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 15 s, puis de l'hybridation et de la polymérisation à 60°C pendant 1 min. Les résultats sont donnés sous la forme du nombre de cycles nécessaires pour atteindre le seuil de détection (Ct).

1.2.3 Recherche de la présence de *Trichinella* spp. par digestion artificielle pepsique

La recherche des larves de *Trichinella* spp. dans les viandes s'effectue par une technique de digestion artificielle par la pepsine, en milieu acide et à chaud, sur des prélèvements préalablement broyés (figure 44). Il est possible de créer des pools d'échantillons : en cas de résultat positif du pool, l'analyse est effectuée une nouvelle fois sur les échantillons individuels. Ceci est intéressant dans le cas où peu de prélèvements se révèlent être positifs : la négativité du pool d'échantillons implique la négativité de chacun.

Les prélèvements musculaires sont découpés en petits morceaux puis hachés grossièrement. Lors d'une analyse de diagnostic réglementaire, la quantité de viande analysée doit être égale à 100 g. En parallèle, on verse 2 L d'eau dans un bécher posé sur un agitateur magnétique chauffant et on y ajoute 16 mL d'acide chlorhydrique à 25 % et 30 mL de pepsine liquide. La viande hachée est transférée dans le bécher d'eau chaude à 45°C pendant 30 min au minimum. Au bout de ces 30 min de digestion, le liquide est versé dans une ampoule à décanter au travers d'un tamis à mailles de 180 µm. On laisse le liquide 30 min à décanter puis on laisse couler rapidement 40 à 100 mL du liquide dans une éprouvette graduée. On laisse reposer l'éluat 10 min puis on aspire le surnageant afin de garder 10 mL de sédiment au maximum. Si le liquide paraît trop trouble pour une lecture, on peut effectuer un rinçage en ajoutant 30 mL d'eau du robinet et en laissant reposer à nouveau 10 min. On aspire ensuite le surnageant afin de garder 10 mL de sédiment.

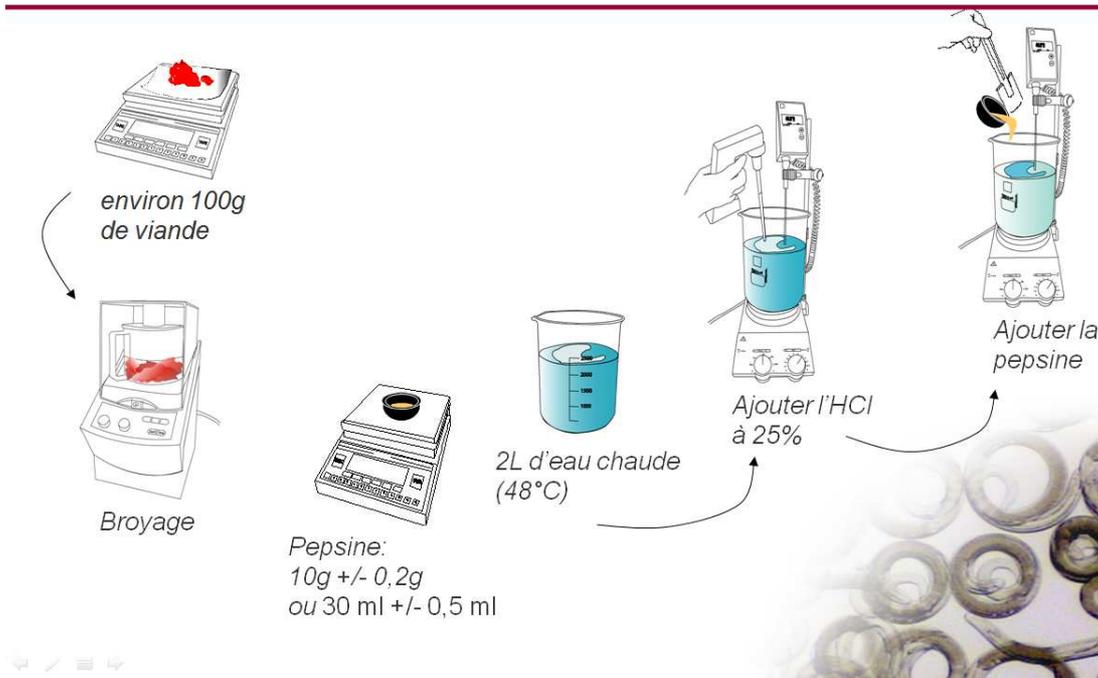
Pour la lecture, le sédiment est remis en suspension puis versé dans une boîte de Pétri quadrillée. Les larves du parasite sont recherchées à la loupe binoculaire à un grossissement x15 à x20 (le protocole détaillé est disponible en annexe 3).

Dans le cadre de notre étude, nous avons effectué deux séries d'analyses. Nous avons dans un premier temps analysé des échantillons musculaires de cétacés provenant de La Rochelle. Nous avons créé deux pools de 5 et 6 prélèvements pesant chacun 15 g (+/- 0,5 g).

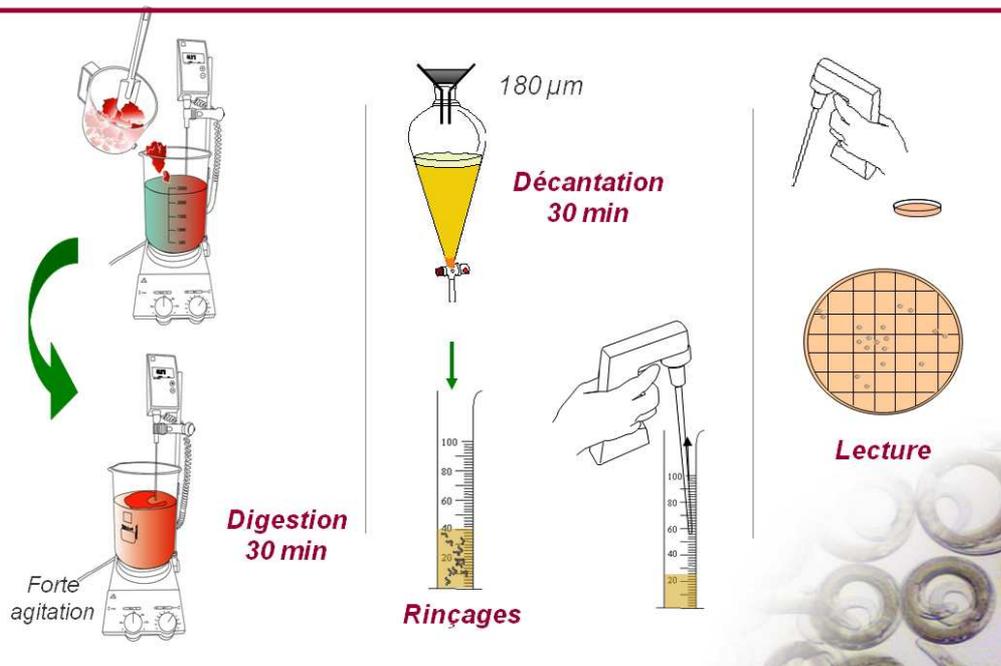
Nous avons par la suite analysé 5 échantillons de phoques gris provenant d'Océanopolis à Brest. La masse des échantillons étant assez faible, nous avons analysé un pool de 4 échantillons de 10 g (+/- 0,5 g), afin de conserver une masse de prélèvements suffisante en cas de résultat positif pour pouvoir refaire l'analyse. Le dernier prélèvement pesait seulement 12 g, nous l'avons donc analysé individuellement.

Figure 44. Technique de digestion artificielle pepsique (d'après documents de l'ANSES)

Préparation des réactifs



Digestion et décantation



2 Résultats

2.1 Recherche de *T. gondii*

2.1.1 Pré-requis chez les chats

Pour chaque chat, les prélèvements de cœur et de diaphragme avaient été conditionnés ensemble, nous avons donc effectué nos analyses sans différencier les deux organes.

Pour l'ADHS, nous avons effectué 4 dilutions, puis 12 si celles-ci se révélaient positives. Sur les 23 chats, un échantillon (le numéro 13) n'a pas permis de récupérer du fluide musculaire. Les résultats sérologiques sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6. Résultats de l'ADHS pour les chats

	Positifs au :					Non effectué
	Négatifs	1/6 ^{ème}	1/24 ^{ème}	1/192 ^{ème}	1/3072 ^{ème}	
Nombre de chats par catégorie	15	2	2	1	2	1

Sur les 22 analyses effectuées en sérologie, 15 se sont révélées négatives. Parmi les 7 prélèvements positifs, les résultats s'échelonnaient du 1/6^{ème} au 1/3072^{ème} (10^{ème} dilution sur les 12 effectuées). La séroprévalence totale était de 32 %.

Concernant la PCR, nous n'avons pas pu récupérer de culot pour l'échantillon numéro 15. Les 22 autres échantillons ont été analysés en duplicat. Nous avons donc obtenu deux Ct pour chaque échantillon. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7. Résultats de la PCR pour les chats

	NEG	POS (-/35,00)	POS (35,00/35,00)	POS (33,75/32,90)	POS (30,98/30,60)	POS (28,96/28,36)	Non effectué
Nombre de chats	12	6	1	1	1	1	1

Dix prélèvements se sont révélés positifs en PCR. Le taux de positivité par la PCR était donc de 45 %. Parmi les résultats positifs, de nombreuses valeurs de Ct étaient égales à 35,00 : 6 échantillons pour un seul duplicat et un échantillon pour les deux duplicats. Trois chats ont par ailleurs présenté des valeurs de Ct plus basses que 35,00, la quantité d'ADN présente dans ces échantillons était donc supérieure à celle présente dans les 7 autres échantillons positifs.

Les résultats individuels pour chaque chat sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Résultat détaillé des analyses effectuées chez les chats de l'ENVA

N° d'analyse	Numéro de dossier à l'ENVA	Résultats sérologie	Résultats PCR
1	A09-10776	NEG	POS (35,00/-)
2	A10-15207	NEG	POS (35,00/-)
3	A11-870	NEG	POS (35,00/-)
4	A12-2585	POS au 1/3072ème	Cp1=28,96, Cp2=28,36 (Cpmoy=28,66)
5	A12-2849	NEG	Cp1=30,98, Cp2=30,60 (Cpmoy=30,79)
6	A12-2881	POS au 1/6ème	Cp1=33,75, Cp2 =32,90 (Cpmoy =33,33)
7	A12-2912	NEG	NEG
8	A12-2938	NEG	POS (35,00/-)
9	A12-2940	POS au 1/24ème	POS (35,00/-)
10	A12-2971	POS au 1/192ème	NEG
11	A12-2992	NEG	POS (35,00/35,00)
12	A12-4785	NEG	NEG
13	A12-5186		NEG
14	A12-5202	NEG	NEG
15	A12-5838	POS au 1/24ème	
16	A12-5953	NEG	NEG
17	A12-6389	POS au 1/3072ème	NEG
18	A12-6885	NEG	POS (35,00/-)
19	A12-6900	NEG	NEG
20	A12-6921	NEG	NEG
21	A12-7553	POS au 1/6ème	NEG
22	A12-7557	NEG	NEG
23	A12-7570	NEG	NEG

Ce tableau 8 met en parallèle les résultats obtenus pour chaque chat *via* les deux techniques de diagnostic. Le tableau 9 regroupe les résultats en différentes catégories en fonction des résultats d'ADHS et de PCR.

Tableau 9. Mise en parallèle des résultats obtenus par ADHS et PCR chez les chats

Résultats de l'ADHS	Résultats de la PCR	Corrélation	Nombre d'individus
Non effectué	NEG	Sans objet	1
POS au 1/24 ^{ème}	Non effectué		1
NEG	NEG	NEG/NEG	8
NEG	POS (-/35,00)	NEG en ADHS/POS en PCR	5
NEG	POS (35,00/35,00)		1
NEG	POS (30,98/30.60)		1
POS au 1/6 ^{ème}	NEG	POS en ADHS/NEG en PCR	1
POS au 1/192 ^{ème}	NEG		1
POS au 1/3072 ^{ème}	NEG		1
POS au 1/6 ^{ème}	POS (33,75/32,90)	POS/POS	1
POS au 1/24 ^{ème}	POS (-/35,00)		1
POS au 1/3072 ^{ème}	POS (28,96/28,36)		1
			Total : 23

Parmi les 23 chats, seuls 21 peuvent faire l'objet d'une comparaison entre les deux techniques de diagnostic. D'après le Tableau 9, 11 échantillons (52 %) sont à l'origine de résultats cohérents entre les deux méthodes : 8 sont négatifs dans les 2 cas et 3 sont positifs par sérologie et biologie moléculaire.

Dix prélèvements ont, au contraire, été à l'origine de résultats discordants entre les deux techniques. Sept d'entre eux étaient séronégatifs mais la PCR a détecté de l'ADN, tandis que trois échantillons positifs à l'ADHS n'ont pas été à l'origine d'une réponse positive en PCR.

2.1.2 Prélèvements français

2.1.2.1 Provenant d'Océanopolis, Brest

Les prélèvements provenant d'Océanopolis ont été analysés en juillet 2011. Treize échantillons ont pu être analysés en sérologie, les douze autres échantillons ne nous ayant pas permis de récolter du fluide musculaire. Les résultats sont présentés dans le tableau 10.

Parmi les 13 échantillons analysés par ADHS, 9 ont présenté un résultat négatif, un était positif au 1/12^{ème}, 2 au 1/48^{ème} et un au 1/384^{ème}.

Concernant les espèces, 9 échantillons de phoques gris ont été analysés (5 muscles et 4 cœurs) ; seul un cœur était séropositif. Pour les dauphins communs, le muscle analysé était positif au 1/12^{ème} et 2 cœurs sur les 3 analysés étaient séropositifs (1/48^{ème} et 1/384^{ème}).

Tableau 10. Résultats de l'ADHS pour les prélèvements provenant d'Océanopolis

		Positifs au :				Non effectué	Total
		Négatifs	1/12 ^{ème}	1/48 ^{ème}	1/384 ^{ème}		
Phoques gris	Muscles	5				6	11
	Cœurs	3		1		2	6
Phoque veau-marin	Cœur					1	1
Dauphins communs	Muscles		1			2	3
	Cœurs	1		1	1	1	4
Total		9	1	2	1	12	25

Nous avons analysé par PCR (tableau 11) les 4 échantillons séropositifs ainsi que les 12 prélèvements n'ayant pas permis de récupérer du fluide musculaire.

Tableau 11. Résultats de la PCR pour les prélèvements provenant d'Océanopolis

		NEG	POS (-/35,00)	Non effectué	Total
Phoques gris	Muscles	5	1	5	11
	Cœurs	3		3	6
Phoque veau-marin	Cœur		1		1
Dauphins communs	Muscles	3			3
	Cœurs	3		1	4
Total		14	2	9	25

Quatorze des 16 échantillons se sont révélés négatifs en PCR et 2 (un muscle de phoque gris et le cœur du phoque veau-marin) étaient positifs pour un seul duplicat (-/35,00).

Le détail des résultats obtenus individuellement par les deux techniques est indiqué dans le tableau 12.

Tableau 12. Détail des résultats des deux techniques effectuées sur les échantillons provenant d'Océanopolis, Brest

Echantillon	Numéro à Océanopolis (espèce, date d'autopsie et type d'échantillon (muscle ou cœur))	Résultats sérologie	Résultats PCR
Phoques gris (<i>Halichoerus grypus</i>)			
HgM 001	Hg 061191 M	NEG	
HgM 002	Hg 110401 M	NEG	
HgM 003	Hg 130401 M	NEG	
HgM 004	Hg 021203 M		NEG
HgM 005	Hg 270504 M	NEG	
HgM 006	Hg 141204 M		NEG
HgM 007	Hg 290105 M		POS (35.00/-)
HgM 008	Hg 150205 M		NEG
HgM 009	Hg 230205 M		NEG
HgM 010	Hg 140405 M	NEG	
HgM 011	Hg 191110 M		NEG
HgC 001	Hg 190408 C	NEG	
HgC 002	Hg 230209 C	NEG	
HgC 003	Hg 041209 C		NEG
HgC 004	Hg 201209 C		NEG
HgC 005	Hg 311209 C	NEG	
HgC 006	Hg 280410 C	POS au 1/48ème	NEG
Phoque veau-marin ou commun (<i>Phoca vitulina</i>)			
PvC 001	Pv 040910 C		POS (-/35.00)
Dauphins communs (<i>Delphinus delphis</i>)			
DdM 001	Dd 071209 M	POS au 1/12ème	NEG
DdM 002	Dd 270210 B M		NEG
DdM 003	Dd 150111 M		NEG
DdC 001	Dd 250110 C	NEG	
DdC 002	Dd 270210 B C	POS au 1/48ème	NEG
DdC 003	Dd 241010 C	POS au 1/384ème	NEG
DdC 004	Dd 150111 C		NEG

Les deux échantillons ayant présenté un résultat positif en PCR n'avaient pas pu être analysés en ADHS, nous ne pouvons donc pas comparer ces résultats avec ceux de sérologie. Concernant les 4 échantillons séropositifs, les seuls provenant d'Océanopolis à avoir été analysés à la fois en sérologie et en biologie moléculaire, tous se sont révélés négatifs en PCR.

Un dauphin commun avait donné lieu à deux échantillons : cœur et muscle. Le muscle n'avait pas permis d'obtenir de fluide, en revanche le cœur était séropositif au 1/48^{ème}. Les deux échantillons ont été analysés par PCR, les deux résultats se sont révélés négatifs l'un comme l'autre.

2.1.2.2 Provenant du CRMM de La Rochelle

Tous les échantillons provenant du CRMM ont pu être analysés par sérologie (cf. tableau 13). En revanche, seuls 10 échantillons ont pu être analysés par PCR, deux ne nous ayant pas permis de récupérer de culot (cf. Tableau 14).

Tableau 13. Résultats de l'ADHS pour les prélèvements provenant du CRMM

		Positifs au :			Total
		1/6 ^{ème}	1/24 ^{ème}	1/48 ^{ème}	
Dauphins communs		1	3	1	5
Dauphins bleus et blancs	1		1		2
Marsouins communs	3			1	4
Cachalot	1				1
Total	5	1	4	2	12

Parmi les 12 prélèvements analysés (tableau 13), 7 se sont révélés séropositifs du 1/6^{ème} au 1/48^{ème}. Il est intéressant de noter que les 5 dauphins communs analysés ont présenté un résultat positif.

Tableau 14. Résultats de la PCR pour les prélèvements provenant du CRMM

	NEG	POS (- /35,00)	POS (35,00/35,00)	POS (30,93/31,18)	Non effectué	Total
Dauphins communs	2	1	2			5
Dauphins bleu et blanc	2					2
Marsouins communs	2				2	4
Cachalot				1		1
Total	6	1	2	1	2	12

Parmi les 10 échantillons analysés par PCR, 4 d'entre eux, dont 3 dauphins communs, étaient positifs, mais un seul (le cachalot) a présenté des Ct plus bas que 35,00 (tableau 14).

Le détail de tous les résultats est présenté dans le tableau 15.

Tableau 15. Résultats détaillés pour les deux techniques pour les prélèvements provenant de La Rochelle

Date de collecte	Sexe	Résultats sérologie	Résultats PCR
Dauphins communs (<i>Delphinus delphis</i>)			
février-11	f	POS au 1/24^{ème}	NEG
mars-12	f	POS au 1/24^{ème}	POS (35,00/-)
déc-11	f	POS au 1/48^{ème}	NEG
févr-11	f	POS au 1/24^{ème}	POS (35,00/35,00)
juin-12	m	POS au 1/6^{ème}	POS (35,00/35,00)
Dauphins bleus et blancs (<i>Stenella coeruleoalba</i>)			
juin-12	f	POS au 1/24^{ème}	NEG
mai-12	f	NEG	NEG
Marsouins communs (<i>Phocoena phocoena</i>)			
mai-12	m	NEG	
déc-11	f	NEG	
avr-12	m	NEG	NEG
déc-11	f	POS au 1/48^{ème}	NEG
Cachalot (<i>Physeter macrocephalus</i>)			
juil-12	f	NEG	Cp1 = 30,93, Cp2 = 31,18 (31,05 en moyenne)

D'après le tableau 15, on remarque que parmi les 10 individus analysés des deux manières, 2 individus sont négatifs dans les deux analyses et 3 sont positifs dans les deux analyses. Au contraire, quatre échantillons positifs en sérologie ont donné un résultat négatif en PCR. Enfin, un échantillon séronégatif s'est révélé positif en PCR avec un Ct moyen de 31,05.

Le tableau 16 présente le résumé de ces données en fonction des résultats obtenus par les deux méthodes.

Tableau 15. Mise en parallèle des résultats obtenus par ADHS et PCR pour les mammifères marins provenant du CRMM de La Rochelle

Résultats de l'ADHS	Résultats de la PCR	Corrélation	Nombre d'individus
NEG	Non effectué	Sans objet	2
NEG	NEG	NEG/NEG	2
NEG	POS (30,93/31,18)	NEG en ADHS/POS en PCR	1
POS au 1/24 ^{ème}	NEG	POS en ADHS/NEG en PCR	2
POS au 1/48 ^{ème}	NEG		2
POS au 1/6 ^{ème}	POS (35,00/35,00)	POS/POS	1
POS au 1/24 ^{ème}	POS (-/35,00)		1
POS au 1/24 ^{ème}	POS (35,00/35,00)		1
			Total : 12

Si l'on s'intéresse aux espèces, on peut noter que les 5 dauphins communs ont présenté un résultat séropositif et 3 sur 5 étaient positifs en PCR. Concernant les 2 dauphins bleu et blanc, l'un était séropositif au 1/24^{ème}, mais les 2 se sont révélés négatifs en PCR ; de même, parmi les 4 marsouins communs, un était séropositif au 1/48^{ème}, mais les 2 analysés en PCR étaient négatifs (2 marsouins communs séronégatifs n'ont pas pu être analysés en PCR, faute de culot). Le prélèvement positif en PCR, mais négatif en ADHS, provient d'un cachalot.

2.1.3 Prélèvements roumains

Pour chaque individu, plusieurs organes étaient disponibles et conditionnés individuellement. Les fluides ont été récupérés et analysés séparément. Le détail des résultats de l'ADHS est présenté dans le tableau 17.

Tableau 16. Résultats de l'ADHS pour les organes de mammifères marins de Roumanie analysés individuellement

Espèce	N°	Organes ayant permis de récupérer du fluide					
		Cœur	Diaphragme	Muscle inter-costal	Poumon	Sang	Autre muscle
Grands dauphins	1	1/24 ^{ème}	NEG	1/24 ^{ème}			
	2		1/12 ^{ème}	1/12 ^{ème}			dorsal : 1/12 ^{ème}
	3	1/96 ^{ème}	1/48 ^{ème}				abdo : 1/24 ^{ème}
Dauphins communs	4	1/48 ^{ème}	1/48 ^{ème}				
	5	NEG			NEG		
Marsouins communs	6	NEG					
	7	1/12 ^{ème}	1/12 ^{ème}		1/48 ^{ème}		
	8				1/48 ^{ème}		
	9			NEG	NEG		
	10	NEG			1/6 ^{ème}	NEG	
	11	1/12 ^{ème}	1/24 ^{ème}	1/24 ^{ème}	1/24 ^{ème}	1/48 ^{ème}	
	12	NEG	NEG				NEG

Si l'on se réfère au tableau 17, 4 individus étaient séronégatifs pour les différents organes analysés et l'individu n° 10 peut être considéré comme séronégatif, puisque seul le poumon donnait un résultat positif faible (au 1/6^{ème}), tandis que le cœur et le sérum étaient négatifs. Les individus n° 2 et 4 présentaient des résultats positifs concordants pour les différents organes analysés. En revanche, les individus n° 1, 3, 7 et 11 présentaient différentes valeurs de séropositivité selon les organes analysés, pouvant aller jusqu'à 2 dilutions successives de différence.

Les échantillons ont ensuite été analysés par PCR. Pour chaque individu, nous avons regroupé dans la même analyse plusieurs prélèvements d'organes (cœur, diaphragme et muscle inter-costal). Les résultats sont synthétisés dans le tableau 18.

Tableau 17. Résultats de la PCR pour les prélèvements roumains

	NEG	POS (-/35,00)	POS (35,00/35,00)	Total
Grands dauphins		2	1	3
Dauphins communs	1		1	2
Marsouins communs	5	2		7
Total	6	4	2	12

Pour la PCR (tableau 18), 50 % des échantillons (6 sur 12) étaient négatifs. Parmi les échantillons positifs, 4 présentaient un Ct à 35,00 pour un des duplicats et 2 présentaient les 2 Ct à 35,00.

Les résultats individuels pour les deux méthodes sont présentés dans le tableau 19. Quatre individus, un dauphin commun et trois marsouins communs sont négatifs par les deux méthodes. Deux individus semblent assez positifs (1/48^{ème} en sérologie en moyenne et les 2 Ct à 35,00) : il s'agit d'un dauphin commun et d'un grand dauphin. Les 2 autres grands dauphins ainsi qu'un marsouin commun sont positifs en sérologie et en PCR avec un Ct à 35,00 pour un duplicat. Enfin, parmi les marsouins, 3 sont à l'origine de résultats non cohérents : 2 sont séropositifs mais négatifs en PCR et inversement pour le dernier.

Tableau 18. Résultats détaillés pour les deux méthodes pour les échantillons de mammifères marins de Mer Noire

N°	Date de collecte	Sexe	Poids de l'échantillon analysé	Résultats sérologie	Résultats PCR
Grands dauphins (<i>Tursiops truncatus</i>)					
1	01/05/2012		58 g (20 g cœur, 20 g diaphragme, 18 g mIC)	POS au 1/24^{ème} pour cœur et mIC, NEG pour diaphragme	POS (35,00/-)
2	06/05/2012		48 g (18 g diaphragme, 30 g mIC)	POS au 1/12^{ème}	POS (35,00/-)
3	27/05/2012		53 g (16 g cœur, 18 g diaphragme, 19 g mIC)	POS au 1/96^{ème} pour le cœur, 1/48^{ème} pour le diaphragme et 1/24^{ème} pour le muscle dorsal	POS (35,00/35,00)
Dauphins communs (<i>Delphinus delphis</i>)					
4	26/05/2012		54 g (18,5 g cœur, 20 g diaphragme, 15,5 g mIC)	POS au 1/48^{ème}	POS (35,00/35,00)
5	27/04/2011		40 g (20 g cœur, 20 g diaphragme)	NEG	NEG

N°	Date de collecte	Sexe	Poids de l'échantillon analysé	Résultats sérologie	Résultats PCR
Marsouins communs (<i>Phocoena phocoena</i>)					
6	31/05/2012	f	59 g (22 g cœur, 18 g diaphragme, 19 g mIC)	NEG	NEG
7	23/05/2011	f	45,5 g (14,5 g cœur, 16,5 g diaphragme, 14,5 g mIC)	POS au 1/12^{ème} pour cœur et diaphragme et au 1/48^{ème} pour le poumon	NEG
8	01/07/2011		30 g poumon	POS au 1/48^{ème}	NEG
9	27/05/2011	bébé m	42 g (17 g cœur, 15 g diaphragme, 10 g m IC)	NEG	POS (35,00/-)
10	31/05/2011	f	43 g (17 g cœur, 14 g diaphragme, 12 g mIC)	NEG	NEG
11	31/05/2011	m	48g (15,5 g cœur, 17,5 g diaphragme, 15 g mIC)	POS au 1/12^{ème} pour cœur, au 1/24^{ème} pour diaphragme, muscle intercostal et poumon et 1/48^{ème} pour le serum	POS (35,00/-)
12	01/07/2011		61g (20 g cœur, 20 g diaphragme, 21 g muscle)	NEG	NEG

Le tableau 20 présente le résumé des résultats pour les deux méthodes.

Tableau 19. Mise en parallèle des résultats obtenus par ADHS et PCR chez les mammifères marins de Roumanie

Résultats de l'ADHS	Résultats de la PCR	Corrélation	Nombre d'individus
NEG	NEG	NEG/NEG	4
NEG	POS (-/35,00)	NEG en ADHS/POS en PCR	1
POS au 1/24 ^{ème}	NEG	POS en ADHS/NEG en PCR	1
POS au 1/48 ^{ème}	NEG		1
POS au 1/12 ^{ème}	POS (-/35,00)	POS/POS	2
POS au 1/24 ^{ème}	POS (-/35,00)		1
POS au 1/48 ^{ème}	POS (35,00/35,00)		2
Total :			12

2.2 Recherche de *Trichinella* spp.

Onze échantillons provenant du CRMM de La Rochelle ont été analysés, le prélèvement provenant du cachalot s'étant trop décomposé. Nous avons choisi d'effectuer deux pools de prélèvements : l'un contenant les 6 échantillons musculaires positifs au 1/24^{ème} et au 1/48^{ème} à l'ADHS lors de la recherche de *T. gondii* et l'autre les 4 échantillons négatifs et l'échantillon positif au 1/6^{ème}. Les deux pools de prélèvements se sont révélés négatifs.

Cinq échantillons musculaires de phoques gris provenant d'Océanopolis, séronégatifs pour *T. gondii*, ont également été analysés. Aucune larve de *Trichinella* spp. n'a été observée.

3 Discussion

L'étude chez le chat a été effectuée en pré-requis et nous a permis d'étudier la corrélation entre les résultats obtenus par ADHS et par PCR, en se basant sur le fait que, le chat étant l'hôte définitif de *Toxoplasma gondii*, nous étions susceptibles d'obtenir plusieurs prélèvements positifs.

Dans notre étude, nous avons obtenu une séroprévalence totale de 32 % au seuil de $1/6^{\text{ème}}$ chez les chats (7 chats séropositifs sur les 22 analysés). La séroprévalence mondiale du parasite chez le chat est estimée entre 30 et 40 %, avec de grandes différences régionales (Dubey, 2010). En France, Afonso *et al.*, (2006) ont obtenu une séroprévalence de 18,6 % chez 301 chats analysés dans la région de Lyon, bien en dessous des séroprévalences moyennes obtenues dans les autres pays européens (70,2 % (243/346) en Belgique (Dorny *et al.*, 2002) ; 45 % (99/220) en Espagne (Gauss *et al.*, 2003) ; 35,8 % (73/204) au Portugal (Lopes, Cardoso, et Rodrigues, 2008)). Dans une étude plus récente, la séroprévalence obtenue dans 3 populations de chats domestiques vivant à la campagne en France était de 52,7 % en utilisant l'ADHS à un seuil de $1/40^{\text{ème}}$ (Afonso *et al.*, 2010).

En se basant sur le seuil de $1/40^{\text{ème}}$ utilisé dans l'étude d'Afonso *et al.* (2010), la séroprévalence est alors de 14 % dans notre étude. Certaines valeurs de séropositivité obtenues dans notre étude sont très élevées ($1/192^{\text{ème}}$ et $1/3072^{\text{ème}}$). Ces valeurs sont cohérentes avec celles obtenues dans les études citées précédemment, pour lesquelles les valeurs élevées de séropositivité sont courantes : dans l'étude de Gauss *et al.* (2003), 57 chats sur 220 étaient séropositifs au $1/50^{\text{ème}}$ et 16 chats l'étaient à des dilutions supérieures ou égales au $1/500^{\text{ème}}$; dans l'étude de Lopes *et al.* (2008), 23,7 % des chats séropositifs l'étaient à une dilution au $1/40^{\text{ème}}$ et 72,4 % l'étaient à une dilution supérieure ou égale à $1/800^{\text{ème}}$.

Concernant les mammifères marins, les résultats globaux d'ADHS sont résumés dans le tableau 21. Ce tableau met en évidence que près de la moitié des mammifères marins analysés (49 % soit 18 animaux sur 37 analysés) a présenté un résultat positif en ADHS à un seuil de $1/6^{\text{ème}}$.

La sensibilité et la spécificité de cette méthode sérologique n'ont pas été évaluées chez ces espèces par identification du parasite par bio-essai (golden standard), cependant c'est le test le plus employé pour la recherche de *T. gondii* chez les animaux et l'étude de Dubey *et al.* (2005) a montré que la sensibilité et la spécificité de l'ADHS étaient meilleures que les autres techniques sérologiques chez les grands dauphins.

Le seuil de positivité le plus fréquemment retenu dans la littérature est de $1/25^{\text{ème}}$ (Dubey, 1997). Étant donné les dilutions que nous effectuons ($1/6^{\text{ème}}$, $1/12^{\text{ème}}$, $1/24^{\text{ème}}$, $1/48^{\text{ème}}$, etc.), la valeur de $1/24^{\text{ème}}$ est la plus proche du $1/25^{\text{ème}}$. En appliquant ce seuil de $1/24^{\text{ème}}$, nous pouvons considérer que 38 % (14 sur 37) des échantillons analysés étaient séropositifs, soit plus d'un tiers des animaux de l'étude.

Cependant, le test n'étant pas encore évalué chez les mammifères marins, il est nécessaire de ne pas négliger les résultats positifs à une valeur inférieure à $1/24^{\text{ème}}$. Une étude (Mikaelian *et al.*, 2000) a d'ailleurs identifié le parasite (tachyzoïtes et bradyzoïtes) dans le cerveau, la rate, les nœuds lymphatiques, les glandes surrénales, les poumons et le thymus d'un bélouga mâle de 6 mois positif au $1/25^{\text{ème}}$ en ADHS, ce qui montre qu'un cétacé fortement infecté par *T. gondii* peut présenter une valeur de séropositivité assez faible.

Tableau 20. Résultats de l'ADHS toxoplasmose en fonction des espèces de mammifères marins et pourcentage total dans chaque catégorie

	Positifs au :						Non effectué	Total analysés	Total positifs	Total $\geq 1/24^{\text{ème}}$	Total
	Négatifs	1/6 ^{ème}	1/12 ^{ème}	1/24 ^{ème}	1/48 ^{ème}	1/384 ^{ème}					
Phoques gris	8				1		8	9	1	1	17
Phoque veau-marin							1				1
Dauphins communs	2	1	1	3	3	1	3	11	9	7	14*
Marsouins communs	7			2	2			11	4	4	11
Grands dauphins			2		1			3	3	1	3
Dauphins bleus et blancs	1			1				2	1	1	2
Cachalot	1							1			1
Total	19	1	3	6	7	1	12	37	18	14	49
% par rapport au total analysé	51 %	3 %	8 %	16 %	19 %	3 %					

* Les deux échantillons provenant du même dauphin commun d'Océanopolis ont été inclus séparément dans l'étude.

D'après le tableau 21, les espèces les plus touchées seraient le dauphin commun (9 séropositifs sur 11, dont 7 au 1/24^{ème}, au 1/48^{ème} ou au 1/384^{ème}, des individus séropositifs ayant été obtenus dans les 3 lieux de prélèvements) puis le grand dauphin (3 séropositifs sur 3, 2 au 1/12^{ème} et 1 au 1/48^{ème}). Ces deux espèces sont habituées à se rapprocher des côtes, contrairement aux dauphins bleus et blancs, espèces pélagiques. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Cabezón *et al.* (2004) qui avaient obtenus des séroprévalences plus élevées chez les espèces fréquentant les côtes (4 sur 7 grands dauphins et 2 sur 4 dauphins communs) que chez les espèces vivant plus au large (4 sur 36 dauphins bleus et blancs). Ils avaient également retrouvé des anticorps chez le seul marsouin commun analysé dans leur étude. Par ailleurs, seul un phoque gris sur les 9 analysés a présenté un résultat positif. Le nombre de prélèvements est trop faible pour tirer des conclusions de séroprévalence différentes en fonction des espèces, néanmoins il est reconnu que les valeurs de séroprévalence sont en général plus élevées dans les populations de cétacés que chez les pinnipèdes (Miller, 2007).

Les prélèvements d'Océanopolis et d'Oceanic club provenant de divers organes nous ont donné l'occasion de comparer les résultats sérologiques en fonction des organes. Nous disposons de muscles et de cœurs provenant d'Océanopolis. Si l'on se reporte au tableau 12, on remarque que seul un muscle sur les 6 analysés s'est révélé positif en ADHS, tandis que 3 cœurs sur les 7 analysés étaient séropositifs. Nous disposons de cœur et de muscle issus du même dauphin commun, malheureusement le muscle n'a pas permis de récupérer du fluide et nous n'avons pas pu comparer les résultats sérologiques pour ce même animal.

En revanche, plusieurs prélèvements roumains provenaient des mêmes animaux et le tableau 17 résume les valeurs de séroprévalence obtenues *via* les différents organes. Il semble que le poumon permette une meilleure sensibilité que le cœur et le diaphragme ; en effet, pour les individus 7, 10 et 11, il a permis d'obtenir un résultat positif plus élevé que par les autres organes. Ce n'est cependant pas un prélèvement habituellement choisi lors des études sérologiques à partir de fluides, aucune donnée n'est donc disponible pour cet organe.

Si l'on s'intéresse aux titres obtenus, on remarque que les valeurs les plus élevées ($1/96^{\text{ème}}$ et $1/384^{\text{ème}}$) ont été obtenues à partir de prélèvements cardiaques.

Si l'on compare les résultats obtenus chez les chats et les mammifères marins, nous pouvons constater que les valeurs de séropositivité sont, dans certains cas, bien plus élevées chez les chats (jusqu'au $1/3072^{\text{ème}}$). La valeur de séropositivité la plus élevée obtenue *via* les prélèvements de mammifères marins était de $1/384^{\text{ème}}$. Dans les différentes études, les valeurs de séropositivité sont généralement inférieures au $1/100^{\text{ème}}$, mais dans certains cas il est possible d'obtenir des valeurs bien plus élevées. Dans l'étude de Dubey *et al.* (2005), sur les 146 grands dauphins testés et positifs par MAT, la majorité (130 sur 146) présentait des titres faibles (3 positifs au $1/20^{\text{ème}}$, 29 au $1/25^{\text{ème}}$, 19 au $1/40^{\text{ème}}$, 23 au $1/50^{\text{ème}}$, 29 au $1/80^{\text{ème}}$, 27 au $1/100^{\text{ème}}$) mais certains étaient séropositifs à des valeurs beaucoup plus élevées (2 au $1/160^{\text{ème}}$, 3 au $1/200^{\text{ème}}$, 3 au $1/1280^{\text{ème}}$, 1 au $1/1600^{\text{ème}}$, 2 au $1/2560^{\text{ème}}$, 3 au $3200^{\text{ème}}$ et 2 au $1/5120^{\text{ème}}$ ou plus). Par ailleurs, des études ayant analysé par MAT des individus atteints de symptômes cliniques de toxoplasmose (encéphalite) ont obtenu des valeurs de séropositivité très élevées ($1/6400$ par MAT dans le cas d'un dauphin bleu et blanc atteint d'une méningoencéphalite sévère non suppurée (Dubey *et al.*, 2007a)).

La plupart des prélèvements ont également été analysés par biologie moléculaire.

En utilisant la PCR quantitative en temps réel, nous avons obtenu 45 % de résultats positifs parmi les 22 chats analysés. Les résultats sont donnés sous la forme de 2 valeurs de Ct correspondants aux 2 duplicats analysés pour chaque échantillon. Les duplicats permettent de mettre en évidence des erreurs de manipulation et des contaminations croisées. Plus les deux valeurs de Ct sont proches, plus le résultat est fiable.

Pour 6 chats, nous avons obtenu une valeur de 35,00 pour un seul duplicat, tandis que pour un autre, les 2 valeurs de Ct étaient égales à 35,00. Un tel Ct signifie qu'il y a bien présence d'ADN mais en très faible quantité. Dans ce cas, il est tout à fait possible et compréhensible que l'on puisse trouver un Ct à 35,00 pour un échantillon et que, pour son duplicat, on ne détecte rien.

Trois chats ont présenté des valeurs de Ct plus basses que 35,00 (28,66, 30,79 et 33,33 comme moyennes pour les deux valeurs de Ct). Les valeurs de Ct inférieures à 35,00 signifient que de l'ADN en plus grande quantité a été détecté. Plus le Ct est bas, plus la quantité d'ADN présente est élevée. Pour donner un ordre d'idée, les Ct obtenus par le témoin positif (ADN de tachyzoïte de *T. gondii*) dans cette analyse sont sortis à 20,19 et 20,27.

Concernant les mammifères marins, le tableau 22 résume tous les résultats obtenus par PCR quantitative dans cette étude.

Via la PCR, presque un tiers des animaux analysés (12 sur 38 soit 32 %) a présenté un résultat positif. Néanmoins, à l'exception d'un individu dont le Ct moyen était de 31,05, tous les autres échantillons n'ont permis de mettre en évidence qu'une quantité réduite d'ADN (35,00 comme chez les chats). La recherche de *T. gondii* par PCR quantitative n'est pas courante chez les mammifères marins, nous n'avons donc pas de comparaison de valeurs de Ct dans la bibliographie pour les mammifères marins.

Tableau 21. Résultats de la PCR toxoplasmose en fonction des espèces de mammifères marins et pourcentage total dans chaque catégorie

	NEG	POS (-/35,00)	POS (35,00/35,00)	POS < 35,00	Non effectué	Total analysés	Total positifs	Total
Phoques gris	8	1			8	9	1	17
Phoque veau- marin		1				1	1	1
Dauphins communs	9	1	3		1	13	4	14*
Marsouins communs	7	2			2	9	2	11
Grands dauphins		2	1			3	3	3
Dauphins bleus et blancs	2					2	0	2
Cachalot				1		1	1	1
Total	26	7	4	1	11	38	12	49
% par rapport au total analysé	68 %	18 %	11 %	3 %				

* Les deux échantillons provenant du même dauphin commun d'Océanopolis ont été inclus séparément dans l'étude.

Nous pouvons à présent étudier la corrélation des résultats obtenus *via* les deux techniques. Deux techniques de diagnostic ont été utilisées : l'ADHS, également connue sous le nom de MAT et la PCR quantitative en temps réel.

L'ADHS présente plusieurs intérêts : simplicité de réalisation, bonnes sensibilité (82,9 %) et spécificité (90,3 %) décrites chez le porc (Dubey *et al.*, 1995), et possibilité d'être réalisé chez de nombreuses espèces animales. Ce test est largement employé dans des études de dépistage et de prévalence sur de très nombreuses espèces de la faune domestique ou sauvage, dont les mammifères marins. L'emploi de 2-ME (ou de DTT) permet d'accroître la spécificité car il supprime l'activité des IgM responsables d'une agglutination non spécifique. Ce test ne détecte donc que les IgG, c'est pourquoi il peut être à l'origine de résultats faussement négatifs lors des premiers stades d'une infection aiguë (Dubey, 2010).

Dans le cadre de notre étude, nous ne pouvions pas obtenir de sérums (les prises de sang sur cadavres n'étant pas chose facile), nous avons donc travaillé sur des fluides musculaires. Gamble et Patrascu (1996) avaient démontré que l'emploi de fluide musculaire donnait les mêmes résultats que l'utilisation de sérum chez le porc, lors de la recherche de trichinellose par ELISA. Pour la recherche de *Toxoplasma* chez le porc, Gamble, Dubey, et Lambillotte (2005) ont cependant montré que l'utilisation de fluide musculaire était moins sensible que les sérums. Forbes, Parker, et Gajadhar (2012) viennent néanmoins de remettre en question les résultats de l'étude précédente, puisque, en utilisant la MAT à un seuil de positivité de 1/10^{ème}, ils ont obtenu des résultats séropositifs à partir d'échantillons de cœur, de diaphragme et de muscle sternomastoïdien chez les 10 truies de l'étude infectées par *T. gondii*.

Le seuil de positivité habituellement admis est de $1/25^{\text{ème}}$; cette étude nous incite donc à tenir compte des valeurs de positivité inférieures que nous avons obtenues dans notre étude.

La PCR est une technique très sensible (elle permet de détecter l'ADN d'un seul tachyzoïte), spécifique et qui permet d'aboutir rapidement à un diagnostic. Son principal problème est cependant le risque de contaminations croisées. L'avantage de la PCR quantitative en temps réel est de pouvoir quantifier la quantité d'ADN du parasite (Dubey, 2010). Nous avons ciblé l'élément rep529 (élément de 529 pb répété 300 fois dans le génome de *T. gondii*), décrit pour la première fois par Homan *et al.* (2000). Le fait de cibler une séquence répétée permet d'accroître la sensibilité de la technique. Deux séquences répétées sont habituellement utilisées : le gène B1 répété 35 fois et l'élément rep529. Cassaing *et al.* (2006) ont démontré que l'utilisation de l'élément rep529 permet d'accroître considérablement la sensibilité par rapport à l'emploi du gène B1 (10 à 100 fois plus sensible). Ils ont par ailleurs insisté sur l'importance d'effectuer les analyses en duplicat car, en cas de faible quantité d'ADN, il est possible de n'obtenir qu'un seul résultat positif. Ainsi, le fait d'analyser une seule fois les échantillons peut conduire à des résultats faussement négatifs. L'obtention d'un seul résultat positif sur les deux duplicats conduit à considérer l'échantillon comme positif.

Les tableaux 9, 16 et 20 ont mis en évidence 4 cas de figure lors de la mise en parallèle des résultats d'ADHS et de PCR chez les chats et les mammifères marins en France et en Roumanie :

- les 2 résultats sont négatifs : l'échantillon peut être considéré négatif ;
- les 2 résultats sont positifs : l'échantillon peut être considéré positif ;
- résultat positif en ADHS mais négatif en PCR ;
- résultat négatif en ADHS mais positif en PCR.

Un des buts de l'étude chez les chats de l'ENVA était de pouvoir comparer les résultats obtenus *via* les deux méthodes. Ces résultats sont indiqués individuellement dans le tableau 8 et résumés dans le tableau 9.

Parmi les 23 chats, seuls 21 peuvent faire l'objet d'une comparaison entre les deux techniques de diagnostic. 11 échantillons (52 %) sont à l'origine de résultats cohérents entre les deux méthodes : 8 sont négatifs dans les 2 cas et 3 sont positifs par sérologie et biologie moléculaire.

Parmi les résultats positifs, un échantillon a présenté un résultat très positif en sérologie ($1/3072^{\text{ème}}$) et également en PCR (Ct moyen de 28,66). Ce chat était donc très probablement infecté par *T. gondii*. Cet échantillon a été utilisé comme témoin positif pour les analyses sérologiques de mammifères marins par la suite.

Pour l'échantillon positif au $1/24^{\text{ème}}$, la PCR n'a permis de détecter de l'ADN en faible quantité que dans un des duplicats. Au contraire, pour l'échantillon positif au $1/6^{\text{ème}}$, de l'ADN a pu être détecté dans les deux duplicats (Ct moyen de 33,33). Or, dans la littérature, il est classique d'appliquer une valeur seuil de positivité de $1/25^{\text{ème}}$ (Dubey, 1997) et de considérer les échantillons positifs à une dilution inférieure comme négatifs. Nous voyons ici que cet individu qui aurait été considéré comme négatif *via* l'ADHS seule a une grande probabilité d'être infecté par *T. gondii*. Étant donné que nous avons travaillé avec des fluides musculaires, le seuil de positivité aurait peut-être besoin d'être adapté. Forbes *et al.* (2012) ont démontré que les résultats obtenus *via* les sérums et les fluides musculaires sont similaires pour l'ADHS à un seuil de $1/10^{\text{ème}}$. Ce résultat nous suggère de tenir compte de tous nos résultats positifs.



Dix prélèvements ont été à l'origine de résultats discordants entre les deux techniques. Sept individus étaient séronégatifs mais la PCR a détecté de l'ADN. Néanmoins, pour six d'entre eux, les quantités étaient faibles (Ct = 35,00 pour un seul des duplicats) et seul un de ces six échantillons était positif pour les deux duplicats. Dans le dernier échantillon, la PCR a permis de détecter une quantité supérieure d'ADN (Ct moyen de 30,79). Pour ces sept échantillons, la PCR a été plus sensible que l'ADHS et a permis de détecter des quantités d'ADN trop faibles pour initier une réponse immunitaire suffisante chez l'hôte pour être détectée par ADHS.

En outre, comme nous l'avons vu précédemment, l'emploi de 2-ME supprime l'activité des IgM et ne détecte que les IgG, ce qui peut être à l'origine de résultats faussement négatifs lors des premiers stades d'une infection aiguë. Ceci pourrait expliquer certains de ces résultats séronégatifs qui correspondraient à des chats récemment infectés, n'ayant développé jusqu'alors qu'une réponse immunitaire à IgM.

Trois échantillons positifs à l'ADHS n'ont pas été à l'origine d'une réponse positive en PCR, alors que les séropositivités étaient élevées pour deux d'entre eux (1/192^{ème} et 1/3072^{ème}). Ceci peut être expliqué par des inhibiteurs de PCR, et en particulier de la Taq polymérase, présents dans les échantillons et extraits en même temps que l'ADN. Pour être rigoureux, il aurait fallu effectuer à nouveau la PCR avec de la BSA (Bovine Serum Albumin) qui, en général, suffit à contenir ces effets inhibiteurs ou bien utiliser un gène de ménage comme témoin d'amplification (housekeeping gene).

Ces résultats non concordants entre sérologie et biologie moléculaire sont retrouvés dans l'étude de Castillo-Morales *et al.* (2012). Les auteurs ont voulu identifier la prévalence de *T. gondii* chez 220 chats au Mexique, par ELISA et PCR. 75,5 % (166/220) des chats étaient séropositifs par ELISA ciblant les IgM et 91,8 % (202/220) étaient IgG-séropositifs. 79 % (173/220) étaient positifs *via* la PCR. Ces 3 analyses leur ont permis de classer les infections comme aiguës (positif pour la PCR ou pour la PCR et les IgM) ou chroniques. Lors d'infection aiguë, comme nous l'avons déjà vu, les IgG ne sont pas encore apparues et la PCR peut donc détecter précocément l'infection par rapport à une méthode recherchant la présence d'IgG. Dans notre étude, l'ADHS ne détecte pas les IgM, nous nous intéressons donc à la correspondance entre les résultats obtenus pour les deux autres méthodes dans l'étude de Castillo-Morales *et al.* (2012). Dans 2,2 % des cas, les deux résultats étaient négatifs et dans 74,6 % des cas, les deux résultats étaient positifs. Les résultats concordaient donc dans 76,8 % des cas dans cette étude, ce qui est bien plus élevé que les 52 % de notre étude. Dans leur étude, 5,9 % des résultats étaient séronégatifs lors de la recherche des IgG et positifs en PCR (33 % dans notre étude) et 5,5 % des échantillons étaient séropositifs mais négatifs en PCR (14 % dans notre étude).

Cette étude de pré-requis nous a permis de nous rendre compte que l'adéquation des résultats sérologiques et de biologie moléculaire n'est pas toujours bonne chez le chat, cela pourrait donc également être le cas pour les mammifères marins.

Concernant les prélèvements provenant d'Océanopolis, nous avons analysé par PCR uniquement les 4 échantillons séropositifs ainsi que les 12 prélèvements n'ayant pas permis de récupérer du fluide musculaire. Étant donné les résultats obtenus lors de l'étude chez les chats effectuée *a posteriori*, il aurait été intéressant d'analyser également les échantillons séronégatifs afin de confirmer nos résultats ou mettre au contraire en évidence la présence d'ADN en faible quantité, en raison de la plus grande sensibilité de la PCR.

Les quatre échantillons séropositifs se sont révélés négatifs en PCR. L'état des prélèvements, conservés plusieurs années au congélateur, pourrait être à l'origine d'inhibiteurs de PCR comme chez le chat et expliquer ces différences de résultats.

Les prélèvements provenant de La Rochelle et de Constança ont en revanche été majoritairement analysés *via* les deux méthodes. Le tableau 23 présente la mise en parallèle de tous les résultats obtenus par ADHS et PCR.

Tableau 22. Mise en parallèle des résultats globaux d'ADHS et de PCR chez les mammifères marins

	NEG/NEG	NEG en ADHS/POS en PCR	POS en ADHS/NEG en PCR	POS/POS	Pas de corrélation possible	Total analysé 2 fois	Total
Phoques gris			1		16	1	17
Phoque veau-marin					1		1
Dauphins communs	1		6	3	4	10	14*
Marsouins communs	4	1	3	1	2	9	11
Grands dauphins				3		3	3
Dauphins bleus et blancs	1		1			2	2
Cachalot		1				1	1
Total	6	2	11	7	23	26	49
% par rapport au nombre d'individus analysés 2 fois	23 %	8 %	42 %	27 %			

* Les deux échantillons provenant du même dauphin commun d'Océanopolis ont été inclus séparément dans l'étude.

Le tableau 23 permet de mettre en évidence que sept individus ont présenté un résultat positif *via* les deux méthodes, parmi les 26 échantillons ayant pu être analysés deux fois, cela fait donc 27 % de résultats positifs confirmés et 23 % des individus analysés deux fois sont bien confirmés négatifs par les deux analyses.

La deuxième moitié des prélèvements n'a pas donné un résultat cohérent entre les deux méthodes. Deux prélèvements séronégatifs se sont révélés positifs en PCR et inversement pour 11 autres prélèvements. Ces résultats, similaires à ceux obtenus chez les chats, peuvent être expliqués de la même façon.

Si l'on s'intéresse au nombre total d'individus ayant présenté au moins un résultat positif quel qu'il soit (séropositivités à 1/6^{ème} et 1/12^{ème} comprises) *via* l'une ou l'autre méthode, on arrive à un total de 20 individus sur 26 (le dauphin commun ayant deux échantillons n'est compté qu'une seule fois), soit 77 %. Si l'on étend ce calcul à l'ensemble des 48 échantillons inclus dans cette étude, il faut ajouter parmi les résultats positifs deux échantillons de phoques d'Océanopolis positifs en PCR, ce qui fait 22 individus positifs sur 48, soit 46 %.

Cette nette diminution du pourcentage de positivité provient du fait que dans ce deuxième calcul, tous les phoques ont été inclus. Or, si l'on sépare les pinnipèdes et les cétacés de cette étude, on obtient 3 phoques positifs (deux en PCR et un en sérologie) sur 18, soit 17 % des individus analysés et 18 cétacés positifs sur 30, soit 60 %. Ces valeurs sont cohérentes avec celles obtenues dans les différentes études de la littérature présentées précédemment, où nous avons pu constater que les cétacés présentaient de manière générale des résultats positifs plus fréquemment que les pinnipèdes.

Nous pouvons nous intéresser plus spécifiquement aux résultats obtenus pour les différentes espèces de cétacés incluses dans cette étude. L'espèce la plus représentée est le dauphin commun. Neuf dauphins communs sur les 11 analysés en ADHS ont présenté un résultat positif et 4 sur 12 étaient positifs en PCR, les résultats positifs en PCR appartenant à des dauphins séropositifs. En groupant les résultats, on obtient 9 individus positifs sur 13 soit 69 % d'individus positifs dans cette espèce, provenant à la fois de l'Océan Atlantique et de Mer Noire.

Trois grands dauphins ont été inclus dans l'étude. Ces trois individus ont permis d'obtenir des résultats positifs à la fois en sérologie et en PCR. Il s'agit des seuls grands dauphins analysés lors de cette thèse, mais si l'on se réfère à ces 3 individus, l'espèce semble être particulièrement infectée par *T. gondii* car les deux analyses ont permis de mettre le parasite en évidence. Ceci est confirmé par de nombreuses études. En Amérique du Nord particulièrement, les séropositivités dans cette espèce sont très élevées (> 90 %) (Dubey *et al.*, 2003, 2005, 2009; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2012).

Concernant les 2 dauphins bleu et blanc, l'un était séropositif au 1/24^{ème}, mais les 2 se sont révélés négatifs en PCR. Parmi les 11 marsouins communs, 4 ont présenté un résultat séropositif et 2 sur les 9 analysés par PCR étaient positifs. Au total, 5 marsouins sur 11 ont présenté au moins un résultat positif. Nous retrouvons des résultats globaux similaires à ceux de la séroprévalence seule, cohérents avec les conclusions de l'étude de Cabezón *et al.* (2004), selon lesquelles les grands dauphins et dauphins communs sont plus susceptibles d'être infectés car ils se rapprochent plus des côtes.

Un des marsouins était uniquement positif en PCR (-/35,00). Ce dernier cas est intéressant puisqu'il provient d'un marsouin juvénile. Deux hypothèses s'offrent à nous : soit il s'agit d'une contamination transplacentaire, soit la contamination s'est faite récemment, après la naissance. Nous ne connaissons malheureusement pas son âge et ne pouvons donc pas savoir s'il était encore susceptible d'être en possession d'anticorps maternels (présents jusqu'à 2-3 mois). Néanmoins, le fait qu'il soit séronégatif est plus en faveur d'une infection récente, pour laquelle il n'aurait pas encore eu le temps de développer une réponse immunitaire adéquate.

Un seul échantillon de mammifère marin a présenté des valeurs de Ct inférieures à 35,00, mais était séronégatif. Cet échantillon provient du seul cachalot analysé au cours de cette thèse. Il s'agit d'un jeune cachalot femelle échoué le 9 juillet 2012 au Cap-Ferret (33), *a priori* suite à une collision avec un bateau. Le cadavre était en état de décomposition avancée mais des prélèvements avaient néanmoins pu être effectués. Étant donné que la PCR est plus sensible que l'ADHS et permet de détecter la présence d'ADN même chez des individus séronégatifs, nous pouvons conclure que le muscle de ce cachalot contenait de l'ADN de *T. gondii*. L'infection était peut-être récente et n'avait pas encore conduit à l'apparition des IgG, comme dans le cas du morse décrit par Dubey *et al.* (2009), séronégatif, mais positif à la PCR pour son cerveau. À notre connaissance, cette étude est la première à mettre en évidence *T. gondii* chez un cachalot.

Étant donné que nos échantillons provenaient d'animaux échoués, les commémoratifs n'étaient pas toujours très précis. Nous ne savons pas par exemple si certains des animaux analysés présentaient une méningoencéphalite à l'autopsie. Il aurait été intéressant de pouvoir faire un lien entre nos résultats positifs et l'état clinique des animaux, particulièrement pour le cachalot. Celui-ci serait mort suite à une collision avec un navire. Kreuder *et al.* (2003) ont montré que le comportement des loutres de mer est altéré lors d'encéphalite due à *T. gondii* et qu'elles ont plus de risques de succomber à une attaque de requin. Ceci est également mis en évidence par Miller *et al.* (2002b), qui ajoutent par ailleurs que les loutres de mer malades sont également plus susceptibles d'être heurtées par des bateaux. Ce pourrait être une raison expliquant la collision de ce cachalot.

Peu d'études chez les mammifères marins ont analysé les individus à la fois par sérologie et par PCR. Pretti *et al.* (2010) ont recherché la présence de *Toxoplasma gondii* chez 8 grands dauphins et 6 dauphins bleus et blancs échoués sur les côtes de Toscane (Italie) entre 2006 et 2008. Ils ont examiné des échantillons de cerveau, foie et muscle par PCR nichée ciblant le gène B1 et analysé le serum par MAT à un seuil de 1/20^{ème}. L'infection par *T. gondii* a été détectée chez 13 des 14 dauphins (93 %), 10 par PCR, 2 par MAT et 1 par les deux méthodes. Concernant la PCR, les échantillons de cerveau et de foie semblaient plus sensibles pour détection de la présence de *T. gondii* que les muscles. Quatre individus ont pu être analysés à la fois par PCR et MAT. Seul un individu était positif par les deux techniques. Deux individus étaient séropositifs mais négatifs en PCR et inversement pour le dernier individu. Cette étude donne des résultats concordants avec les nôtres puisque l'on voit que les résultats obtenus par les deux méthodes diffèrent.

Simon *et al.* (2011) ont également analysé à la fois par MAT et PCR des phoques issus d'Arctique. 828 phoques ont été analysés en sérologie, 86 se sont révélés séropositifs (seuil de 1/40^{ème}) soit 10,4 % des individus. Les valeurs de séropositivité étaient généralement faibles (du 1/40^{ème} au 1/180^{ème}). La PCR a été réalisée sur 30 individus séropositifs et 119 individus séronégatifs pour évaluer la sensibilité du test (et particulièrement mettre en évidence des faux résultats séronégatifs). L'ADN a été extrait de plusieurs organes (muscle, rein, poumon et foie) pour 5 individus séropositifs et 9 séronégatifs et à partir de muscle uniquement pour les phoques restants grâce au même kit que celui utilisé dans cette thèse (QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN)). La PCR a également ciblé le même gène rep529. Contrairement à notre étude, aucun échantillon ne s'est révélé positif en PCR, ce qui souligne la difficulté de mettre en évidence des kystes tissulaires par PCR.

Le fait d'avoir pu analyser des résultats provenant à la fois de l'Océan Atlantique et de Mer Noire amène à se demander si des différences de prévalence peuvent être mises en évidence. Les tableaux 24 et 25 présentent les résultats d'ADHS et de PCR pour les 2 pays.

Tableau 23. Comparaison des résultats d'ADHS entre France et Roumanie sur les mammifères marins

	Négatifs	Positifs au :					Non effectué	Total analysé	Total
		1/6 ^{ème}	1/12 ^{ème}	1/24 ^{ème}	1/48 ^{ème}	1/384 ^{ème}			
France	14 (56 %*)	1 (4 %)	1 (4 %)	4 (16 %)	4 (16 %)	1 (4 %)	12	25	37
Roumanie	5 (41 %)	–	2 (17 %)	2 (17 %)	3 (25 %)	–	–	12	12

* Tous les pourcentages sont calculés en fonction du nombre d'échantillons analysés et non en fonction du total de prélèvements.

D'après le tableau 24, il semble que le nombre d'individus positifs en ADHS soit plus important en Mer Noire (59 %) que sur la côte Atlantique française (44 %). Si l'on considère un seuil de positivité de $1/24^{\text{ème}}$, 42 % des échantillons roumains sont séropositifs contre 36 % en France.

Tableau 24. Comparaison des résultats de PCR entre France et Roumanie sur les mammifères marins

	NEG	POS (-/35,00)	POS (35,00/35,00)	POS > 35,00	Non effectué	Total analysé	Total
France	20 (77 %*)	3 (11 %)	2 (8 %)	1 (4 %)	11	26	37
Roumanie	6 (50 %)	4 (33 %)	2 (17 %)	–	–	12	12

* Tous les pourcentages sont calculés en fonction du nombre d'échantillons analysés et non en fonction du total de prélèvements.

En utilisant la PCR (tableau 25), on retrouve le même résultat puisque 50 % des prélèvements roumains sont positifs, contre 23 % pour la France. Néanmoins, le seul prélèvement ayant donné un Ct plus bas que 35,00 provient de l'Atlantique.

Ces résultats invitent à rechercher une explication pour ce taux de prévalence plus élevé chez les mammifères marins de Mer Noire. Aucune étude n'a été réalisée jusqu'à présent en Mer Noire pour rechercher la présence de *T. gondii* chez les mammifères marins. Deux hypothèses s'offrent à nous : soit le nombre de chats présents dans les pays bordant la Mer Noire est particulièrement élevé et contribue à une forte contamination environnementale, à l'origine de la contamination des mammifères marins ; soit le fait que la Mer Noire soit une mer « fermée » contribue à un brassage et un renouvellement moins importants des eaux que dans l'Océan Atlantique et les oocystes ont donc plus de chances de rester longtemps dans cette mer. Györke *et al.* (2011) ont montré que 47 % (111 sur 236) des chats de leur étude en Roumanie étaient séropositifs par ELISA et particulièrement ceux ayant accès à l'extérieur. Des études à grande échelle en Mer Noire devraient être envisagées afin d'estimer plus précisément la prévalence du parasite.

L'une des perspectives de cette étude est de génotyper les échantillons positifs en PCR, afin de déterminer si les souches sont du même génotype que la majorité retrouvée en Europe (type II) ou bien proviennent de génotypes atypiques. L'étude de Di Guardo *et al.* (2011) sur les côtes italiennes avait mis en évidence le génotype II ainsi qu'un génotype II atypique. Il aurait également été intéressant de réaliser des bio-essais sur souris ou chat, mais ceci était impossible, étant donné que nos prélèvements nous arrivaient congelés.

Concernant les infections à *Trichinella* spp., aucun échantillon ne s'est révélé positif. Ces résultats étaient envisagés puisqu'aucune infection n'a pour l'heure été démontrée chez les cétacés. Concernant les phoques gris, l'infection à *T. nativa* a été démontrée en Arctique. Les autres espèces n'ont pas pour l'instant été identifiées chez les phoques. Comme *T. nativa* se rencontre surtout aux hautes latitudes, il n'est pas étonnant que nous n'ayons pas mis en évidence le parasite dans le cadre de notre étude. Néanmoins, des flux d'animaux ou des déplacements individuels sur de longues distances pourraient conduire le parasite en Europe.

CONCLUSION

Les mammifères marins sont des sentinelles de premier choix pour l'étude de la contamination de l'environnement marin à partir du milieu terrestre. Ainsi, les protozoaires *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. et, dans une moindre mesure, *Neospora caninum* sont retrouvés fréquemment chez de nombreuses espèces de mammifères marins à travers le monde. Leur mode de contamination pose encore question actuellement, néanmoins le rejet des eaux usées contenant des oocystes ainsi que le lessivage des sols semblent être la source de la contamination marine. Ces oocystes sont ensuite filtrés et concentrés par les invertébrés, dont se nourrissent les mammifères marins. *Toxoplasma gondii* étant agent de zoonose, ces aspects sont d'intérêt pour la santé publique. L'Homme pourrait se contaminer de la même façon que les mammifères marins, après consommation d'invertébrés (huîtres et moules) ou bien suite à l'ingestion de viande de mammifères marins parasités, pratique relativement courante à travers le monde et conduisant à des valeurs élevées de séropositivité chez les Inuits du Nunavik, se nourrissant régulièrement de viande de phoque peu cuite.

Cette pratique de consommation de viande de mammifères marins pose également des questions de santé publique pour l'agent zoonotique *Trichinella nativa*, qui parasite les ours blancs, morses et phoques en zone Arctique, dont se nourrissent les populations humaines. Des épidémies de trichinellose humaine sont ainsi engendrées par la consommation de viande de ces animaux crue ou insuffisamment cuite.

De nombreuses enquêtes de séroprévalence ont été effectuées de par le monde (Amérique du Nord, Japon, Royaume-Uni, Espagne et Italie) et ont révélé la forte prévalence des infections à *T. gondii*, particulièrement chez les loutres de mer de Californie, pour lesquelles les infections sont à l'origine de méningoencéphalites fatales, et chez les grands dauphins aux États-Unis d'Amérique. Le parasite a été identifié chez de nombreuses espèces de cétacés et pinnipèdes et même chez un membre de l'ordre des siréniens (le lamantin des Caraïbes). Le génotypage a mis en évidence l'existence de souches atypiques chez les mammifères marins.

Aucune étude n'avait jusqu'à présent été menée dans les eaux métropolitaines françaises et roumaines. Malgré le faible effectif de mammifères marins analysés au cours de cette thèse, cette étude a mis en évidence la présence du parasite chez les mammifères marins, tant cétacés que pinnipèdes, échoués au cours des dernières années sur la façade Atlantique en France et les côtes de Mer Noire en Roumanie. Ceci est en accord avec les valeurs de séroprévalence déterminées dans les études réalisées dans les pays européens voisins.

Cette étude est également la première à avoir identifié par PCR la présence de *T. gondii* chez un cachalot échoué en Gironde en juillet 2012.

Cette étude mérite d'être poursuivie à plus grande échelle, dans toutes les eaux métropolitaines françaises (Manche et Mer du Nord, Atlantique et Méditerranée), ainsi qu'en Mer Noire, afin de pouvoir analyser un plus grand nombre d'individus par espèce. Par ailleurs, il serait intéressant de pouvoir génotyper les échantillons positifs, afin de mettre en évidence les souches retrouvées en Europe. Enfin, des commémoratifs précis concernant des lésions pouvant être compatibles avec la toxoplasmose devraient, lorsque cela est possible, être récoltés, afin de pouvoir faire un lien entre les individus positifs et d'éventuelles lésions.

Concernant les infections à *Trichinella* spp., l'absence de résultats positifs confirme pour l'instant l'absence d'infections par ces parasites chez les cétacés et chez les phoques en dehors de la zone arctique.

BIBLIOGRAPHIE

LIVRES, SITES INTERNET, RAPPORTS, RÈGLEMENTS, THÈSES :

- AFSSA (2005) Toxoplasmose : État des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. Rapport du groupe de travail "Toxoplasma gondii" de l'AFSSA, 318 p.
- ANSES (2007) *La trichinellose* [en ligne] mise à jour en octobre 2007 [http://www.anses.fr/index.htm], (consulté le 10 Juillet 2012).
- DE BEAULIEU, F., HUSSENOT, E. et RIDOUX, V. (1994) mammifères Marins De Nos Côtes. Le Chasse-Marée/Ar Men, Douarnenez, 136 p.
- BORDE, I. *La PCR*. [en ligne] mise à jour 2006 [http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/PCR/index.htm], (consulté le 16 Juillet 2012).
- BOURDELLE, E. et GRASSE, P.-P. (1984) L'ordre des cétacés. In GRASSE, P.-P. Traité de zoologie, tome XVII, fascicule II, mammifères. Les ordres : Anatomie, Éthologie, Systématique, Masson, Paris, 341- 450
- BUSSIERAS, J. et CHERMETTE, R. (1992) *Parasitologie Vétérinaire, Fascicule II : Protozoologie Vétérinaire*. Polycopié, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Service de parasitologie, 186 p.
- BUSSIERAS, J. et CHERMETTE, R. (1995) *Parasitologie Vétérinaire, Fascicule III : Helminthologie*, 2nd ed. Polycopié, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Service de parasitologie, 299 p.
- DUBEY, J.P. (2010) *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, 2nd ed. CRC Press, New-York, 313 p.
- FONDATION GOOD PLANET *Comprendre l'environnement et ses enjeux, Océans* [en ligne], mise à jour en 2012 [http://www.goodplanet.info/Biodiversite/Oceans/(theme)/1429], (consulté le 20 Mai 2012).
- FRECHKOP, S. (1955) L'ordre des pinnipèdes. In GRASSE, P.-P. Traité de zoologie, tome XVII, fascicule II, mammifères. Les ordres : Anatomie, Éthologie, Systématique, Masson, Paris, 292-340.
- GARLETTI, E. *L'info des Cétacés : Découvrir les Baleines, Dauphins, Cachalots, Orques et Marsouins* [en ligne], mise à jour en 2004 [http://www.cetace.info/], (consulté le 20 Juin 2011).
- INSTITUT DE L'ELEVAGE (2008) *Maladies Des Bovins*, 4^{ème} éd. Editions France Agricole, Paris, 797 p.
- INVS, Institut de Veille sanitaire (2007) *La Toxoplasmose en France chez la femme enceinte en 2003 : Séroprévalence et facteurs associés*, France Repro, Maisons-Alfort, 42 p.
- MACE, M. (2003) *Éléments d'anatomie et de physiologie des cétacés. Adaptation à la vie aquatique*. Toulouse, 71 p.
- MARION, R. et SYLVESTRE, J.-P. (1993) *Guide Des otaries, phoques Et Siréniens*. Delachaux et Niestlé, Lausanne, 159 p.
- MILLER, M.A. (2007) *Tissue Cyst-Forming Coccidia of Marine Mammals* In FOWLER, M.E. ET MILLER, R.E. *Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*, 6th Revised ed. Saunders, Saint Louis (Missouri), 319-340.
- MINISTERE EN CHARGE DE LA SANTE *Trichinellose* [en ligne], mise à jour le 9 février 2009 [http://www.sante.gouv.fr/trichinellose.html], (consulté le 10 Juillet 2012).
- MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE. *Phocoena phocoena, Le Marsouin commun*. [Fiche en ligne] [http://inpn.mnhn.fr/docs/cahab/fiches/1351.pdf], (consulté le 23 juin 2011).
- OCEANOPOLIS. (2006) *Les mammifères marins en Bretagne* [en ligne], créé le 8 février 2006 [http://www.mammiferes-marins-bretagne.fr/], (consulté le 31 Juillet 2011).
- ORTEGA-MORA, L., GOTTSTEIN, B., CONRATHS, F. et al. (2007) *Protozoal Abortion in Farm Ruminants : Guidelines for Diagnosis and Control*, 1st ed. CABI Publishing, Cambridge, 320p.
- PONCELET, E. *Cétacés (baleines, dauphins, marsouins)* [en ligne], mise à jour le 24 avril 1999 [http://www.cetacea.online.fr/index.html], consulté le 20 Juillet 2011.

- REGLEMENT (CE) N° 2075/2005 (5 décembre 2005) fixant les règles spécifiques applicables aux contrôles officiels concernant la présence de *Trichinella* dans les viandes, 23 p.
- RIDGWAY, S.H. et HARRISON, R. (1981) Handbook of Marine Mammals, Volume 2□: Seals, illustrated ed. Academic Press Inc, Londres, 359 p.
- RIDGWAY, S.H. et HARRISON, R. (1994) Handbook of Marine Mammals, Volume 5□: The First Book of Dolphins, illustrated ed. Academic Press Inc, Londres, 416 p.
- ROBINEAU, D. (2004) phoques De France. Faune De France, Paris, 196 p.
- ROBINEAU, D. (2005) cétacés De France. Faune De France, Paris, 646 p.
- SAMUEL, W., PYBUS, M. et KOCAN, A.A. (2001) Parasitic Diseases of Wild Mammals, 2nd Revised ed. Iowa State University Press, Londres, 559 p.
- SARRAZIN, C. (2009) Transmission Verticale de *Neospora* Sp. chez les mammifères□: Quelles conséquences Pour l'élevage canin□? Thèse Méd. Vét., Alfort, 191 p.
- SOCIETY FOR MARINE MAMMALOGY. *Species fact sheets*. [en ligne], créé en 1982, [<http://www.marinemammalscience.org/>], (consulté le 28 Juillet 2012).
- SOURY, G. (1996) Dauphins En Liberté. Nathan, Paris, 288 p.
- THE MARINE MAMMAL CENTER. *Marine Mammal information*□: *classification*. [en ligne], mise à jour en 2012 [<http://www.marinemammalcenter.org/education/marine-mammal-information/classification.html#.UGBxhFE-7ps>], (consulté le 24 Septembre 2012).
- TRYLAND, M., LUNESTAD, B., NESBAKKEN, T., ROBERTSON, L. et SKJERVE, E. (2011) Human Pathogens in Marine Mammal Meat. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, 71 p.
- VAN CANNEYT, O., BOUDAULT, P., DABIN, W., DOREMUS, G. et GONZALEZ, L. (2011) Les Échouages De mammifères Marins Sur Le Littoral Français En 2010. Rapport CRMM pour le Ministère de l'Écologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement, Direction de l'eau et de la biodiversité, Programme Observatoire du Patrimoine Naturel, 48p.
- WATER PLANET USA. *Les dauphins: informations générales*. [en ligne], mise à jour en 2010, [<http://www.waterplanetusa.com/fr/basic.htm>], (consulté le 20 Juillet 2011).

ARTICLES DE PÉRIODIQUES :

- AFONSO, E., THULLIEZ, P. et GILOT-FROMONT, E. (2006) Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). *Int. J. Parasitol.*, **36**(13), 1373–1382.
- AFONSO, E., THULLIEZ, P. et GILOT-FROMONT, E. (2010) Local meteorological conditions, dynamics of seroconversion to *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis catus*) and oocyst burden in a rural environment. *Epidemiol. Infect.*, **138**(8), 1105–1113.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C., SÁNCHEZ-OKRUCKY, R. et DUBEY, J.P. (2012) Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in captive marine mammals in Mexico. *Vet. Parasitol.*, **184**(2-4), 321–324.
- ARKUSH, K.D., MILLER, M.A., LEUTENEGGER, C.M., GARDNER, I.A., PACKHAM, A.E., HECKEROTH, A.R., *et al.* (2003) Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.*, **33**(10), 1087–1097.
- BARR, B.C., CONRAD, P.A., SVERLOW, K.W., TARANTAL, A.F. et HENDRICKX, A.G. (1994) Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Lab. Invest.*, **71**(2), 236–242.
- BOSSART, G.D. (2011) Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health. *Vet. Pathol.*, **48**(3), 676–690.
- BOWIE, W.R., KING, A.S., WERKER, D.H., ISAAC-RENTON, J.L., BELL, A., ENG, S.B., *et al.* (1997) Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet*, **350**(9072), 173–177.
- BRITOV, V. (1962) On the role played by fishes and crustaceans in the transmission of trichinosis to marine mammals. *Zool. Zh.*, **41**, 776–777.

- DE BRUYNE, A., VALLEE, I., T. ANCELLE, I. BROCHERIOU, A. BONAFE, P. BOIREAU, *et al.* (2006) Trichinelloses. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses*, **8-517-A-10**.
- BUERGELT, C.D. et BONDE, R.K. (1983) Toxoplasmic meningoencephalitis in a West Indian manatee. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **183**(11), 1294–1296.
- CABEZÓN, O., RESENDES, A.R., DOMINGO, M., RAGA, J.A., AGUSTÍ, C., ALEGRE, F., *et al.* (2004) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild dolphins from the Spanish Mediterranean coast. *J. Parasitol.*, **90**(3), 643–644.
- CABEZÓN, O., HALL, A.J., VINCENT, C., PABÓN, M., GARCÍA-BOCANEGRA, I., DUBEY, J.P., *et al.* (2011) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in North-eastern Atlantic harbor seal (*Phoca vitulina vitulina*) and grey seal (*Halichoerus grypus*). *Vet. Parasitol.*, **179**(1-3), 253–256.
- CAMPAGNA, S., LEVESQUE, B., ANASSOUR-LAOUAN-SIDI, E., COTE, S., SERHIR, B., WARD, B.J., *et al.* (2011) Seroprevalence of 10 zoonotic infections in 2 Canadian Cree communities. *Diagn. Micro. Infect. Dis.*, **70**(2), 191–199.
- CASSAING, S., BESSIÈRES, M.H., BERRY, A., BERREBI, A., FABRE, R. et MAGNAVAL, J.F. (2006) Comparison between Two Amplification Sets for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*, **44**(3), 720–724.
- CASTILLO-MORALES, V.J., ACOSTA VIANA, K.Y., GUZMÁN-MARÍN, E. del S., JIMÉNEZ-COELLO, M., SEGURA-CORREA, J.C., AGUILAR-CABALLERO, A.J., *et al.* (2012) Prevalence and Risk Factors of *Toxoplasma gondii* Infection in Domestic Cats from the Tropics of Mexico Using Serological and Molecular Tests. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, **2012**.
- COLE, R.A., LINDSAY, D.S., HOWE, D.K., RODERICK, C.L., DUBEY, J.P., THOMAS, N.J., *et al.* (2000) Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *J. Parasitol.*, **86**(3), 526–530.
- CONRAD, P.A., MILLER, M.A., KREUDER, C., JAMES, E.R., MAZET, J., DABRITZ, H., *et al.* (2005) Transmission of *Toxoplasma*: Clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *Int. J. Parasitol.*, **35**(11-12), 1155–1168.
- CRUICKSHANK, J.J., HAINES, D.M., PALMER, N.C. et AUBIN, D.J.S. (1990) Cysts of a *Toxoplasma*-like organism in an Atlantic bottlenose dolphin. *Can. Vet. J.*, **31**(3), 213.
- DESMONTS, G. et REMINGTON, J.S. (1980) Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: Method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.*, **11**(6), 562–568.
- DOMINGO, M., VISA, J., PUMAROLA, M., MARCO, A.J., FERRER, L., RABANAL, R., *et al.* (1992) Pathologic and Immunocytochemical Studies of Morbillivirus Infection in Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Vet Pathol*, **29**(1), 1–10.
- DORNY, P., SPEYBROECK, N., VERSTRAETE, S., BAEKE, M., BECKER, A.D., BERKVEN, D., *et al.* (2002) Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. *Vet. Rec.*, **151**(21), 626–629.
- DUBEY, J.P., CARPENTER, J.L., SPEER, C.A., TOPPER, M.J. et UGGLA, A. (1988) Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **192**(9), 1269–1285.
- DUBEY, J.P., THULLIEZ, P., WEIGEL, R.M., ANDREWS, C.D., LIND, P. et POWELL, E.C. (1995) Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *Am. J. Vet. Res.*, **56**(8), 1030–1036.
- DUBEY, J.P. (1997) Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. *Vet. Parasitol.*, **71**(4), 307–310.
- DUBEY, J.R., ROSYPAL, A.C., ROSENTHAL, B.M., THOMAS, N.J., LINDSAY, D.S., STANEK, J.F., *et al.* (2001) *Sarcocystis neurona* infections in sea otter (*Enhydra lutris*): evidence for natural infections with sarcocysts and transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*). *J. Parasitol.*, **87**(6), 1387–1393.
- DUBEY, J., ZARNKE, R., THOMAS, N., WONG, S., BONN, W.V., BRIGGS, M., *et al.* (2003) *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet. Parasitol.*, **116**(4), 275–296.
- DUBEY, J., FAIR, P., BOSSART, G., HILL, D., FAYER, R., SREEKUMAR, C., *et al.* (2005) A comparison of several serologic tests to detect antibodies to *Toxoplasma gondii* in naturally exposed bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Parasitol.*, **91**(5), 1074–1081.

- DUBEY, J.P., BUXTON, D. et WOUDA, W. (2006) Pathogenesis of bovine neosporosis. *J. Comp. Pathol.*, **134**(4), 267–289.
- DUBEY, J.P., MORALES, J.A., SUNDAR, N., VELMURUGAN, G.V., GONZÁLEZ-BARRIENTOS, C.R., HERNÁNDEZ-MORA, G., *et al.* (2007a) Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from Costa Rica. *J. Parasitol.*, **93**(3), 710–711.
- DUBEY, J.P., SCHARES, G. et ORTEGA-MORA, L.M. (2007b) Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, **20**(2), 323–367.
- DUBEY, J.P., FAIR, P.A., SUNDAR, N., VELMURUGAN, G., KWOK, O.C.H., MCFEE, W.E., *et al.* (2008) Isolation of *Toxoplasma gondii* from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Parasitol.*, **94**(4), 821–823.
- DUBEY, J.P., MERGL, J., GEHRING, E., SUNDAR, N., VELMURUGAN, G.V., KWOK, O.C.H., *et al.* (2009) Toxoplasmosis in captive dolphins (*Tursiops truncatus*) and walrus (*Odobenus rosmarus*). *J. Parasitol.*, **95**(1), 82–85.
- DUBEY, J.P. et THOMAS, N.J. (2011) *Sarcocystis neurona* retinochoroiditis in a sea otter (*Enhydra lutris kenyoni*). *Vet. Parasitol.*, **183**(1-2), 156–159.
- DUPOUY-CAMET, J. (2000) Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Vet. Parasitol.*, **93**(3-4), 191–200.
- EUZEBY, J. (1993) L'infection toxoplasmique du chat □: incidences économiques et sociales. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, **28**, 195–209.
- FORBES, L.B. (2000) The occurrence and ecology of *Trichinella* in marine mammals. *Vet. Parasitol.*, **93**(3-4), 321–334.
- FORBES, L.B., PARKER, S.E. et GAJADHAR, A.A. (2012) Performance of commercial ELISA and agglutination test kits for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in serum and muscle fluid of swine infected with 100, 300, 500 or 1000 oocysts. *Vet. Parasitol.*
- FORMAN, D., WEST, N., FRANCIS, J. et GUY, E. (2009) The sero-prevalence of *Toxoplasma gondii* in British marine mammals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **104**(2), 296–298.
- FRENKEL, J.K., PFEFFERKORN, E.R., SMITH, D.D. et FISHBACK, J.L. (1991) Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. *Am. J. Vet. Res.*, **52**(5), 759–763.
- FUJII, K., KAKUMOTO, C., KOBAYASHI, M., SAITO, S., KARIYA, T., WATANABE, Y., *et al.* (2007) Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in seals around Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **69**(4), 393–398.
- GAJADHAR, A.A., MEASURES, L., FORBES, L.B., KAPEL, C. et DUBEY, J.P. (2004) Experimental *Toxoplasma gondii* infection in grey seals (*Halichoerus grypus*). *J. Parasitol.*, **90**(2), 255–259.
- GAMBLE, H.R. et PATRASCU, I.V. (1996) Whole Blood, Serum, and Tissue Fluids in an Enzyme Immunoassay for Swine Trichinellosis. *J. Food Prot.*, **59**(11), 1213–1217.
- GAMBLE, H.R., DUBEY, J.P. et LAMBILLOTTE, D.N. (2005) Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infection in the domestic pig. *Vet. Parasitol.*, **128**(3-4), 177–181.
- GARNER, H.M., BARR, B.C., PACKHAM, A.E., MARSH, A.E., BUREK HUNTINGTON, K.A., WILSON, R.K., *et al.* (1997) Fatal hepatic sarcocystosis in two polar bears (*Ursus maritimus*). *J. Parasitol.*, **83**(3), 523–526.
- GAUSS, C.B.L., ALMERÍA, S., ORTUÑO, A., GARCIA, F. et DUBEY, J.P. (2003) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Domestic Cats from Barcelona, Spain. *J. Parasitol.*, **89**(5), 1067–1068.
- GIBSON, A.K., RAVERTY, S., LAMBOURN, D.M., HUGGINS, J., MAGARGAL, S.L. et GRIGG, M.E. (2011) Polyparasitism is associated with increased disease severity in *Toxoplasma gondii*-infected marine sentinel species. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **5**(5), e1142.
- GOTTSTEIN, B., POZIO, E. et NÖCKLER, K. (2009) Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clin Microbiol Rev*, **22**(1), 127–145.
- DI GUARDO, G., AGRIMI, U., MORELLI, L., CARDETI, G., TERRACCIANO, G. et KENNEDY, S. (1995) Post mortem investigations on cetaceans found stranded on the coasts of Italy between 1990 and 1993. *Vet. Rec.*, **136**(17), 439–442.

- DI GUARDO, G., PROIETTO, U., DI FRANCESCO, C.E., MARSILIO, F., ZACCARONI, A., SCARAVELLI, D., *et al.* (2009) Cerebral Toxoplasmosis in Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*) Stranded Along the Ligurian Sea Coast of Italy. *Vet. Pathol.*, **47**(2), 245–253.
- DI GUARDO, G., DI CESARE, A., OTRANTO, D., CASALONE, C., IULINI, B., MIGNONE, W., *et al.* (2011) Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates in meningo-encephalitis affected striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Italy. *Vet. Parasitol.*, **183**(1-2), 31–36.
- GYÖRKE, A., OPSTEEGH, M., MIRCEAN, V., IOVU, A. et COZMA, V. (2011) *Toxoplasma gondii* in Romanian household cats: Evaluation of serological tests, epidemiology and risk factors. *Prevent. Vet. Med.*, **102**(4), 321–328.
- HALOS, L., THÉBAULT, A., AUBERT, D., THOMAS, M., PERRET, C., GEERS, R., *et al.* (2010) An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. *Int. J. Parasitol.*, **40**(2), 193–200.
- HOLSHUH, H.J., SHERROD, A.E., TAYLOR, C.R., ANDREWS, B.F. et HOWARD, E.B. (1985) Toxoplasmosis in a feral northern fur seal. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **187**(11), 1229–1230.
- HOMAN, W.L., VERCAMMEN, M., DE BRAEKELEER, J. et VERSCHUEREN, H. (2000) Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.*, **30**(1), 69–75.
- HUET, L. (1882) Note sur des parasites trouvés dans les poumons et dans les muscles de *Otaria californiana*. *CR Seances Mem Soc Biol* 34, 321-322.
- INSKEEP, W., 2nd, GARDINER, C.H., HARRIS, R.K., DUBEY, J.P. et GOLDSTON, R.T. (1990) Toxoplasmosis in Atlantic bottle-nosed dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Wildl. Dis.*, **26**(3), 377–382.
- ISOMURSU, M. et KUNNASRANTA, M. (2011) *Trichinella nativa* in grey seal *Halichoerus grypus*: spill-over from a highly endemic terrestrial ecosystem. *J. Parasitol.*, **97**(4), 735–736.
- JARDINE, J.E. et DUBEY, J.P. (2002) Congenital toxoplasmosis in a Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*). *J. Parasitol.*, **88**(1), 197–199.
- KAPEL, C.M. (2000) Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. *Vet. Parasitol.*, **93**(3-4), 263–278.
- KAPEL, C.M., MEASURES, L., MØLLER, L., FORBES, L. et GAJADHAR, A. (2003) Experimental *Trichinella* infection in seals. *Int. J. Parasitol.*, **33**(13), 1463–1470.
- KREUDER, C., MILLER, M.A., JESSUP, D.A., LOWENSTINE, L.J., HARRIS, M.D., AMES, J.A., *et al.* (2003) Patterns of mortality in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) from 1998-2001. *J. Wildlife Dis.*, **39**(3), 495–509.
- KREUDER, C., MILLER, M.A., LOWENSTINE, L.J., CONRAD, P.A., CARPENTER, T.E., JESSUP, D.A., *et al.* (2005) Evaluation of cardiac lesions and risk factors associated with myocarditis and dilated cardiomyopathy in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Am. J. Vet. Res.*, **66**(2), 289–299.
- KRIVOKAPICH, S.J., POZIO, E., GATTI, G.M., GONZALEZ PROUS, C.L., RIBICICH, M., MARUCCI, G., *et al.* (2012) *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. *Int. J. Parasitol.*, **42**(10), 903–910.
- LAMBOURN, D.M., JEFFRIES, S.J. et DUBEY, J.P. (2001) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in harbor seals (*Phoca vitulina*) in southern Puget Sound, Washington. *J. Parasitol.*, **87**(5), 1196–1197.
- LAPOINTE, J.M., DUIGNAN, P.J., MARSH, A.E., GULLAND, F.M., BARR, B.C., NAYDAN, D.K., *et al.* (1998) Meningoencephalitis due to a *Sarcocystis neurona*-like protozoan in Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*). *J. Parasitol.*, **84**(6), 1184–1189.
- LELU, M., GILOT-FROMONT, E., AUBERT, D., RICHAUME, A., AFONSO, E., DUPUIS, E., *et al.* (2011) Development of a sensitive method for *Toxoplasma gondii* oocyst extraction in soil. *Vet. Parasitol.*, **183**(1-2), 59–67.
- LEVESQUE, B., MESSIER, V., BONNIER-VIGER, Y., COUILLARD, M., COTE, S., WARD, B.J., *et al.* (2007) Seroprevalence of zoonoses in a Cree community (Canada). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **59**(3), 283–286.
- LINDSAY, D.S., THOMAS, N.J. et DUBEY, J.P. (2000) Biological characterisation of *Sarcocystis neurona* isolated from a Southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). *Int. J. Parasitol.*, **30**(5), 617–624.

- LINDSAY, D.S., PHELPS, K.K., SMITH, S.A., FLICK, G., SUMNER, S.S. et DUBEY, J.P. (2001a) Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Eukaryot. Microbiol.*, **Suppl**, 197S–198S.
- LINDSAY, D.S., THOMAS, N.J., ROSYPAL, A.C. et DUBEY, J.P. (2001b) Dual *Sarcocystis neurona* and *Toxoplasma gondii* infection in a Northern sea otter from Washington state, USA. *Veterinary Parasitology*, **97**(4), 319–327.
- LINDSAY, D.S., COLLINS, M.V., MITCHELL, S.M., COLE, R.A., FLICK, G.J., WETCH, C.N., et al. (2003) Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **50**, 687–688.
- LINDSAY, D.S., COLLINS, M.V., MITCHELL, S.M., WETCH, C.N., ROSYPAL, A.C., FLICK, G.J., et al. (2004) Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Parasitol.*, **90**(5), 1054–1057.
- LINDSAY, D.S. et DUBEY, J.P. (2009) Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. *J. Parasitol.*, **95**(4), 1019–1020.
- LOPES, A.P., CARDOSO, L. et RODRIGUES, M. (2008) Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from northeastern Portugal. *Vet. Parasitol.*, **155**(3–4), 184–189.
- MADSEN, H. (1961) The distribution of *Trichinella spiralis* in sledge dogs and wild mammals in Greenland. *Medd. Gronl*, **159**, 1–125.
- MASSIE, G.N., WARE, M.W., VILLEGAS, E.N. et BLACK, M.W. (2010) Uptake and transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by migratory, filter-feeding fish. *Vet. Parasitol.*, **169**(3–4), 296–303.
- MCALLISTER, M.M., DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., JOLLEY, W.R., WILLS, R.A. et MCGUIRE, A.M. (1998) Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, **28**, 1473–1478.
- MCCANN, C.M., VYSE, A.J., SALMON, R.L., THOMAS, D., WILLIAMS, D.J.L., MCGARRY, J.W., et al. (2008) Lack of Serologic Evidence of *Neospora caninum* in Humans, England. *Emerg Infect Dis*, **14**(6), 978–980.
- MEASURES, L.N., DUBEY, J.P., LABELLE, P. et MARTINEAU, D. (2004) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Canadian pinnipeds. *J. Wildl. Dis.*, **40**(2), 294–300.
- MENSE, M.G., DUBEY, J.P. et HOMER, B.L. (1992) Acute hepatic necrosis associated with a *Sarcocystis*-like protozoa in a sea lion (*Zalophus californianus*). *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**(4), 486–490.
- MESSIER, V., LEVESQUE, B., PROULX, J.-F., ROCHETTE, L., LIBMAN, M.D., WARD, B.J., et al. (2009) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Among Nunavik Inuit (Canada). *Zoonoses Public Hlth.*, **56**(4), 188–197.
- MIGAKI, G., ALLEN, J.F. et CASEY, H.W. (1977) Toxoplasmosis in a California sea lion (*Zalophus californianus*). *Am. J. Vet. Res.*, **38**(1), 135–136.
- MIGAKI, G., SAWA, T.R. et DUBEY, J.P. (1990) Fatal Disseminated Toxoplasmosis in a Spinner Dolphin (*Stenella longirostris*). *Vet. Pathol.*, **27**(6), 463–464.
- MIKAELIAN, I., BOISCLAIR, J., DUBEY, J.P., KENNEDY, S. et MARTINEAU, D. (2000) Toxoplasmosis in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence estuary: two case reports and a serological survey. *J. Comp. Pathol.*, **122**(1), 73–76.
- MILLER, M.A., CROSBIE, P.R., SVERLOW, K., HANNI, K., BARR, B.C., KOCK, N., et al. (2001a) Isolation and characterization of *Sarcocystis* from brain tissue of a free-living southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*) with fatal meningoencephalitis. *Parasitol. Res.*, **87**(3), 252–257.
- MILLER, M.A., SVERLOW, K., CROSBIE, P.R., BARR, B.C., LOWENSTINE, L.J., GULLAND, F.M., et al. (2001b) Isolation and characterization of two parasitic protozoa from a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*) with meningoencephalomyelitis. *J. Parasitol.*, **87**(4), 816–822.
- MILLER, M.A., GARDNER, I.A., KREUDER, C., PARADIES, D.M., WORCESTER, K.R., JESSUP, D.A., et al. (2002a) Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Int. J. Parasitol.*, **32**(8), 997–1006.
- MILLER, M.A., GARDNER, I.A., PACKHAM, A., MAZET, J.K., HANNI, K.D., JESSUP, D., et al. (2002b) Evaluation of an indirect fluorescent antibody test (IFAT) for demonstration of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the sea otter (*Enhydra lutris*). *J. Parasitol.*, **88**(3), 594–599.

- MILLER, M., GRIGG, M., KREUDER, C., JAMES, E., MELLI, A., CROSBIE, P., *et al.* (2004) An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *Int. J. Parasitol.*, **34**(3), 275–284.
- MILLER, M., CONRAD, P., JAMES, E.R., PACKHAM, A., TOY-CHOUTKA, S., MURRAY, M.J., *et al.* (2008a) Transplacental toxoplasmosis in a wild southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). *Vet. Parasitol.*, **153**(1-2), 12–18.
- MILLER, M., MILLER, W., CONRAD, P., JAMES, E., MELLI, A., LEUTENEGGER, C., *et al.* (2008b) Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: New linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *Int. J. Parasitol.*, **38**(11), 1319–1328.
- MILLER, M.A., BARR, B.C., NORDHAUSEN, R., JAMES, E.R., MAGARGAL, S.L., MURRAY, M., *et al.* (2009) Ultrastructural and molecular confirmation of the development of *Sarcocystis neurona* tissue cysts in the central nervous system of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *International Journal for Parasitology*, **39**(12), 1363–1372.
- MILLER, M.A., CONRAD, P.A., HARRIS, M., HATFIELD, B., LANGLOIS, G., JESSUP, D.A., *et al.* (2010) A protozoal-associated epizootic impacting marine wildlife: Mass-mortality of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) due to *Sarcocystis neurona* infection. *Vet. Parasitol.*, **172**(3-4), 183–194.
- MØLLER, L.N., PETERSEN, E., KAPEL, C.M.O., MELBYE, M. et KOCH, A. (2005) Outbreak of trichinellosis associated with consumption of game meat in West Greenland. *Vet. Parasitol.*, **132**(1-2), 131–136.
- OKSANEN, A., TRYLAND, M., JOHNSEN, K. et DUBEY, J.P. (1998) Serosurvey of *Toxoplasma gondii* in North Atlantic marine mammals by the use of agglutination test employing whole tachyzoites and dithiothreitol. *Comp. Immun., Microbiol. Infect. Dis.*, **21**(2), 107–114.
- OMATA, Y., HAMMOND, T., ITOH, K. et MURATA, K. (2005a) Antibodies against *Toxoplasma gondii* in the Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*) from the Solomon Islands. *J. Parasitol.*, **91**(4), 965–967.
- OMATA, Y., UMESHITA, Y., MURAO, T., KANO, R., KAMIYA, H., KUDO, A., *et al.* (2005b) *Toxoplasma gondii* does not persist in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Parasitol.*, **91**(6), 1496–1499.
- OMATA, Y., UMESHITA, Y., WATARAI, M., TACHIBANA, M., SASAKI, M., MURATA, K., *et al.* (2006) Investigation for presence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and Brucella-species infection in killer whales (*Orcinus orca*) mass-stranded on the coast of Shiretoko, Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **68**(5), 523–526.
- POITRAS, E. et HOUDE, A. (2002) La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev. Biol. Biotech.*, **2**(2), 2–11.
- POZIO, E. et ZARLENGA, D.S. (2005) Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Int. J. Parasitol.*, **35**(11–12), 1191–1204.
- PRETTI, C., MANCIANTI, F., NARDONI, S., ARITI, G., MONNI, G., DI BELLO, D., *et al.* (2010) Detection of *Toxoplasma gondii* infection in dolphins stranded along the Tuscan coast, Italy. *Revue Méd. Vét.*, **161**(10), 428–431.
- RATCLIFFE, H.L. et WORTH, C.B. (1951) Toxoplasmosis of captive wild birds and mammals. *Am. J. Pathol.*, **27**(4), 655–667.
- RENGIFO-HERRERA, C., ORTEGA-MORA, L.M., ALVAREZ-GARCÍA, G., GÓMEZ-BAUTISTA, M., GARCÍA-PÁRRAGA, D., GARCÍA-PEÑA, F.J., *et al.* (2012) Detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in Antarctic pinnipeds. *Vet. Parasitol.* **190**(1-2), 259–262.
- RESENDES, A.R., ALMERÍA, S., DUBEY, J.P., OBÓN, E., JUAN-SALLÉS, C., DEGOLLADA, E., *et al.* (2002a) Disseminated toxoplasmosis in a Mediterranean pregnant Risso's dolphin (*Grampus griseus*) with transplacental fetal infection. *J. Parasitol.*, **88**(5), 1029–1032.
- RESENDES, A.R., JUAN-SALLÉS, C., ALMERIA, S., MAJÓ, N., DOMINGO, M. et DUBEY, J.P. (2002b) Hepatic sarcocystosis in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from the Spanish Mediterranean coast. *J. Parasitol.*, **88**(1), 206–209.
- ROBARDS, M.D. et REEVES, R.R. (2011) The global extent and character of marine mammal consumption by humans □: 1970–2009. *Biol. Conserv.*, **144**(12), 2770–2786.

- ROBERT-GANGNEUX, F. et KLEIN, F. (2009) Serologic Screening for *Neospora caninum*, France. *Emerg Infect Dis*, **15**(6), 987–988.
- ROMAND, S., THULLIEZ, P. et DUBEY, J.P. (1998) Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol. Res.*, **84**(1), 50–53.
- ROMMEL, M. (1978) Comparative review of the developmental biology of the genera *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Isoospora*, *Cystoisospora*, *Hammondia*, *Toxoplasma* and *Besnoitia*. *Z Parasitenkd*, **57**(3), 269–283.
- ROSONKE, B.J., BROWN, S.R., TORNQUIST, S.J., SNYDER, S.P., GARNER, M.M. et BLYTHE, L.L. (1999) Encephalomyelitis associated with a *Sarcocystis neurona*-like organism in a sea otter. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **215**(12), 1839–1842, 1807.
- ROSS, P.S., DE SWART, R.L., VISSER, I.K., VEDDER, L.J., MURK, W., BOWEN, W.D., et al. (1994) Relative immunocompetence of the newborn harbour seal, *Phoca vitulina*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **42**(3-4), 331–348.
- SHAPIRO, K., MILLER, M. et MAZET, J. (2012) Temporal association between land-based runoff events and California sea otter (*Enhydra lutris nereis*) protozoal mortalities. *J. Wildl. Dis.*, **48**(2), 394–404.
- SIMON, A., CHAMBELLANT, M., WARD, B.J., SIMARD, M., PROULX, J.F., LEVESQUE, B., et al. (2011) Spatio-temporal variations and age effect on *Toxoplasma gondii* seroprevalence in seals from the Canadian Arctic. *Parasitol.*, **138**(11), 1362–1368.
- SPLENDRE A. (1908) Un nuovo parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel., *Rev. Soc. Sci. Sao Paulo.*, **3**, 109–112.
- STEWART, J.R., GAST, R.J., FUJIOKA, R.S., SOLO-GABRIELE, H.M., MESCHKE, J.S., AMARAL-ZETTLER, L.A., et al. (2008) The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. *Environ. Health*, **7** (Suppl 2), S3.
- STRIEPEN, B., JORDAN, C.N., REIFF, S. et VAN DOOREN, G.G. (2007) Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa. *PLoS pathogens*, **3**(6), e78.
- SUNDAR, N., COLE, R.A., THOMAS, N.J., MAJUMDAR, D., DUBEY, J.P. et SU, C. (2008) Genetic diversity among sea otter isolates of *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.*, **151**(2-4), 125–132.
- THOMAS, N.J. et COLE, R.A. (1996) The risk of disease and threats to the wildlife population. *Endangered species Update*, **13**(12), 23–27.
- THOMAS, N.J., DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., COLE, R.A. et METEYER, C.U. (2007) Protozoal Meningoencephalitis in Sea Otters (*Enhydra lutris*): a Histopathological and Immunohistochemical Study of Naturally Occurring Cases. *J. Comp. Pathol.*, **137**(2-3), 102–121.
- VAN BRESSEM, M.-F., RAGA, J.A., DI GUARDO, G., JEPSON, P.D., DUIGNAN, P.J., SIEBERT, U., et al. (2009) Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Dis. Aquat. Org.*, **86**(2), 143–157.
- VAN PELT, R.W. et DIETERICH, R.A. (1973) Staphylococcal infection and toxoplasmosis in a young harbor seal. *J. Wildl. Dis.*, **9**(3), 258–261.
- WENDTE, J.M., MILLER, M.A., NANDRA, A.K., PEAT, S.M., CROSBIE, P.R., CONRAD, P.A., et al. (2010) Limited genetic diversity among *Sarcocystis neurona* strains infecting southern sea otters precludes distinction between marine and terrestrial isolates. *Vet. Parasitol.*, **169**(1-2), 37–44.
- WORK, K. et HUTCHISON, W.M. (1969) A new cystic form of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol Microbiol Scand*, **75**(1), 191–192.
- YANTIS, D., MOELLER, R., BRAUN, R., GARDINER, C.H., AGUIRRE, A. et DUBEY, J.P. (2003) Hepatitis associated with a *Sarcocystis canis*-like protozoan in a Hawaiian monk seal (*Monachus schauinslandi*). *J. Parasitol.*, **89**(6), 1258–1260.
- ZOCEVIC, A., LACOUR, S., GIOVANI, B., MACE, P., VALLEE, I. et BOIREAU, P. (2010) Identification d'antigènes précoces de *Trichinella spiralis* et leur application au développement d'un ELISA pour le diagnostic de la trichinellose chez le porc. *EuroReference*, **4**, 10–12.

Annexe 1. Protocole expérimental de l'ADHS

I) Principe

- ✓ Mise en évidence d'anticorps anti-*Toxoplasma* dans un liquide biologique par une réaction d'agglutination directe de toxoplasmes entiers formolés (antigène figuré).
- ✓ Technique quantitative en microplaques à fond rond ; le titre est déterminé en fonction de la dernière dilution donnant un voile couvrant au moins 50 % de la cupule.

II) Réactifs

- ✓ Antigène toxoplasmique figuré (fourni par le CHU de Reims)
- ✓ 2 mercaptoéthanol (2-ME)
- ✓ Tampon BABS (Bio Mérieux)
- ✓ PBS pH 7,2

III) Méthode

- ✓ Mettre les réactifs à température du laboratoire,
- ✓ Numéroté des plaques de 96 puits pour la dilution primaire et pour les dilutions suivantes,
- ✓ Effectuer la dilution primaire au 1/3 dans du PBS : 25 µL de sérum et 50 µL de PBS,
- ✓ Diluer le 2-ME au 1/50^{ème} dans du PBS,
- ✓ Pour les fluides musculaires, 4 dilutions sont réalisées : du 1/6^{ème} au 1/48^{ème}. Si la dilution au 1/48^{ème} se révèle positive, on effectue 12 nouvelles dilutions à partir de la solution mère, du 1/6^{ème} jusqu'au 1/12 288^{ème},
- ✓ Avec une pipette multicanaux, disposer 25 µL de 2-ME au 1/50^{ème} dans chaque cupule,
- ✓ Faire un témoin positif et un témoin négatif pour chaque manipulation,
- ✓ Distribuer 25 µL de chaque fluide dilué au 1/3 dans la solution mère dans la première cupule,
- ✓ À l'aide d'une pipette multicanaux, effectuer les 4 ou 12 dilutions sériées, de 2 en 2, éliminer les 25 µL restants,
- ✓ Distribuer 25 µL d'antigène dilué au 1/17^{ème} dans du tampon BABS (contient de la sérum albumine) dans chaque puits. Attention : l'antigène correspond à une suspension de parasites formolés donc très denses et sédimentant facilement : penser à bien secouer le tube pour homogénéiser,
- ✓ Agiter 30 s sur vibreur de plaques, puis couvrir d'un film adhésif pour éviter la dessiccation,
- ✓ Mettre à l'abri de toute vibration et effectuer la lecture 15 à 18 h après.

Principe des lectures :

Si le sérum contient des anticorps, les antigènes vont s'agglutiner et former un maillage. On peut donc observer un léger voile au fond de la cupule.

En l'absence d'anticorps, les antigènes vont sédimenter au fond, on observe donc un point blanc net au fond de la cupule.

IV) Résultats

La dernière dilution positive est la dilution pour laquelle on observe encore 50 % d'agglutination de toxoplasmes dans la cupule.

Annexe 2. La digestion trypsique

I) Objectifs

Obtenir des kystes ou des tachyzoïtes vivants en vue de faire un bio-essai ou de la PCR à partir de tissus potentiellement infectés par *Toxoplasma*.

II) Matériel

- ✓ Trypsine SIGMA
- ✓ Serum physiologique à 0,85 % (8.5g de NaCl dans un litre d'eau) stérilisé

III) Méthode

- ✓ Découper le prélèvement en morceaux et le mixer dans une moulinette,
- ✓ Placer le broyat dans un erlenmeyer,
- ✓ Ajouter la préparation de trypsine au broyat (pour 200g d'organe : 30 mL de trypsine + 270 mL d'eau physiologique stérile. Mettre tout en proportion si la masse de l'organe est inférieure à 200g),
- ✓ Mettre en agitation pendant 1h30 à 37°C (étuve agitante),
- ✓ Passer sur 2 épaisseurs de gaze dans un autre flacon,
- ✓ Bien presser la viande au travers de la gaze pour extraire le maximum de digestat,
- ✓ Répartir le filtrat dans un ou des flacons coniques de 50mL (tubes Falcon), rincer l'erien avec du sérum physiologique,
- ✓ Centrifuger 10 min à 3000 rpm à 4°C,
- ✓ Eliminer le surnageant, vortexer afin de bien dissocier le culot,
- ✓ Faire 2 autres lavages en eau physiologique stérile et centrifuger à chaque fois 10 min à 3000 rpm,
- ✓ Récupérer le culot dans un tube conique de 15 mL en rinçant les tubes de 50 mL et centrifuger 10 min à 3000 rpm,
- ✓ Retirer le surnageant et compléter avec de l'eau physiologique à 2 mL si la taille du culot est inférieure,
- ✓ Remettre en suspension en vortexant,
- ✓ Mettre 300 µL dans un tube Eppendorf pour l'extraction d'ADN.

IV) Décontamination

Instruments et verrerie sont décontaminés au RBS.

Annexe 3. Recherche de larves de *Trichinella* par digestion artificielle

RECHERCHE DE LARVES DE TRICHINELLA PAR DIGESTION ARTIFICIELLE

Rédacteur(s) : P.Macé

Approbateur : I.Vallée

1. REFERENCES

- Règlement (CE) n° 2075/2005 de la Commission Européenne du 05 décembre 2005, fixant les règles spécifiques applicables aux contrôles officiels concernant la présence de *Trichinella* dans les viandes. Journal Officiel de l'Union Européenne L 338, p. 60 à 82. Annexe I, Chapitre I.
- Règlement (CE) n°1245/2007 de la commission du 24 octobre 2007 modifiant l'annexe I du règlement (CE) n° 2075/2005 en ce qui concerne l'utilisation de la pepsine liquide pour la détection de *Trichinella* dans les viandes.
- Arrêté ministériel relatif aux dispositions applicables en termes de recherche de larves de trichine et de gestion des cas de trichinellose, version en vigueur à la date de l'analyse

2. APPLICATIONS

- Ce mode opératoire est appliqué pour la recherche de larves de *Trichinella* dans les viandes.

3. PRINCIPE

La recherche des larves de *Trichinella spp* dans les viandes s'effectue par la méthode de détection de référence décrite dans le Règlement 2075/2005 : « Méthode de digestion d'échantillons collectifs utilisant un agitateur magnétique » ; il s'agit d'une technique de digestion artificielle par la pepsine, en milieu acide et à chaud de prélèvements de viande préalablement broyés.

4. REACTIFS

- Pepsine
 - En poudre : 2000 FIP-U/g (activités équivalentes: 1:10 000 NF ou 1:12 500 BP),
 - Ou liquide stabilisée: contenant au moins 660 unités pharmacopée européenne par ml.
- Acide chlorhydrique pour analyses 25%.

5. MATERIEL

- Équipement :
 - Réfrigérateur +5°C (+/- 4°C),
 - Congélateur permettant de maintenir une température inférieure ou égale à -15°C,
 - Pinces, ciseaux, scalpels, plateaux, gants jetables, minuteurs,
 - Balance (précision minimale 0,1 g),
 - Agitateur magnétique chauffant, avec sonde thermique de contrôle,
 - Barreaux aimantés recouverts de téflon (longueur minimale de 5 cm),
 - Supports pour ampoules à décanter, avec anneaux et fixations,
 - Stéréomicroscope (=loupe binoculaire) à éclairage transmis diascopique d'intensité réglable,
 - Poubelles pour déchets biologiques.
 - Bac de décontamination pour la vaisselle (éventuel).
 - Évier (éventuellement muni d'un broyeur.)
- Matériel spécifique « digestion »
 - Mixeur et accessoires : bols, couteaux et couvercles,
 - Bêchers en verre : capacité de 3 L et 2 L,
 - Ampoule à décanter en verre d'une capacité de 2 L minimum, avec robinetterie en téflon et de forme conique,
 - Entonnoir d'un diamètre intérieur minimum de 12 cm (verre, plastique ou métal),
 - Tamis en inox, diamètre extérieur de 11 cm, taille de maille de 180 µm,
 - Éprouvette graduée de 100 ml en verre et des tubes à centrifuger avec bouchons d'une capacité de 50 ml,
 - Pipettes plastique 5, 10 et 25 ml et pipette-boy.

Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort	MO BIPAR 01	Révision	03	1/3
		Date :	01 septembre 2010	

- Boîtes de Pétri en plastique non traitées aux rayons gamma, diamètre 90 mm, dont le fond est divisé en carrés de 10 mm x 10 mm (maximum) à l'aide d'une pointe métallique. La graduation de la boîte peut être inférieure à 1cm : agrandissement plus élevé de l'image lors de l'observation de la boîte.

6. ÉCHANTILLONS

6.1 Masses à analyser

Les masses à analyser sont données dans l'**Annexe 01** du présent mode opératoire.

6.2 Préparation des échantillons

- Préparer des échantillons de viande à partir des prélèvements à analyser, afin d'obtenir au minimum les masses nécessaires pour chaque espèce animale (voir § 6.1). Les masses données s'entendent sans graisse ni fascia.

Fiche P A BIPAR VII.01.02 : Noter les références des prélèvements ainsi que les masses analysées dans le tableau au verso.

- Vérifier que la masse finale obtenue est égale à 100 g (+/- 4 g).
- Cas de pools de moins de 100 g :
 - Si la masse totale des échantillons à analyser est inférieure à 50 g, compléter avec la masse de viande saine nécessaire pour atteindre les 50 g (+/- 2g).
 - Si la masse totale des échantillons à analyser est comprise entre 50 et 100 g, compléter avec la masse de viande saine nécessaire pour atteindre les 100 g (+/- 4g).
 - Cas particulier pour l'espèce porcine : Si la masse totale des échantillons est inférieure à 15 g, ceux-ci peuvent être ajoutés à un pool complet de 100 g. S'il n'y a pas d'autre digestion ce jour-là, compléter jusqu'à 50 g (+/- 2g).

Fiche P A BIPAR VII.01.02 : Noter le n° lot interne de la viande ainsi que la masse pesée dans le tableau au verso.

- Une fois la masse finale obtenue (100 g +/- 4g ou 50 g +/- 2g), pré-découper les échantillons en morceaux d'1 à 2 cm de côté afin de faciliter le broyage ultérieur.

7. DIGESTION ARTIFICIELLE (POOLS DE 100 G) *La technique est schématisée dans l'Annexe 02 de ce MO.*

- Introduire 2 L d'eau chaude du robinet (à 46- 48°C) dans un bécher de 3 L, et introduire un barreau aimanté.
- Poser le bécher sur un agitateur magnétique chauffant et introduire la sonde température dans le liquide. Régler la température consigne pour que le liquide de digestion soit maintenu à une température égale à +45°C (+/-1°C) et la vitesse d'agitation puis vérifier que la température n'est pas supérieure à 48°C (sinon attendre quelques instants que l'eau refroidisse),
- Si nécessaire, prélever environ 50 ml d'eau du bécher et les introduire dans 1 tube de 50 ml. Ce volume servira à rincer le bol du mixer,
- Introduire 16 ml (+/- 0,5 ml) d'acide chlorhydrique 25 % au liquide,
- Ajouter la pepsine : en poudre 10 g (+/- 0,2 g) ou liquide : 30 ml (+/-0,5 ml) dans le bécher (aliquots au réfrigérateur ou pesée le jour même),
- Hacher les échantillons prélevés conformément au point **6**.
- Transférer la viande hachée dans le bécher d'eau chaude contenant déjà l'acide et la pepsine. Prendre soin de transférer toute la viande présente dans le bol. Le cas échéant, rincer le bol avec l'eau éventuellement gardée de côté.
- Déclencher le minuteur pour 30 min minimum de digestion ou noter l'heure de fin de digestion (30 min plus tard) directement sur le bécher.
- L'agitateur magnétique doit être réglé de manière à maintenir une température égale à 45°C (+/- 1°C) pendant toute la réaction de digestion. Durant l'agitation, le liquide doit tourner à une vitesse suffisante pour former un profond tourbillon central sans provoquer d'éclaboussures.

8. DECANTATION

- Prendre une ampoule et vérifier que le robinet en place est bien celui correspondant à l'ampoule (l'orifice de la robinetterie en téflon doit s'aligner correctement avec le robinet en verre de l'ampoule). Placer l'ampoule à décanter sur un statif et vérifier que le robinet de l'ampoule est bien fermé.
- Déposer un entonnoir sur l'ampoule puis prendre un tamis et vérifier visuellement son état : les mailles ne doivent pas être obstruées ou il ne doit pas y avoir de trou dans le tamis (maillage détérioré). Placer le tamis dans l'entonnoir.
- Après 30 min de digestion arrêter l'agitation,

Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort	MO BIPAR 01	Révision	03	2/3
		Date :	01 septembre 2010	

- Filtrer le liquide de digestion sur le tamis, rincer le bécher avec un peu d'eau du robinet et verser au-dessus du tamis.
- Le procédé de digestion des échantillons d'espèce porcine est jugé satisfaisant si un maximum de 5 % de la masse de l'échantillon initial reste sur le tamis. C'est-à-dire que, pour l'espèce porcine, s'il reste des r siduals dans le tamis, ceux-ci sont pesés. Si leur masse est supérieure à 5% de la masse initiale, refaire l'analyse.
- Laisser le liquide décanter dans l'ampoule pendant 30 min.
- Faire couler rapidement 40 ml minimum du liquide de digestion dans l'éprouvette graduée ou le tube à centrifugation. En général ce sont 100 ml qui sont récupérés.
- Laisser reposer l'éluat sur la paillasse pendant 10 min, puis aspirer soigneusement le surnageant de manière à garder 10 ml de sédiment maximum.
- Si le liquide paraît trop trouble pour une lecture (milieu très épais, dense en fibres), un rinçage peut être effectué. Dans ce cas, ajouter 30 ml d'eau du robinet et laisser décanter 10 min. Aspirer ensuite soigneusement environ 30 ml de surnageant de manière à garder 10 ml de sédiment.

9. LECTURE

- Remettre le sédiment en suspension en agitant légèrement l'éprouvette ou le tube à centrifugation et verser le contenu dans une boite de Pétri gravée.
- Rincer l'éprouvette ou le tube à centrifugation avec 10 ml maximum d'eau du robinet, qui sont ajoutés au liquide de digestion contenu dans la boite de Pétri.
- Les liquides de digestion doivent être analysés dès qu'ils sont prêts (dans les 30 min suivantes) ; en aucun cas l'examen ne doit être remis au lendemain.
- Dans le cas où l'examen fait apparaître que le sédiment n'est pas suffisamment clair, verser le liquide de la boite de Pétri dans une éprouvette ou un tube à centrifuger et compléter jusqu'à 40 ml avec de l'eau du robinet. Répéter ensuite les étapes de rinçage décrites dans le dernier point du § 8.
- Placer la boite à lire sur la base du stéréomicroscope ou (loupe binoculaire) et attendre au moins 1 minute avant de lire.
- Lire l'intégralité de la boite de Pétri, à un grossissement compris entre 15x et 20x. Dans le cas où il y aurait des zones suspectes ou des formes semblables à des parasites, utiliser un grossissement plus important, compris entre 60x et 100x.
- Lorsque cette analyse est effectuée dans un cadre réglementaire (diagnostic de première et seconde intention ou de confirmation pour les viandes à consommation humaine) et étant donné l'absence de témoins positifs, deux lectures « en aveugle » doivent être réalisées.
 - Ces lectures indépendantes doivent être effectuées par 2 personnes différentes, sans concertation entre elles avant que la 2 me lecture ne soit terminée et enregistrée.
 - La première lecture est effectuée par l'analyste, et la seconde (et/ou la troisième) par un (ou 2) autre(s) personnel(s) habilité(s).

Fiche P A BIPAR VII.01.03 : Les résultats des lectures individuelles doivent être consignés en aveugle: une fiche par lecteur.

L'annexe 02 de ce mode opérateur schématise la technique de digestion artificielle.

10. POOLS DE MOINS DE 100G

Dans le cas de digestions s'effectuant sur 50 g, seuls les paramètres de l'étape de digestion sont modifiés :

- Le volume du liquide de digestion est ramené à 1 L et c'est un bécher de 2 L qui peut alors être utilisé,
- la masse de pepsine à 5 g (ou 15 ml si pepsine liquide) et le volume d'acide chlorhydrique à 8 ml.
- Les durées de digestion puis de décantation sont inchangées, ainsi que les volumes de liquide de digestion prélevés et analysés après décantation dans l'ampoule puis lors des éventuels rinçages.

11. CAS DE PRELEVEMENTS POSITIFS

- La procédure « P A BIPAR VII.03 » décrit la conduite à tenir lors de résultats non négatifs lors des diagnostics de première et seconde intention.
- La procédure « P A BIPAR VII.02 » décrit la gestion de suspicions de parasitoses animales ayant lieu lors des recherches de trichine par les laboratoires de routine.

Rapport-gratuit.com

Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort	MO BIPAR 01	Révision	03	3/3
		Date :	01 septembre 2010	

Annexe 4. Échouages de Cétacés sur les côtes roumaines (photos personnelles)

A : Grand dauphin femelle juvénile le 6 mai 2012

B : Marsouin femelle le 12 mai 2012

C : Grand dauphin adulte le 27 mai 2012



A



B



C

Annexe 5. Autopsies de Cétacés en Roumanie et de phoque à Océanopolis (photos personnelles)

A : Marsouin commun venant de mettre bas, moins de 12 heures auparavant, le 31 mai 2012

B : Dauphin commun le 28 mai 2012

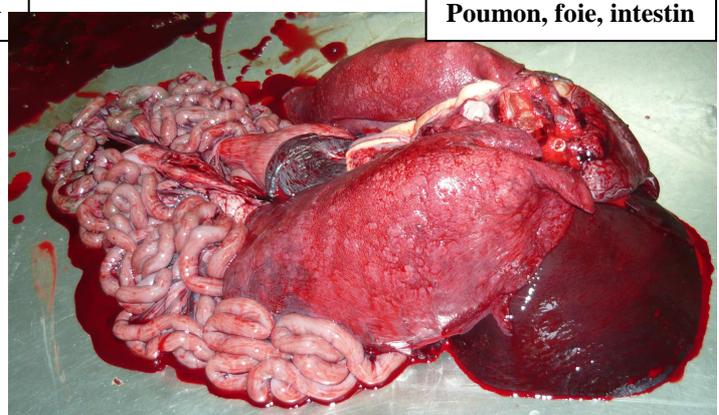
C : phoque gris en janvier 2009



A



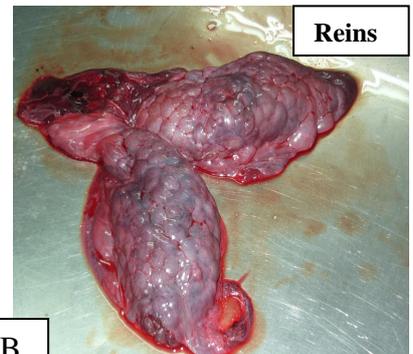
Utérus



Poumon, foie, intestin



B



Reins



C



Récupération des prélèvements

Annexe 6. Techniques de laboratoire : ADHS et digestion trypsique (photos personnelles)

A : ADHS, lecture des résultats

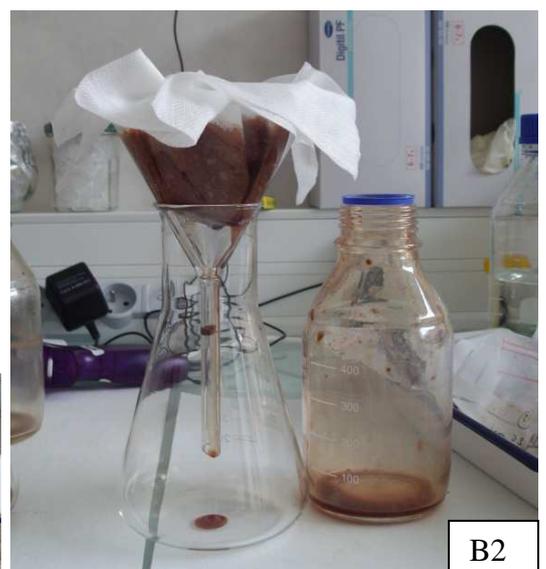
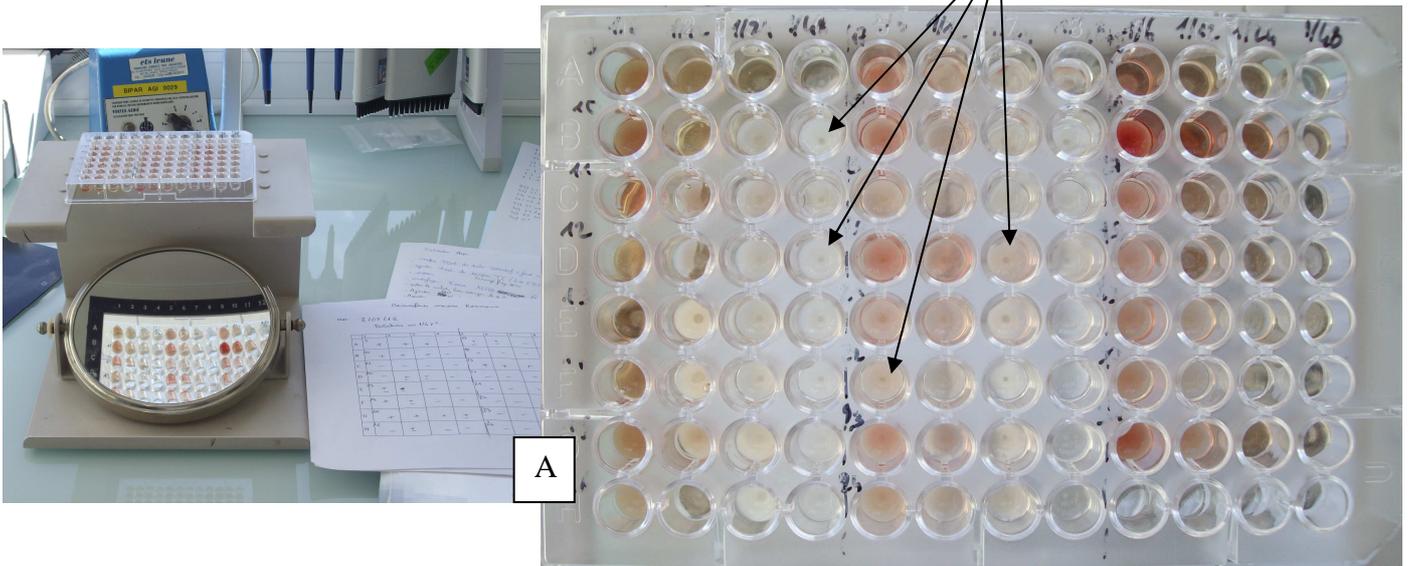
B : Digestion trypsique

B1 : Agitation des broyats musculaires dans la trypsine à l'étude agitante

B2 : Filtration du digestat à travers deux épaisseurs de gaze

B3 : Récupération des digestats après avoir pressé la gaze

Points blancs au fond des cupules : résultats négatifs



ÉTUDE DES INFECTIONS PARASITAIRES À *TOXOPLASMA GONDII*, *NEOSPORA CANINUM*, *SARCOCYSTIS SPP.* ET *TRICHINELLA SPP.* CHEZ LES MAMMIFÈRES MARINS

NOM et Prénom : LE CORRE Anne-Claire

Résumé :

Les mammifères marins sont des agents de premier choix pour l'étude de la contamination du milieu marin à partir des pathogènes terrestres et permettent de tirer la sonnette d'alarme en cas d'apparition ou de recrudescence de maladies infectieuses. Les protozoaires *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. et, dans une moindre mesure, *Neospora caninum*, ainsi que le nématode *Trichinella nativa* sont retrouvés fréquemment chez de nombreuses espèces de mammifères marins à travers le monde. Le parasitisme de ces animaux par des agents zoonotiques (*T. gondii* et *T. nativa*) a un impact en santé publique, puisque la viande de ces mammifères marins est susceptible d'être consommée dans de nombreux pays.

Après une première partie bibliographique sur les connaissances actuelles relatives à la biologie et à l'écologie des mammifères marins et à leurs infections par les parasites *T. gondii*, *N. caninum*, *Sarcocystis* spp. et *Trichinella* spp., ainsi que l'étude des modes de contamination, l'étude expérimentale a consisté à rechercher par sérologie (ADHS) et biologie moléculaire (PCR quantitative en temps réel) les parasites *T. gondii* et *Trichinella* spp. chez les mammifères marins échoués sur les côtes françaises et roumaines. Ce travail a mis en évidence la présence du parasite *T. gondii* chez les cétacés et les pinnipèdes des eaux françaises et roumaines, et mérite d'être poursuivi à grande échelle. C'est la première étude du genre en France et en Roumanie et la première étude à mettre en évidence la présence de *T. gondii* chez un cachalot (*Physeter macrocephalus*).

Mots clés : PARASITE / PROTOZOAIRE / *TOXOPLASMA GONDII* / *NEOSPORA CANINUM* / *SARCOCYSTIS SPP.* / NÉMATODE / *TRICHINELLA SPP.* / ZOONOSE / SÉROLOGIE / BIOLOGIE MOLÉCULAIRE / MAMMIFÈRE MARIN / CÉTACÉ / PINNIPÈDE / PHOQUE / DAUPHIN / MARSOUIN / CACHALOT / LOUTRE DE MER / FRANCE / ROUMANIE.

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. Radu Blaga

Assesseur : Dr. Pascal Arné

STUDY OF *TOXOPLASMA GONDII*, *NEOSPORA CANINUM*, *SARCOCYSTIS* SPP. AND *TRICHINELLA* SPP. INFECTIONS IN MARINE MAMMALS

SURNAME : LE CORRE

Given name : Anne-Claire

Summary :

Marine mammals are major sentinel species for the research concerning contamination of marine environment by terrestrial pathogens and are early warnings for the emergence or resurgence of infectious diseases. Protozoal parasites such as *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp., *Neospora caninum* and the helminth parasites *Trichinella* spp. can infect many species of marine mammals worldwide. *T. gondii* and *Trichinella* spp. zoonotic infections are a matter of concern for human health, because consumption of marine mammal meat is frequent in some regions of the world.

The objective of the first part of this thesis is to develop the main aspects of biology and ecology of marine mammals and their parasitic diseases due to *T. gondii*, *N. caninum*, *Sarcocystis* spp. and *Trichinella* spp. and also to understand how they acquire such infections. Then, our experimental study focused on the seroprevalence of *T. gondii* and *Trichinella* spp. infections in stranded marine mammals of the Atlantic coast of France and the Black Sea coast of Romania, using Modified Agglutination Test (MAT) and to identify *T. gondii* by real time quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR). This study indicates the exposure of cetaceans and pinnipeds from France and Romania to *T. gondii* and should be pursued by large-scale studies. This is the first report on the detection of *T. gondii* antibodies in cetaceans and seals in France and Romania and the first identification of *T. gondii* in a sperm whale (*Physeter macrocephalus*).

Keywords : PARASITE / PROTOZOAN / *TOXOPLASMA GONDII* / *NEOSPORA CANINUM* / *SARCOCYSTIS* SPP. / NEMATODE / *TRICHINELLA* SPP. / ZOONOSIS / SEROLOGY / MOLECULAR BIOLOGY / MARINE MAMMAL / CETACEAN / PINNIPED / SEAL / DOLPHIN / PORPOISE / SPERM WHALE / SEA OTTER / FRANCE / ROMANIA.

Jury :

President : Pr.

Director : Dr. Radu Blaga

Assessor : Dr. Pascal Arné