

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre :05/05/2019

N° de série :01/61/2019



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en Sciences

Option : **Immunologie**

Présentée et soutenue par :

HEMICI Ahmed

Intitulé :

**Purification et caractérisation d'un antigène somatique
et d'une protéase à cystéine excrétée-sécrétée de
Fasciola hepatica à intérêt immunodiagnostic**

Membres du jury :

Présidente : - Mme SATTA Dalila Prof. Université Frères Mentouri Constantine1.
Directrice de thèse : - Mme BENDJEDDOU Dalila Prof. Université 8 Mai 1945 Guelma.
Examineurs : - Mme GRARA Nedjoud Prof. Université 8 Mai 1945 Guelma.
- Mme SOUIKI Lynda Prof. Université 8 Mai 1945 Guelma.
- Mr LALAOUI Korrichi Prof. Université Frères Mentouri Constantine1.

17/01/2019

Année Universitaire 2018-2019

Remerciements

À Madame **Bendjedou Dalila**, Professeur à l'Université 8 mai 1945 Guelma, qui a accepté de diriger cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

À Madame **Satta Dalila**, Professeur à l'Université Frères Mentouri Constantine I, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Hommage respectueux.

À Madame **Souiki Lynda**, Professeur à l'Université 8 mai 1945 Guelma, qui a aimablement accepté d'examiner ce travail et de faire partie de ce jury de thèse. Sincères remerciements.

À Madame **Grara Nedjoud**, Professeur à l'Université 8 mai 1945 Guelma, qui a accepté de juger ce travail et de faire partie de ce jury de thèse. Sincères remerciements.

À Monsieur **Lalaoui Korrichi**, Professeur à l'Université Frères Mentouri Constantine I, qui m'a fait l'honneur d'être parmi ce jury en tant qu'examineur. Sincères remerciements.

Je tiens à remercier vivement Monsieur **Bouzerna Noureddine**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar Annaba et Monsieur **Benakhla Ahmed**, Professeur à l'Université Chadli Bendjedid El-Tarf, qui sont à l'origine de ce thème. Que ce travail soit un témoignage de mon plus profond respect.

J'exprime ma vive reconnaissance à Monsieur **Nasri Moncef**, Professeur à l'Ecole Nationale d'ingénieurs de Sfax, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je le remercie très sincèrement pour son aide, sa compétence et ses précieux conseils. Je remercie également tous les membres de son équipe pour le bon accueil et leur aide.

Je tiens à remercier très particulièrement Madame **Boulard Chantal**, Directrice de recherche à l'INRA de Nouzilly (France), pour son aide gracieusement offerte.

J'adresse mes sincères remerciements aux docteurs vétérinaires chargés de l'inspection au niveau des abattoirs d'Annaba et de Ain el-Assel, ainsi que tout le personnel du laboratoire vétérinaire régional de Ben Mhidi.

Mes plus vifs remerciements vont à tous ceux et celles qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

ABREVIATIONS UTILISEES

- **Aa** : Acide aminé
- **ABTS** : Azino- benzo- thiazoline- sulfonique
- **Ac** : Anticorps
- **AFC** : Adjuvant de Freund complet
- **AFI** : Adjuvant de Freund incomplet
- **Ag** : Antigène
- **AG** : acide gras
- **AMC** : 7-amido-4-méthylcoumarine
- **ATZ-Aa** : Anilino-thiazolinone-Acide aminé
- **BLASTp** : Basic local alignment search tool of proteins
- **BSA** : sérum albumine bovine
- **CD** : Cluster de différenciation
- **CL** : cathepsine lysosomale
- **Con A** : Concanavaline A
- **Da** : Dalton
- **DA** : Dinars Algérien
- **DEAE- cellulose** : diéthylaminoéthyle- cellulose
- **D.O** : densité optique
- **EDTA** : Ethylène-diamine-tétracétique
- **ELISA** : Enzyme-linked immunosorbent assay
- **E.S** : excrété-sécrété
- **E-64** : L-trans-epoxysuccinyl-leucyl-amido (4-guanidino) butane
- **FABP** : Fatty acid binding protein
- **Fh** : *Fasciola hepatica*
- **FhLAP** : *Fasciola hepatica* Leucine Aminopeptidase
- **FITC** : Isothiocyanate de fluorescéine (fluorescein isothiocyanate en anglais)
- **FPLC** : Fast protein liquid chromatography
- **g** : gramme
- **G.R** : globule rouge
- **GST** : Glutathione S-transferase
- **H.A.I** : Hémagglutination indirecte

- **Hb** : Hémoglobine
- **HEPES** : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
- **HPLC** : chromatographie liquide à haute performance
- **IC** : immuncomplexes
- **ID** : Immunodiffusion
- **IEP** : Immunoélectrophorèse
- **Ig** : Immunoglobuline
- **IL** : Interleukine
- **INRA** : Institut Nationale de la Recherche Agronomique (France)
- **JPI** : jour post- infestation
- **K_{cat}** : constante catalytique
- **K_M** : constante de Michaélis
- **LAP** : Leucine Aminopeptidase
- **LC-MS/MS** : Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
- **MALDI-MS-MS** : Matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry
- **MI** : métacercaires irradiées
- **NCBI** : *National Center for Biotechnology Information*
- **ng** : nanogramme
- **NEJ** : newly excysted juvenile
- **PAS** : Periodic acid–Schiff (acide périodique de Schiff)
- **PESF_h**: produits excrétés-sécrétés de *Fasciola hepatica*
- **PESF_g**: produits excrétés-sécrétés de *Fasciola gigantica*
- **PITC** : phényl-iso-thio-cyanate
- **PM** : poids moléculaire
- **PMSF** : Phénylméthylsulphonyl fluoride
- **pNPP** : Para-nitrophénylphosphate
- **PTC** : phénylthiocarbamyl
- **PTH-Aa**: phénylthiohydantoin d'acide aminé
- **PVDF**: polyvinylidène difluoride
- **R.F.C** : Réaction de fixation du complément
- **RPMI** : Roswell Park Memorial Institute medium
- **SA** : sulfate d'ammonium
- **SAI** : semaine après infestation
- **SAP2** : Saposin-like protein 2

- **SDS**: sodium dodecyl sulfate
- **SDS-PAGE** : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
- **Sem** : semaine
- **SI** : système immunitaire
- **SOD** : superoxyde dismutase
- **Sol** : solution
- **SAI** : semaine après infestation
- **SPI** : semaine post- infestation
- **T°** : temperature
- **TCA** : acide trichloroacétique
- **TMB** : 3,3',5,5'-Tetraméthylbenzidine
- **t/min** : tour par minute
- **TNF α** : Tumor Necrosis Factor Alpha (Facteur de nécrose tumorale)
- **TrxR** : Thioredoxin Reductase
- **USCR-sequencer** : séquenceur des Unités de Services Communs pour la Recherche
- **V** : Volt

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

INTRODUCTION	1
---------------------------	---

PREMIER CHAPITRE : ÉTUDE DU PARASITE ET IMPORTANCE DE LA FASCIULOSE À *FASCIOLA HEPATICA*.

1. Étude du parasite	5
1.1. Présentation du parasite	5
1.2. Classification du parasite	5
1.3. Morphologie et anatomie du parasite	5
1.3.1. Morphologie de l'adulte	5
1.3.2. Anatomie de l'adulte	7
1.3.2.1. <i>Le tégument</i>	7
1.3.2.2. <i>L'appareil digestif</i>	8
1.3.2.3. <i>L'appareil reproducteur</i>	8
1.3.2.4. <i>L'appareil excréteur</i>	9
1.3.2.5. <i>Le système nerveux</i>	9
1.4. Biologie	10
1.4.1. Habitat	10
1.4.2. Nutrition	10
1.4.3. Cycle évolutif	10
1.4.3.1. <i>Les hôtes définitifs</i>	10
1.4.3.2. <i>Les hôtes intermédiaires</i>	12
1.4.3.3. <i>La phase exogène du cycle</i>	14
1.4.3.4. <i>La phase endogène du cycle</i>	18
2. Importance de la fasciolose	19
2.1. Importance économique	19
2.1.1. Baisse de la croissance pondérale et du rendement en viande	20
2.1.2. Diminution de la production laitière	20
2.1.3. Effet sur la reproduction	21
2.1.4. Effet sur la production de la laine	22
2.1.5. Saisies des foies	22
2.2. Importance pour la santé humaine	22

**DEUXIÈME CHAPITRE : ÉTUDE DES ANTIGÈNES DE *FASCIOLA HEPATICA*
ET IMMUNITÉ ANTI- FASCIULOSE.**

1. Antigènes de <i>F. hepatica</i>	24
1.1. Classification des antigènes de <i>F. hepatica</i>	24
1.1.1. Les antigènes figurés	24
1.1.2. Les antigènes solubles	24
1.1.2.1. <i>Les antigènes somatiques</i>	24
1.1.2.2. <i>Les antigènes de surface</i>	24
1.1.2.3. <i>Les antigènes d'excrétion-sécrétion</i>	25
1.2. Méthodes d'obtention des antigènes de <i>F. hepatica</i>	26
1.2.1. Les constituants antigéniques	27
1.2.2. Le fractionnement	28
1.2.2.1. L'électrophorèse	28
1.2.2.2. Techniques chromatographiques	29
1.2.2.3. L'immunoélectrophorèse	30
1.2.3. Caractérisation des antigènes	30
1.2.3.1. <i>Caractérisation biochimique</i>	30
1.2.3.2. <i>Caractérisation immunologique</i>	31
1.3. Fractions antigéniques	31
1.3.1. Extraits bruts	31
1.3.1.1. Les broyats	31
1.3.1.2. L'antigène excrété-sécrété	32
1.3.2. L'antigène F2	32
1.4. Communautés antigéniques de <i>F. hepatica</i>	34
1.4.1. Avec d'autres helminthes	34
1.4.2. Avec ses hôtes définitifs	36
2. Immunité anti- <i>F. hepatica</i>	36
2.1. Réponse immunitaire humorale	36
2.2. La réponse immunitaire cellulaire	37
2.3. Mécanismes effecteurs de l'immunité anti- <i>F. hepatica</i>	38
2.3.1. Réactions locales à l'infestation par <i>F. hepatica</i>	38
2.3.2. Mécanismes destructeurs anti- <i>F. hepatica</i>	39
2.3.2.1. <i>Destruction par les macrophages</i>	39

2.3.2.2. Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps.....	40
2.3.3. Mécanismes d'échappement de <i>F. hepatica</i>	40
2.3.3.1. Renouvellement et variation antigénique	41
2.3.3.2. Clivage des immunoglobulines	41
2.3.3.3. Anticorps bloquants	41
2.3.3.4. Activation polyclonale	42
2.3.3.5. Échappement à l'action du complément	42

TROISIÈME CHAPITRE : DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DE LA FASCIULOSE À *FASCIOLA HEPATICA* ET PROPHYLAXIE MÉDICALE.

1. Méthodes de diagnostic immunologique	43
1.1. Détection des anticorps circulants	43
1.1.1. Réaction de fixation du complément	43
1.1.2. Immunofluorescence indirecte	44
1.1.3. Hémagglutination indirecte	47
1.1.4. Méthode immunoenzymatique ELISA.....	49
1.1.5. Western Blot	53
1.2. Détection des antigènes circulants	55
1.2.1. Les antigènes sériques	55
1.2.2. Les copro-antigènes	57
2. Essais de vaccination contre <i>F. hepatica</i>	58
2.1. Métacercaires irradiées	58
2.2. Complexes immuns	59
2.3. Antigènes somatiques	59
2.4. Antigènes excrétés-sécrétés	59
2.5. Hémoglobine de la douve	60
2.6. Glutathione S-transférase	60
2.7. Protéases de type cathepsine L	61
2.8. Protéines de liaison aux acides gras	62
2.9. Leucine Aminopeptidase	63

PARTIE EXPÉRIMENTALE : MISE AU POINT DE MÉTHODES D'ISOLEMENT, DE PURIFICATION ET DE CARACTÉRISATION DES ANTIGÈNES DE *FASCIOLA HEPATICA*.

PREMIÈRE PARTIE : PROTOCOLE DE SÉPARATION ET DE PURIFICATION DES PROTÉINES ANTIGÉNIQUES

1. Matériel et méthodes	65
1.1. Préparation des antigènes totaux	65
1.1.1. Collecte et lavage des parasites	65
1.1.2. Obtention des antigènes excrétés-sécrétés	67
1.1.3. Obtention des antigènes somatiques	70
1.1.4. Obtention des antigènes tégumentaires	70
1.1.5. Concentration par précipitation au sulfate d'ammonium	72
1.2. Quantification des constituants antigéniques.....	72
1.2.1. Dosage des protéines	72
1.2.2. Dosage des carbohydrates	73
1.2.3. Dosage des lipides	74
2. Fractionnement et purification des protéines antigéniques	75
2.1. Fractionnement par chromatographie d'exclusion moléculaire	75
2.1.1. Principe général	75
2.1.2. Méthodologie	75
2.1.2.1. <i>Mise au point préalable</i>	75
2.1.2.2. <i>Préparation du gel</i>	76
2.1.2.3. <i>Préparation de la colonne</i>	77
2.1.3. Technique retenue	77
2.2. Purification sur colonne d'affinité	78
2.2.1. Principe	78
2.2.2. Technique	78
2.3. Electrophorèse SDS-PAGE des protéines antigéniques	79
2.3.1. Principe	79
2.3.2. Méthodes	79
2.3.2.1. <i>Préparation des solutions et des gels d'électrophorèse</i>	79
2.3.2.2. <i>Préparation des échantillons</i>	80

2.3.2.3. <i>Migration électrophorétique</i>	81
2.3.2.4. <i>Traitement du gel</i>	81
3. Tests d'immunoréactivité des fractions antigéniques	82
3.1. Immunodiffusion d'Ouchterlony.....	82
3.1.1. Obtention des sérums de lapins.....	82
3.1.2. Principe du test	82
3.1.3. Technique	83
3.2. Elisa indirect	83
3.2.1. Réactifs	83
3.2.1.1. <i>Tampons</i>	83
3.2.1.2. <i>Antigènes</i>	83
3.2.1.3. <i>Sérums</i>	84
3.2.2. Principe	84
3.2.2.1. <i>Mise au point du test</i>	84
3.2.2.2. <i>Technique Retenue</i>	84
3.2.3. Étude statistique	85
4. Résultats et discussion	86
4.1. Préparation, dosage et concentration des extraits bruts de <i>F. hepatica</i>	86
4.1.1. Obtention d'antigènes stables.....	86
4.1.2. Obtention de produits antigéniques concentrés.....	87
4.1.3. Dosage des produits antigéniques.....	89
4.2. Fractionnement, purification et analyses électrophorétiques des échantillons	90
4.2.1. Obtention des fractions enrichies d'antigènes.....	90
4.2.2. Obtention de la fraction purifiée 40 KDa.....	95
4.2.3. Électrophorèse SDS-PAGE et estimation des masses moléculaires.....	97
4.3. Étude sérologique de l'activité immunologique des fractions isolées.....	101
4.3.1. Détection de l'immuno-réactivité par immunodiffusion.....	101
4.3.2. Étude immunodiagnostic par le test ELISA.....	103
4.3.2.1. <i>Objectif de l'enquête sérologique</i>	103
4.3.2.2. <i>Expression des résultats et détermination du seuil de positivité</i>	103
4.3.2.3. <i>Validation du test ELISA</i>	104
4.3.2.4. <i>Évaluation du pouvoir diagnostic de l'antigène purifié</i>	106
4.3.2.5. <i>Correspondance des résultats de diagnostic</i>	109

**DEUXIÈME PARTIE : PROTOCOLE DE PURIFICATION ET DE CARACTÉRISATION
D'UNE PROTÉASE DE TYPE CYSTÉINE ("CYSTEINE- LIKE")**

1. Matériel et méthodes	113
1.1. Source de l'enzyme.....	113
1.2. Sérums d'animaux infestés.....	113
2. Étape de purification de l'enzyme.	114
2.1. Précipitation fractionnée à l'acétone.....	114
2.2. Chromatographie de gel filtration.....	114
2.3. Chromatographie d'échange ionique.....	114
2.4. Electrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes.....	115
2.5. Electrophorèse SDS-PAGE en conditions non dénaturantes (zymographie).....	115
3. Mise en évidence de l'activité protéolytique de l'enzyme purifiée.	115
3.1. Effet caséinolytique.....	115
3.1.1. Réactifs utilisés	115
3.1.2. Méthode	115
3.2. Dosage de l'activité protéolytique	116
3.2.1. Dosage de l'activité caséinolytique	116
3.2.2. Dosage au substrat fluorogénique	116
4. Caractérisation de l'enzyme purifiée	117
4.1. Effet de la T° sur l'activité et la stabilité enzymatique	117
4.2. Effet du pH sur l'activité et la stabilité enzymatique	117
4.3. Effet des inhibiteurs	117
4.4. Spécificité du substrat	117
4.5. Détermination de la séquence N-terminal	118
4.6. Détermination des paramètres cinétiques	119
4.7. Analyse par Western blot.....	119
5. Résultats et discussion	120
5.1. Purification de l'activité enzymatique	120
5.2. Caractérisation de l'activité enzymatique	125
5.2.1. Effet de la T° et du pH sur l'activité et la stabilité enzymatique	125

5.2.2. Effet des inhibiteurs	128
5.2.3. Effet de la spécificité du substrat	129
5.2.4. Séquençage des acides aminés N- terminaux	131
5.2.5. Étude cinétique	132
5.3. Étude de l'immuno-réactivité par Western blot	134
Conclusions et perspectives	136
Résumé	140
Summary	141
ملخص	142
Références bibliographiques.....	143
Liste des tableaux.....	175
Liste des figures et des photos	178
Annexe I.....	182
Annexe II.	194
Annexe III	198

INTRODUCTION

Le parasitisme est une association hétérosécifique obligatoire, temporaire ou permanente, dans laquelle le parasite survit au détriment de l'hôte qui subit des dommages, pouvant le conduire à la mort à plus ou moins long terme.

La fasciolose ou distomatose hépatique est une maladie parasitaire majeure des animaux domestiques causée par des trématodes hématophages du genre *Fasciola*, parmi lesquelles deux espèces plus courantes : *Fasciola hepatica* qui prédomine dans les zones tempérées et *Fasciola gigantica* qui se rencontre principalement dans les régions tropicales (Mas-Coma, 2005).

Fasciola hepatica affecte à l'état adulte les voies biliaires d'un grand nombre de mammifères herbivores ou omnivores, domestiques ou sauvages (Euzéby, 1971; Soulsby, 1982; Carnevale *et al.*, 2001a; Ayaz *et al.*, 2014), chez lesquels la maladie provoque des lésions du parenchyme hépatique et la paroi des canaux qui s'épaississent et se sclérosent, donnant lieu à une cholangite chronique puis une cirrhose très sévère (Gajewska *et al.*, 2005).

Cette parasitose est actuellement responsable de pertes économiques importantes, affectant les élevages de tous les pays. Elle atteint plus fréquemment les ruminants, et se traduit par une mortalité occasionnelle chez les ovins et plus généralement une baisse des performances zootechniques chez les bovins (Baeza, 1992). Divers hôtes sauvages naturels, constituant souvent un réservoir non contrôlable de cette parasitose, ont une grande importance épidémiologique dans le maintien de l'enzootie (Euzéby, 1971). La fasciolose est également une zoonose, d'origine alimentaire, grave et de traitement difficile, affectant accidentellement 2,4 millions de personnes dans le monde entier et impose un énorme fardeau économique à l'agriculture mondiale, estimé à plus de 2 milliards de dollars US par an (Spithill *et al.*, 1999; Keiser et Utzinger, 2005; Mc Manus et Dalton, 2006).

F. hepatica est un parasite à large distribution géographique, rencontré dans tous les pays où le climat permet le développement exogène du parasite et de l'hôte intermédiaire, un mollusque d'eau douce (Euzéby, 1971). Au Pérou, la fasciolose provoque une morbidité et une mortalité significatives chez les bovins laitiers dans la région andine de Cajamarca où une prévalence d'infection pouvant atteindre 78% a été rapportée (Ortiz *et al.*, 2000). C'est aussi une pathologie émergente de l'homme, en particulier dans les pays andins d'Amérique du sud, en Egypte et en Iran (O'Neill *et al.*, 1998; Mas-Coma *et al.*, 2005). En Algérie, la maladie sévit au nord du pays, notamment dans les régions du littoral où les conditions climatiques sont favorables au développement du cycle parasitaire. Elle est très fréquente chez

les ruminants (ovins et bovins) avec des taux d'infestation qui varient d'une région à une autre : dans la région de Jijel (climat humide), la prévalence enregistrée est de 27,3% chez les bovins et de 23,5% chez les ovins. Par contre, elle est respectivement, chez les mêmes espèces, de 6,8% et 6,3% dans la région de Constantine (climat semi-aride) (**Mekroud, 2004; Sedraoui et al., 2006**).

Le parasite *F. hepatica* est doté d'une structure moléculaire très complexe, comportant de nombreuses substances antigéniques. Les antigènes à l'origine de la réaction immunitaire de l'animal hôte sont soit des antigènes métaboliques, soit des antigènes somatiques. Les premiers sont libérés en grande quantité au moment de la migration des formes larvaires (les adoloscaria), dont le pouvoir immunogène est excellent. Les antigènes somatiques sont liés aux tissus du parasite. Ils ne sont libérés massivement que lors de la désintégration du parasite.

Cette diversité antigénique a fait de *F. hepatica* l'objet de plusieurs investigations analytiques d'ordre biochimique et immunologique. Les antigènes bruts métaboliques ou excrétés-sécrétés sont largement employés dans le dépistage sérologique de la fasciolose chez l'Homme (**O'Neill et al., 1998; Carnevale et al., 2001a; Morales et Espino, 2012**) et chez l'animal (**Pourquier et al., 1995; Arias et al., 2006; Charlier et al., 2008; Kuerpick et al., 2013**) car ils sont responsables de la révélation précoce des anticorps spécifiques et de la stimulation d'une immunité protectrice chez l'hôte. Cependant ces antigènes sont d'obtention difficile et présentent des fractions non spécifiques. Par ailleurs, les antigènes somatiques bien qu'ils soient rarement utilisés comme réactifs antigéniques dans les tests sérologiques, ils sont d'obtention facile, en quantité satisfaisante et possèdent plusieurs fractions antigéniques dont la spécificité et plus ou moins importante (**Lehner et Sewell, 1980**).

Le diagnostic de la fasciolose est réalisé à partir des renseignements épidémiologiques, des signes cliniques, des tests d'exploration fonctionnelle du foie et des résultats biologiques : recherche des oeufs dans les selles, recherche de copro-antigènes et sérologies. Les deux premiers tests manquent de sensibilité, et ne peuvent être pratiqués qu'au cours du 3^{ème} mois d'infestation. Les tests sérologiques sont par contre plus spécifiques et plus sensibles, faisant appel à des antigènes bruts d'origine somatique ou métabolique issus de différents stades évolutifs et plus ou moins purifiés, ou encore des antigènes recombinants (**Boulard et Regnault, 1989; Mezo et al., 2003; Cában-Hernández et al., 2014**).

Parmi les tests sérologiques, l'ELISA qui est devenu depuis plusieurs années une excellente alternative à l'examen coprologique. Il s'agit d'un test de diagnostic immunologique précoce et fiable qui permet, tant chez l'Homme que chez l'animal, l'instauration d'un traitement antiparasitaire qui agit sur les douves immatures avant qu'elles exercent leur pouvoir pathogène ayant pour conséquence la diminution des performances zootechniques chez les animaux de rente et l'appréciation de l'impact des mesures prophylactiques (**Fairweather, 2011; Robinson et al., 2013**). Cependant, l'évaluation des différentes préparations antigéniques utilisées dans le diagnostic de la fasciolose par ce test, montre des réactions croisées indiquant l'absence de spécificité immunologique entre les immunsérums et les extraits bruts de *F. hepatica*, justifiant l'emploi de méthodes fiables pour l'isolement et la purification des antigènes parasitaires purs, bien définis et hautement spécifiques (**Pourquier et al., 1995; Romasanta et al., 2003**).

D'autre part, les stades juvénile immature et adulte de *F. hepatica* expriment un nombre considérable d'enzymes protéolytiques, principalement des cathepsines L (**Trap et Boireau, 2000; Kuk et al., 2005**) identifiées comme étant des cystéines protéases de type papaïne (**Irving et al., 2003; Zawistowska-Deniziak et al., 2013**). Les fonctions de ces enzymes diffèrent selon le stade parasitaire. Ainsi, les cathepsines sont douées d'une activité protéolytique qui facilite la migration des formes juvéniles et immatures à travers les tissus de l'hôte et permet leur digestion (**Dalton et al., 2003; Beckham et al., 2009**). Elles sont capables de cliver les immunoglobulines de l'hôte d'une manière semblable à la papaïne permettant au parasite d'échapper au système immunitaire de l'hôte (**Smith et al., 1993; Robinson et al., 2008a**).

Deux activités protéasiques dominantes de type cathepsine L (*FhCL1* et *FhCL2*) mises en évidence dans les produits excrétés-sécrétés de *F. hepatica* à tous les stades de leur développement chez l'hôte, jouent un rôle important dans la dégradation tissulaire en lysant les collagènes de type I, III et IV, la fibronectine et la laminine (**Berasain et al., 1997; Mulcahy et Dalton, 2001**). Ces protéases participent également à l'acquisition des nutriments en catabolisant activement les protéines hôtes extracellulaires, notamment l'hémoglobine, en peptides absorbables pour subvenir aux besoins alimentaires des parasites (**Trap et Boireau, 2000; Lowther et al., 2009**). En outre, elles sont considérées comme des antigènes immunodominants, utiles pour le diagnostic sérologique de routine de la fasciolose chez des populations humaines et animales (**Cordova et al., 1997; Varghese et al., 2012; Gottstein et al., 2014**), et sont dotées d'un bon potentiel vaccinal permettant un taux de protection

significatif contre l'infestation expérimentale des animaux avec des métacercaires de *F. hepatica*, qui se traduit par une réduction importante des effets de l'embryonation/taux d'éclosion, des lésions hépatiques, de la charge parasitaire et de la production d'oeufs viables (Mulcahy et Dalton, 2001; Dalton *et al.*, 2003; Golden *et al.*, 2010).

Jusqu'à présent, cette parasitose demeure un problème majeur pour l'élevage des ruminants et elle n'est plus compatible avec les exigences économiques actuelles des éleveurs, ni avec la recherche du maximum de performance zootechnique autorisé par un potentiel génétique sans cesse amélioré et ce, malgré la chimiothérapie. En raison des problèmes de résidus médicamenteux dans les aliments de l'Homme ou dans l'environnement, et du coût des douvicides, il apparaît nécessaire d'optimiser leur emploi par l'amélioration des moyens de diagnostic immunologique, notamment par l'emploi d'un ou plusieurs antigènes purifiés, produits de préférence par génie génétique, ce qui permettra d'améliorer les conditions d'emploi des tests sérologiques, en particulier l'ELISA, et lutter contre les effets de la fasciolose sur la santé humaine et animale.

Après une revue bibliographique présentée en premier chapitre concernant *F. hepatica* et son cycle biologique complexe, nous aborderons en deuxième chapitre les antigènes de ce parasite, les manifestations de l'immunité anti-fasciola et les modes d'échappement du parasite au système de défense de son hôte. L'étude des antigènes de *F. hepatica* permettra, en troisième chapitre, de justifier la description détaillée des méthodes utilisées dans l'immunodiagnostic sérologique de cette parasitose ainsi que les essais de prophylaxie.

Enfin, notre dernière partie sera consacrée à l'étude expérimentale, qui consistera en deux protocoles traitant chacun un aspect pratique différent :

- Le premier a pour objectif la mise au point d'une technique de séparation des constituants antigéniques de l'homogénat total de *F. hepatica* en vue de l'obtention d'un antigène somatique purifié qui sera caractérisé afin d'être appliqué comme réactif antigénique par le test ELISA pour le diagnostic immunologique de la fasciolose à *F. hepatica*.

- Le second vise la purification et la caractérisation d'une activité protéolytique de type cystéine "cysteine-like protease" à partir des produits excrétés-sécrétés des douves adultes de *F. hepatica*, et l'évaluation de son pouvoir immunogène dans le but d'optimiser le diagnostic immunologique précoce de la fasciolose animale.

PREMIER CHAPITRE : ÉTUDE DU PARASITE ET IMPORTANCE DE LA FASCIULOSE À *FASCIOLA HEPATICA*.

1. Étude du parasite

1.1. Présentation du parasite

Fasciola hepatica ou grande douve du foie est un ver plat, foliacé, hématophage, hermaphrodite, vivant principalement dans les canaux biliaires. Ce mésoparasite détermine la distomatose hépatobiliaire commune à l'Homme et aux animaux, en particulier les ruminants (Euzéby, 1971).

1.2. Classification

Ce parasite est classé, selon la nomenclature internationale, dans les taxons suivants :

- **Embranchement** : Plathelminthes
- **Classe** : Trématoda
- **Sous-classe** : Digenea
- **Ordre** : Echinostomida
- **Famille** : Fasciolidae
- **Genre** : Fasciola
- **Espèce** : *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758.

1.3. Morphologie et anatomie du parasite

1.3.1. Morphologie de l'adulte

F. hepatica adulte (**Fig. 1**) possède un corps aplati, non segmenté et à symétrie bilatérale, mesurant de 2 à 3 cm de longueur sur 8 à 12 mm de largeur maximale et environ 1mm d'épaisseur, à bords plus ou moins convexes et de couleur brun rougeâtre (clair au centre et plus foncé en périphérie) (Euzéby, 1971; Beaumont et Cassier, 2004). Plus large en avant qu'en arrière, le corps rétréci à son extrémité antérieure formant le cône céphalique long de 3 à 4 mm (**Fig. 2**) (Euzéby, 1971). Il est pourvu de deux ventouses musculieuses circulaires (**Fig. 3**) :

- La ventouse buccale ou ventouse antérieure au sommet du cône céphalique entourant la bouche ;
- La ventouse ventrale ou ventouse postérieure ou acétabulum sur la face ventrale au niveau de l'élargissement scapulaire (Euzéby, 1971; Bussiéras et Chermette, 1995).

Le corps est recouvert de volumineuses épines qui abondent à la face ventrale (**Euzéby, 1971**). Dirigées caudalement, ces épines permettent à la douve avec les ventouses de se maintenir dans les canaux biliaires (**Bourdoiseau, 1997**).

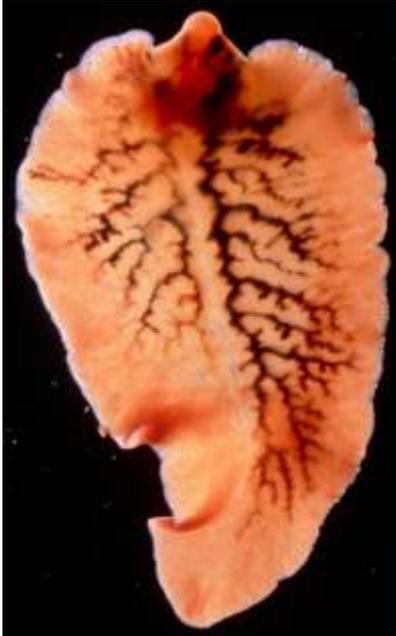


Figure 1 : *Fasciola hepatica* adulte [1].



Figure 2 : *Fasciola hepatica* adulte (moitié antérieure), d'après Josens *et al.* (1990).

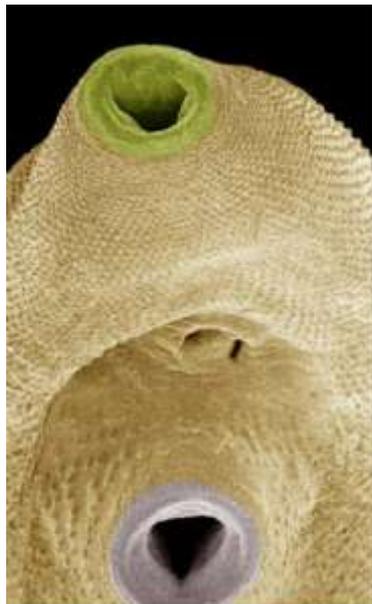


Figure 3 : Ventouse buccale et ventouse ventrale de *Fasciola hepatica* (d'après Mehlhorn, 2008).

1.3.2. Anatomie de l'adulte

Dépourvu de cavité générale, le corps de la grande douve est constitué d'un tégument et d'un parenchyme qui renferme les divers organes (**Bussiéras et Chermette, 1995**).

1.3.2.1. Le tégument

Il possède de nombreuses écailles minuscules (**Josens et al., 1990**). Les deux couches de glycoprotéines (glycocalyx) qui le recouvrent, projettent des chaînes d'oligosaccharides renfermant des radicaux d'acide sialique (**Fig. 4**) (**Threagold, 1976**).

La cuticule est organisée en deux couches :

- **La couche externe** : de structure syncytiale, elle mesure 25 nm d'épaisseur (**Threagold, 1976**). Elle comporte des microvillosités, des cryptes, des épines pointues à base plate, et un cytoplasme dans lequel baignent des mitochondries, des vacuoles, un réticulum endoplasmique, des grains de glycogène.

- **La couche interne** : mesurant 20 nm d'épaisseur, elle est constituée de cytons (cellules nucléées) reliés au syncytium par des prolongements cytoplasmiques.

Les deux couches sont séparées par une membrane basale, des muscles circulaires et des muscles longitudinaux (**Threagold, 1963; Bussiéras et Chermette, 1995**).

De par sa structure, le tégument assure plusieurs fonctions :

- L'excrétion, la synthèse et la sécrétion de nombreuses substances ;
- L'absorption des nutriments, et l'osmo-régulation ;
- La protection (**Threagold, 1976**).

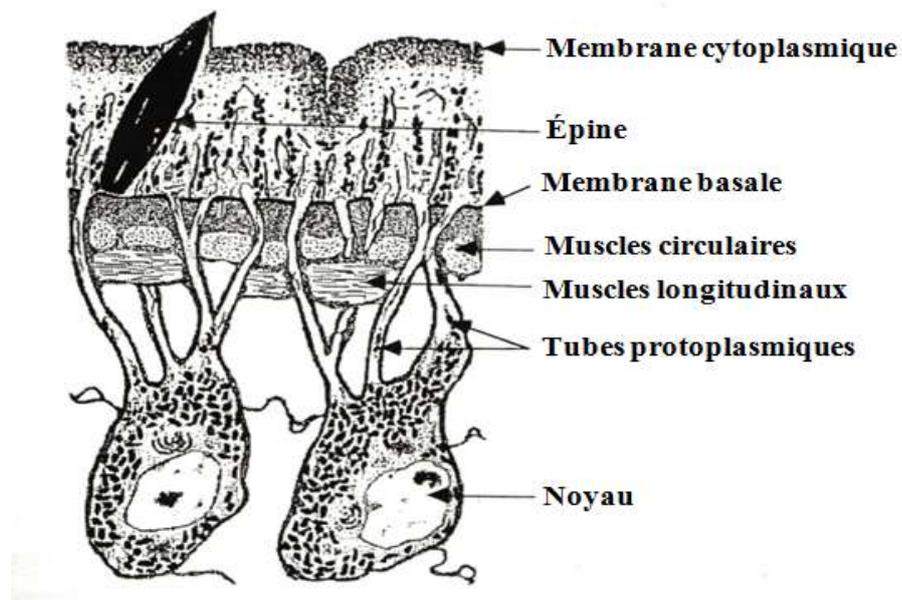


Figure 4 : Structure du tégument de *F. hepatica* (d'après Threagold, 1963).

1.3.2.2. L'appareil digestif

Comprend une bouche qui s'ouvre au fond de la ventouse buccale, un pharynx musculueux qui se poursuit en un œsophage court, se jetant dans les deux longs caecums intestinaux très ramifiés (**Fig. 5**). Il n'y a pas d'orifice anal (**Euzéby, 1971; Beaumont et Cassier, 2004; Bussiéras et Chermette, 1995**).

1.3.2.3. L'appareil reproducteur

Fasciola hepatica est hermaphrodite (**Fig. 6**). Elle possède :

- Un appareil mâle composé de deux testicules ramifiés, de deux spermiductes, d'une vésicule séminale qui est contenue avec le cirre dans la poche du cirre ;
- Un appareil femelle avec un ovaire situé en avant des testicules, un oviducte se terminant dans l'ootype où débouche aussi un vitelloducte issu de la fusion des deux vitelloductes, deux glandes vitellogènes, disposées sur les bords latéraux, sont visibles et un utérus ;
- Un orifice génital unique situé sur la face ventrale, en avant de l'acétabulum (**Euzéby, 1971; Bussiéras et Chermette, 1995; Bourdoiseau, 1997; Beaumont et Cassier, 2004**).

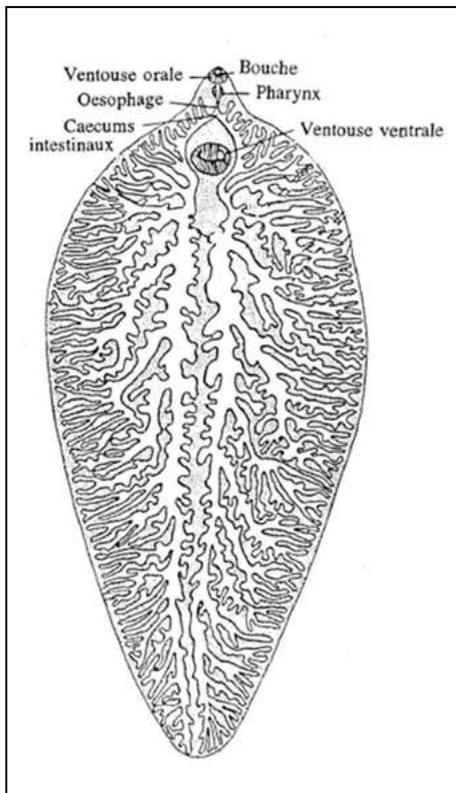


Figure 5 : Appareil digestif de *F. hepatica* adulte (Soulsby, 1982).

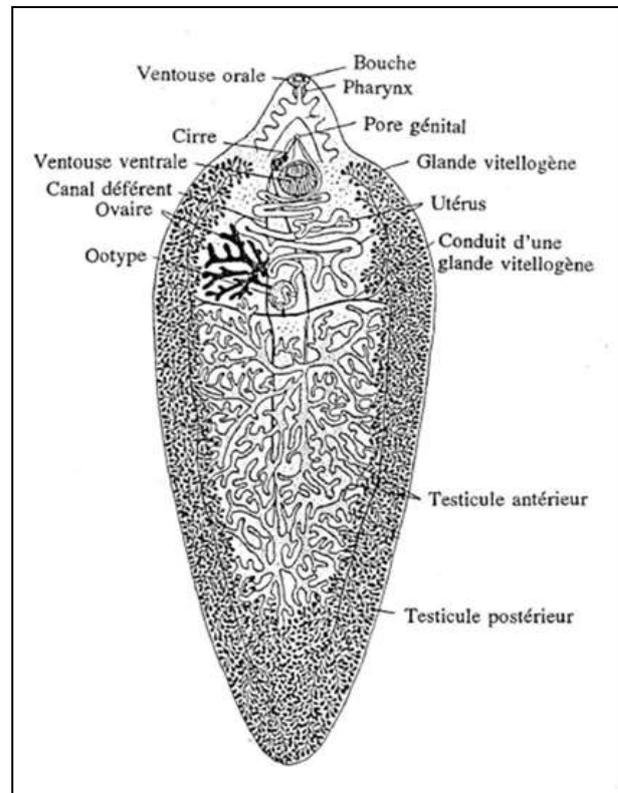


Figure 6 : Appareil reproducteur de *F. hepatica* adulte (Soulsby, 1982).

1.3.2.4. L'appareil excréteur

Il est formé d'un réseau de canalicules protonéphridiens ramifiés (**Fig. 7**) qui s'anastomosent pour aboutir à une vessie contractile qui s'ouvre sur un pore excréteur situé à l'extrémité postérieure de la douve (**Beaumont et Cassier, 2004; Bussiéras et Chermette, 1995**).

1.3.2.5. Le système nerveux

Il est formé d'un anneau périoesophagien reliant deux ganglions cérébroïdes d'où partent trois nerfs antérieurs et trois nerfs postérieurs (**Fig. 8**). Absence d'organes sensoriels sauf chez la larve (tache photosensible). (**Bussiéras et Chermette, 1995; Beaumont et Cassier, 2004**).

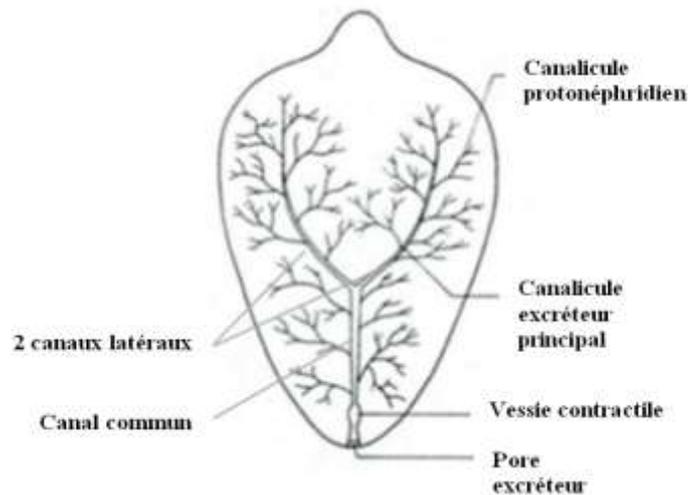


Figure 7 : Appareil excréteur de *F. hepatica* (d'après Beaumont et Cassier, 2004).

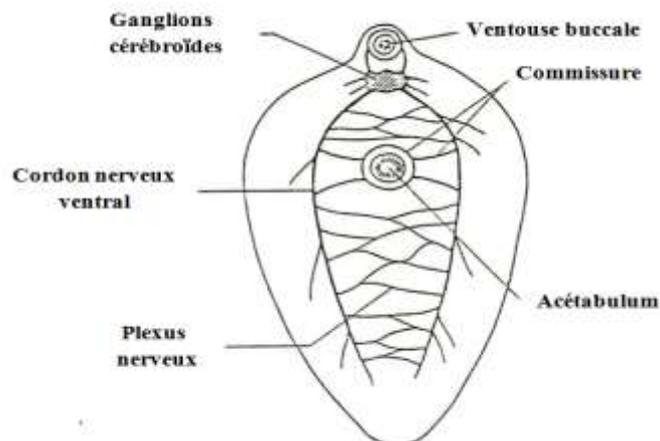


Figure 8 : Système nerveux de *F. hepatica* (d'après Beaumont et Cassier, 2004).

1.4. Biologie :

1.4.1. Habitat

Les formes immatures transitent de l'intestin au parenchyme hépatique en quelques jours à quelques semaines. Elles migrent dans le parenchyme hépatique en détruisant les hépatocytes afin de se frayer un chemin vers les canaux biliaires (**Dawes, 1963; Moreau et al., 1997**).

Les formes adultes de *F. hepatica* vivent dans les gros canaux biliaires et parfois la vésicule des hôtes, où le parasite peut être à l'état libre ou fixé à la muqueuse par ses ventouses. Cependant, les douves adultes peuvent avoir des localisations erratiques (poumons, rate, tissu conjonctif sous-cutané, sous séreux ou intermusculaire voire même l'encéphale) (**Euzéby, 1971; Bussiéras et Chermette, 1995**).

1.4.2. Nutrition

Les adultes de *F. hepatica* sont essentiellement hémato-phages. En effet, ils possèdent un appareil digestif (puissant pharynx, abondantes ramifications caecales) très adaptés à ce mode d'alimentation. De plus, cette hémato-phagie a été mise en évidence par plusieurs travaux. Les formes immatures sont histophages, ce qui est en rapport avec leur migration intra-parenchymateuse (**Euzéby, 1971; Malone, 1986**).

1.4.3. Cycle évolutif

F. hepatica a un cycle évolutif dixène, nécessitant la présence d'un hôte intermédiaire, un mollusque chez qui se déroule la multiplication asexuée et d'un hôte définitif, un vertébré.

1.4.3.1. Les hôtes définitifs

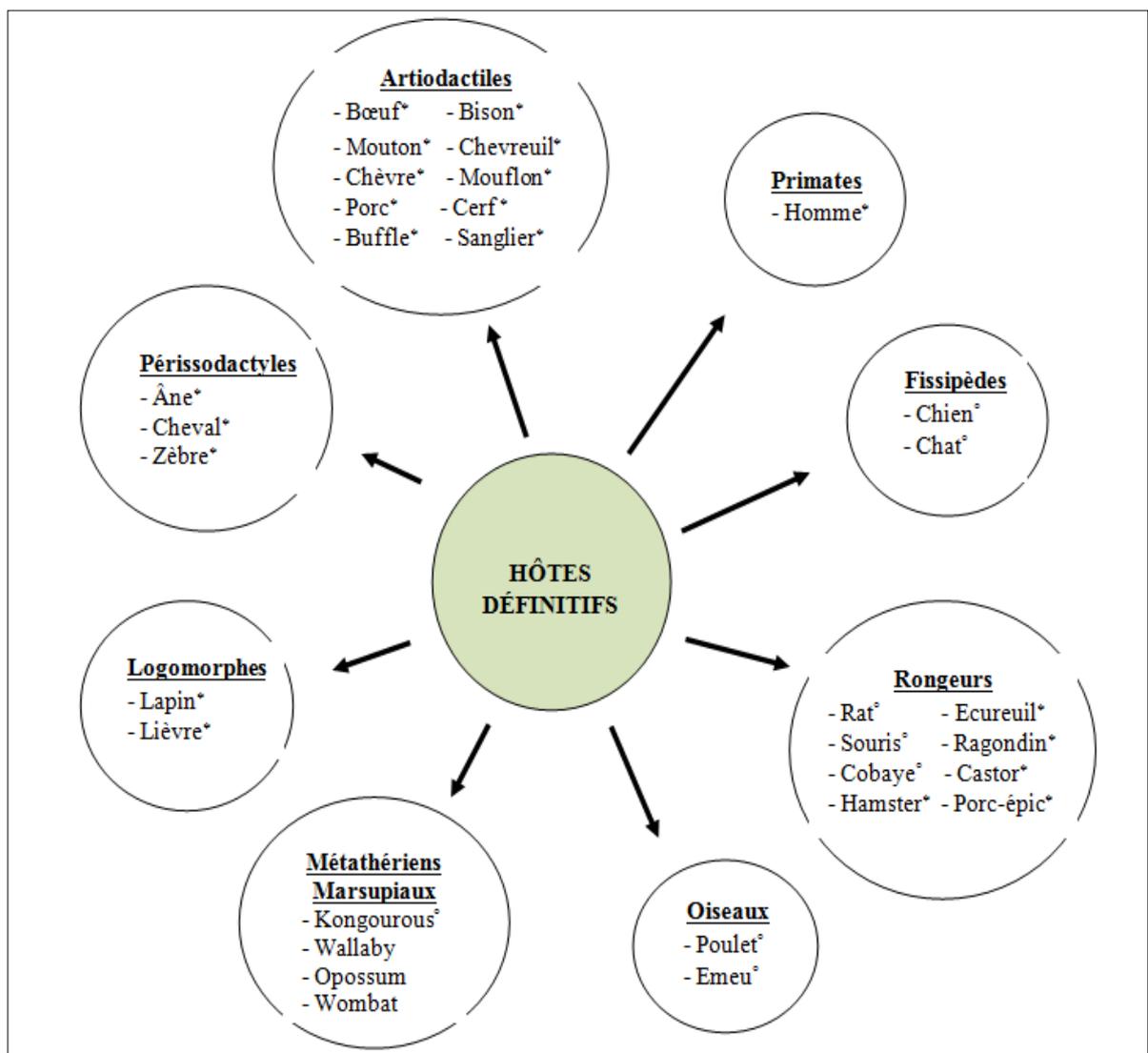
Les hôtes définitifs les plus souvent infestés par *F. hepatica* sont les herbivores: ovins, bovins et caprins; ces derniers de par leurs habitudes alimentaires particulières sont moins atteints. Les équidés s'infestent occasionnellement (**Euzéby, 1971; Pandey, 1983**). Secondairement les omnivores, tels les primates et les porcins, peuvent être atteints (**Sinclair 1967**). L'Homme peut être aussi infesté et développé cette parasitose (**Euzéby, 1971**).

Les espèces appartenant à la faune sauvage sont également réceptives et jouent ainsi le rôle de réservoir. Citant les chevreuils, les lièvres et les castors (**Lang, 1977**), les marsupiaux (**Boray, 1967**) et les ragondins (**Delecole, 1981**).

De plus, deux espèces d'oiseaux peuvent être infestées par *F. hepatica*: la poule par une infestation expérimentale (**Euzéby, 1971**) et l'émeu en Australie (**Vaughan et al., 1997**).

Les Mammifères, citées ci-dessus peuvent être infestées expérimentalement, les souris, les gerboises, les rats, les hamsters, les cochons d'inde et les lapins ont pu l'être aussi. Néanmoins, la susceptibilité à l'infestation par *F. hepatica* varie selon les espèces. Ainsi, les rats et les souris sont très sensibles même avec des infestations très minimales, par contre, le lapin est un hôte de choix pour l'infestation expérimentale (**Euzéby, 1971**).

Le nombre et la diversité des espèces réceptives à l'infestation fasciolienne, qu'elle soit naturelle ou expérimentale, signent que *F. hepatica* est un parasite polyxène. La **figure 9** présente les principaux hôtes définitifs qui s'infestent naturellement ou expérimentalement par *F. hepatica*.



(*) : Infestation naturelle. (°) : Infestation expérimentale.

Figure 9 : Les hôtes définitifs de *F. hepatica* (d'après Boray, 1969; Euzéby, 1971; Soulsby, 1982; Torgerson et Claxton, 1999).

1.4.3.2. Les hôtes intermédiaires

S'il existe une grande variété d'hôtes définitifs pour *F. hepatica*, les hôtes intermédiaires se limitent au genre *Lymnaea*, qui compte au moins vingt espèces identifiées dans le monde (Torgerson et Claxton, 1999). Ce sont des gastéropodes pulmonés d'eau douce dont la principale espèce est *Galba truncatula* O.F. Müller, 1774 (anciennement connue sous le nom de *Lymnaea truncatula*) ou limnée tronquée.

D'autres espèces de la même famille servent d'hôtes intermédiaires à *F. hépatica*. Le **tableau 1** indique les différentes espèces de limnées intervenant comme hôtes intermédiaires dans le cycle de *F. hepatica*. Cependant, il faut signaler que seuls les jeunes spécimens de certaines espèces de mollusques assurent le développement larvaire du Digène (Boray, 1978). La sensibilité des limnées à l'infestation par *F. hepatica* varie en fonction des espèces. Deux espèces de mollusques appartenant à des familles voisines de la famille des Lymnaeidae, peuvent servir d'hôtes intermédiaires et qui sont, *Balinus truncatus* (Barthe et Rondelaud, 1986) et *Planorbis leucostoma* (Abrous et al., 1998).

Le cycle évolutif de *F. hepatica* peut être divisé en deux phases bien distinctes :

- La phase exogène du cycle, explique l'évolution dans le milieu extérieur et chez l'hôte intermédiaire des différents stades larvaires;
- La phase endogène du cycle, explique l'évolution chez l'hôte définitif du stade adulte et de sa reproduction sexuée.

Après fécondation croisée, la douve adulte pond de 3 000 à 50 000 œufs par jour (Chen et Mott, 1990). L'œuf pondu (**Fig. 10**) est ellipsoïde, operculé, mesurant de 130 à 145 µm de long, de couleur brun jaunâtre et de surface lisse (Josen et al., 1990). Les œufs, à l'intérieur desquels se trouve un zygote et un amas de cellules de réserve appelé syncytium vitellin, sont transportés par la bile via le canal cholédoque jusque dans le duodénum de l'hôte définitif puis sont éliminés dans l'environnement extérieur avec les excréments.



Figure 10 : Œuf de *F. hepatica* (d'après Josen et al., 1990).

Tableau 1 : Les principales espèces de limnées intervenant comme hôtes intermédiaires naturels dans le cycle évolutif de *F. hepatica* (d'après Apostoloff, 2001, modifié).

Lymnaea	Localisation	Références
<i>L. truncatula</i>	- Toute l'Europe - Moyen-Orient - Afrique : Afrique du sud, Kenya, Cameroun, Egypte, Ethiopie, Maghreb. - Amérique : USA, Canada, Bolivie, Pérou. - Asie : Syrie, Iraq, Iran, Pakistan, Afghanistan.	Kendall (1950) ; Boray (1966, 1982) ; Euzeby (1971) ; Malek (1980) ; Brown (1994) ; Graczyk et Fried (1999); Mas-Coma et al., (1999).
<i>L. columella</i>	- Afrique - Amérique du Nord et Centrale - Amérique du Sud - Australie, Nouvelle-Zélande	Boray (1966) ; Euzeby (1971) ; Yong Cong et Perrera de Puga (1991) ; Brown (1994).
<i>L. glabra</i>	- Europe	Boray (1966).
<i>L. peregra</i>	- Europe	Boray (1966, 1969).
<i>L. stagnalis</i>	- Europe	Boray (1966, 1969).
<i>L. palustris</i>	- Europe - USA	Boray (1966) ; Lang (1977).
<i>L. occulta</i>	- Pologne	Czapski (1977).
<i>L. humilis</i>	- Amérique du Nord	Over (1982).
<i>L. cubensis</i>	- Amérique du Nord et centrale	Over (1982).
<i>L. viatrix</i>	- Amérique du Sud	Over (1982) ; Mas-Coma <i>et al.</i> , (1999).
<i>L. bulimoides</i>	- Amérique du Nord et centrale - Australie	Lang (1977) ; McKown et Ridley (1995).
<i>L. tomentosa</i>	- Australie, Nouvelle-Zélande, Nouvelle-Guinée.	Boray (1966, 1969) ; Over (1982).
<i>L. viridis</i>	- Iles de l'Asie, Japon	Watanabe (1962) ; Boray (1982).

1.4.3.3. La phase exogène du cycle

❖ Dans le milieu extérieur

C'est dans le milieu extérieur que les œufs achèvent de s'embryonner grâce aux conditions favorables qui sont l'humidité et l'oxygénation (nappes d'eau très peu profondes), ainsi qu'une température optimale de 22 (Bussiéras et Chermette, 1995).

Au terme d'une incubation de 2 à 3 semaines à 22 – 24 °C, l'éclosion s'effectue, libérant une larve ciliée mobile, le miracidium (**Fig. 11**) qui est un organisme libre, piriforme, mesurant 130 µm de longueur et 27 µm de largeur. Il possède deux ganglions cérébroïdes surmontés par une paire d'ocelles, un rudiment de tube digestif, un ganglion nerveux, deux protonéphridies et un amas de cellules embryonnaires indifférenciées (Beaumont et Cassier, 2004; Josens *et al.*, 1990). Pendant sa courte vie de 24 h, le méracidium doit rencontrer rapidement l'hôte intermédiaire adéquat, un gastéropode pulmoné, amphibie, pour lequel il présente un chimiotropisme positif.

❖ Chez l'hôte intermédiaire

Une fois en contact avec la limnée, grâce à son éperon, le méracidium pénètre activement à travers le tégument du mollusque et subit une métamorphose régressive qui se caractérise par la perte des organes (cils, ocelles, ganglions cérébroïdes, protonéphridies). Il se transforme en une nouvelle forme larvaire, le sporocyste.

Le sporocyste est un sac mobile, ayant une forme allongée de 1 mm de longueur et 50 µm de largeur, délimité par une mince cuticule (**Fig. 12**). Il se déplace dans l'appareil circulatoire, après plusieurs jours de migration dans le corps de la limnée, il se fixe généralement dans la région réno-péricardique (Bouix-Busson *et al.*, 1984). Et par une multiplication asexuée, véritable bourgeonnement interne, les cellules germinatives se multiplient activement engendrant de 5 à 20 rédies (Bussiéras et Chermette, 1995).

La rédie a la forme d'un sac allongé, mesurant de 1,3 à 1,6 mm de longueur (**Fig. 13**). Cette larve possède un cône céphalique portant une bouche. Elle est constituée principalement d'un pharynx, d'un caecum digestif, d'un épithélium et renferme aussi un amas de cellules germinatives (Beaumont et Cassier, 2004; Josens *et al.*, 1990). Les rédies percent la paroi du sporocyste, migrent dans le tissu conjonctif du mollusque et gagnent l'hépatopancréas où elles se nourrissent et grandissent. Si la température est supérieure à 20 °C, les massifs de cellules germinatives des rédies de première génération se multiplient et aboutissent à la formation des cercaires. Chaque rédie donne 15 à 20 cercaires.

Lorsque les conditions sont défavorables, les rédies donnent naissance à des rédies filles voire petites filles (**Bussiéras et Chermette, 1995**).

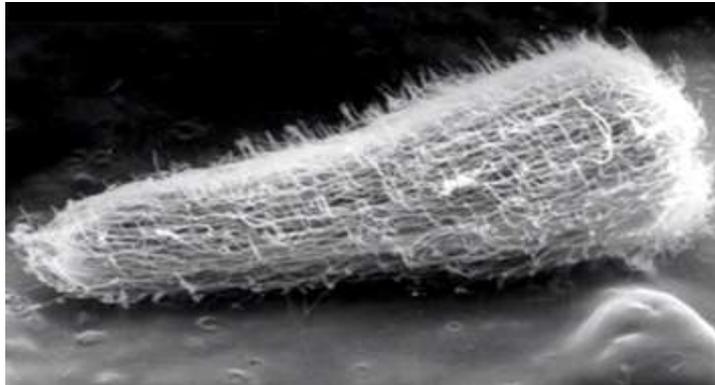


Figure 11 : Miracidium de *F. hepatica* (d'après Josens *et al.*, 1990).

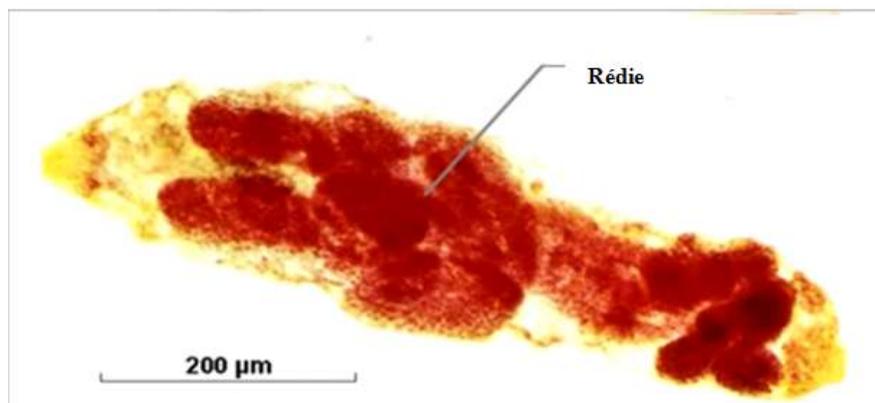


Figure 12 : Sporocyste de *F. hepatica* [2].



La cercai **Figure 13** : Rédie de *F. hepatica* (d'après Josens *et al.*, 1990). en miniature l'organisation d'une douve adulte mais les organes génitaux ne sont pas différenciés. Le corps

est constitué d'une sphère antérieure de 0,25 à 0,35 mm de diamètre et d'une longue queue natatoire qui mesure 800 µm (**Beaumont et Cassier, 2004; Josens et al., 1990**). Les cercaires quittent les rédies par l'orifice de ponte, leur nombre peut atteindre jusqu'à 4 000 cercaires dans une limnée (**Bussiéras et Chermette, 1995**). Puis, elles sont éliminées passivement par le mollusque, via le pneumostome, à la faveur d'un passage dans un milieu immergé (**Bussiéras et Chermette, 1995; Bourdoiseau, 1997**), sous forme de vagues, séparées par des phases de repos sans émission (**Da Costa et al., 1994**). Selon **Bossaert (2000)**, les cercaires quittent la limnée sous l'effet d'un choc thermique inducteur. L'émission cercarienne survient de 8 à 9 sem après l'invasion du mollusque par le mércidium.

❖ Dans le milieu extérieur

Ainsi, les cercaires qui émergent du mollusque se trouvent dans l'eau. Ayant un géotropisme négatif et un phototropisme positif, elles finissent par se fixer, à l'aide de ses ventouses, sur des plantes aquatiques, et même sur l'interface eau/air. Elles perdent leur queue, puis sécrètent une épaisse coque kystique pour se protéger, réalisant le stade métacercaire qui est la forme de résistance enkystée de la cercaire (**Cassier et al., 1998**).

La métacercaire (**Fig. 15**) est une sphère de 0,2 à 0,3 mm, à paroi épaisse, ayant toutes les structures de la future douve (**Dixon, 1965; Josen et al., 1990**). Elle résiste au milieu extérieur grâce à sa paroi qui est constituée de quatre couches (**Fig. 16**) :

- La couche I (externe): est épaisse et de nature protéique. Elle constitue une barrière contre l'attaque bactérienne et fongique;
- La couche II: est une fine couche fibreuse composée de muco-polysaccharides acides et de muco-protéines;
- La couche III: est divisée en trois sous-couches de muco-protéines et muco-polysaccharides;
- La couche IV: est lamellaire, contient de la kératine qui assure l'étanchéité et protège de la dessiccation.

Les deux premières couches (I et II) réunies forment le kyste externe alors que les deux dernières couches constituent le kyste interne (**Dixon, 1965**).

En état de vie ralentie, les métacercaires sont plus sensibles à la chaleur qu'au froid (**Boray, 1967**), leur survie dépend de l'humidité et de la température ambiante. Cependant, elles ne résistent pas du tout à la dessiccation (**Bossaert, 2000**).



Figure 14 : Cercaire de *F. hepatica* (d'après Josens *et al.*, 1990).



Figure 15 : Métacercaires de *F. hepatica* (d'après Josens *et al.*, 1990).

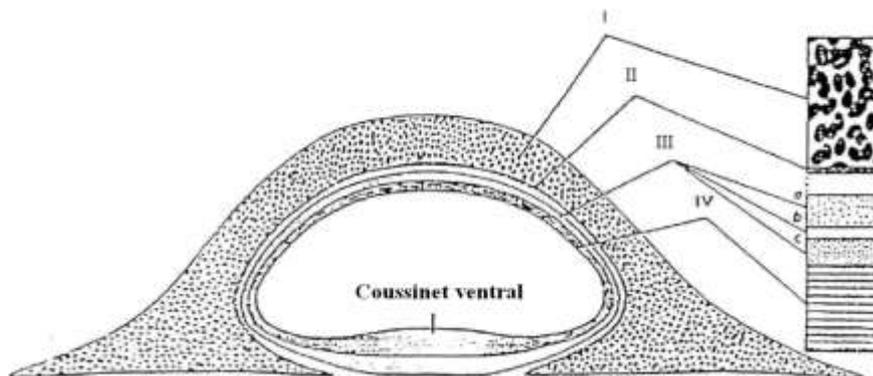


Figure 16 : Coupe verticale de la paroi de la métacercaire de *F. hepatica* (d'après Dixon, 1965).

La plante et l'eau qui véhiculent les métacercaires ont, pour certains parasitologues, valeur de deuxième hôte intermédiaire (**Cassier *et al.*, 1998**). En effet, sur un seul brin d'herbe, on peut compter jusqu'à 1000 métacercaires qui peuvent être parfois dispersées par les eaux de ruissellement (**Bussiéras et Chermette, 1995**).

1.4.3.4. La phase endogène du cycle

❖ Chez les hôtes définitifs

Les métacercaires représentent la forme infestante pour les mammifères réceptifs qui les ingèrent avec les végétaux aquatiques lorsqu'ils sont exondés (métacercaires fixées) ou en buvant de l'eau (métacercaires flottantes) (**Bussiéras et Chermette, 1995; Cassier *et al.*, 1998**).

Arrivée au niveau du duodénum, la paroi du kyste est digérée, libérant la douve immature ou l'adolescaria qui traverse la paroi intestinale pour se trouver dans la cavité péritonéale d'où elle chemine à travers le mésentère. C'est au moment où la jeune douve perce la capsule de Glisson et migre dans le tissu hépatique que les signes les plus aigus apparaissent chez l'hôte définitif. Après 6 à 8 semaines de migration intra-hépatique, elle gagne les canaux biliaires au sein desquels elle atteint sa taille adulte et acquiert sa maturité sexuelle au bout de 4 semaines (**Bussiéras et Chermette, 1995; Cassier *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 1997**).

Arrivée au niveau du duodénum, la paroi du kyste est digérée, libérant la douve immature ou l'adolescaria qui traverse la paroi intestinale pour se trouver dans la cavité péritonéale d'où elle chemine à travers le mésentère. C'est au moment où, la jeune douve perce la capsule de Glisson et migre dans le tissu hépatique que les signes les plus aigus apparaissent chez l'hôte définitif. Après 6 à 8 semaines de migration intra-hépatique, elle gagne les canaux biliaires au sein desquels elle atteint sa taille adulte et acquiert sa maturité sexuelle au bout de 4 semaines (**Bussiéras et Chermette, 1995; Cassier *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 1997**).

La période prépatente varie selon les espèces: elle est de 8 semaines chez le lapin, de 11 à 12 semaines chez les ovins et de 12 semaines chez les bovins.

Le cycle évolutif de *F. hepatica* (**Fig. 17**) est assez long car il dure 6 mois dans les meilleures conditions :

- 3 mois pour le développement exogène (de l'œuf jusqu'au stade métacercaire) ;
- 3 mois pour le développement endogène (**Bussiéras et Chermette, 1995; Bourdoiseau, 1997**).

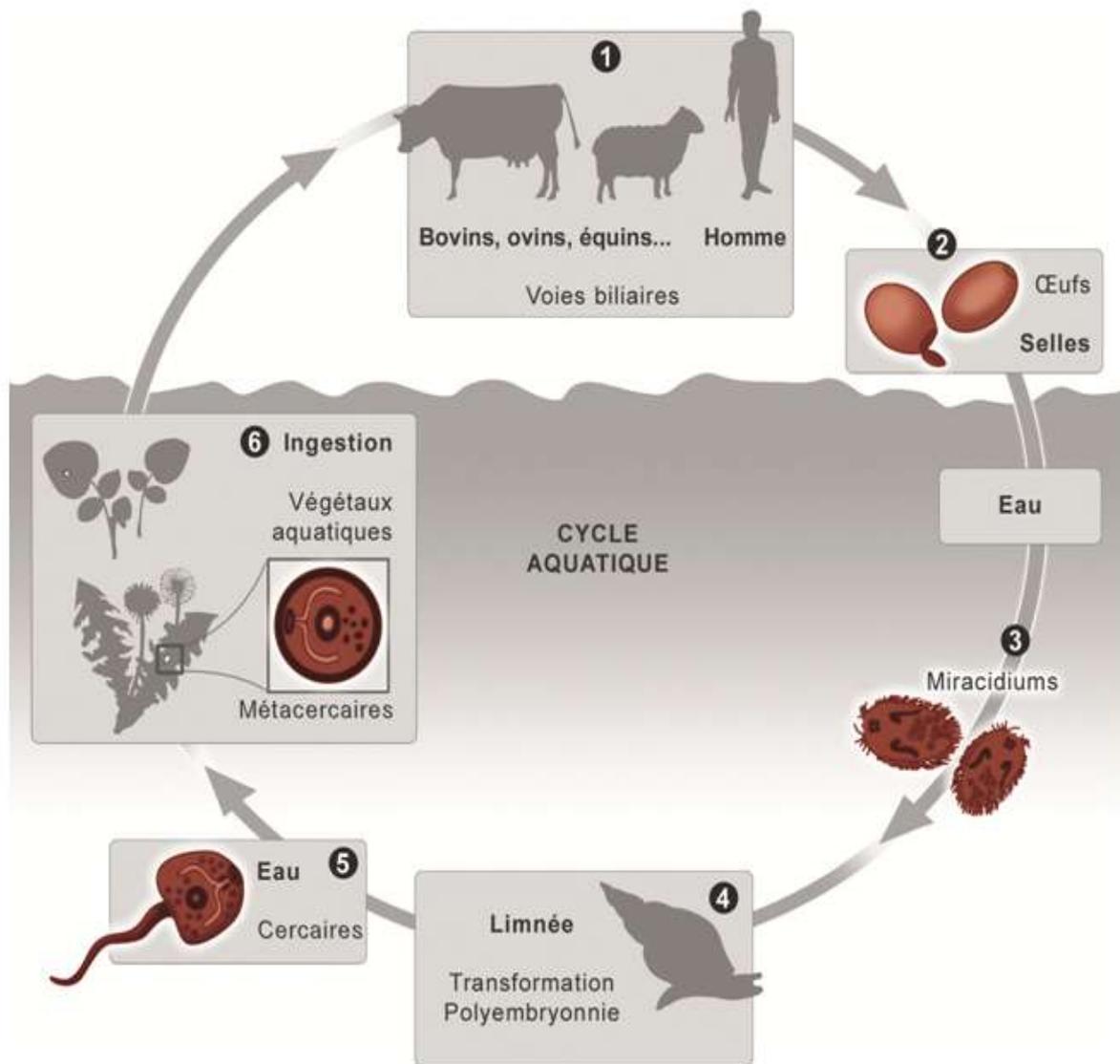


Figure 17 : Le cycle évolutif de *F. hepatica* et les différents stades de développement [3].

2. Importance de la fasciolose

2.1. Importance économique

Nombreuses sont les études qui ont été réalisées pour estimer les conséquences zootechniques dues à la fasciolose. Néanmoins, l'évaluation des pertes causées par cette parasitose reste difficile.

Les pertes par animal infesté ont été estimées à 299 Euros par an, d'après l'étude de **Schweizer et al. (2005)**. Selon une étude plus récente de **Charlier et al. (2014)**, le coût moyen par vache infestée a été estimé à plus de 300 Euros par an.

L'infestation fasciolienne, dont l'impact économique est méconnue par les éleveurs qui mènent leur troupeaux quelques soit l'espèce (ovine, bovine ou équine) dans les zones à risque (les berges d'étang et de petits ruisseaux, les prairies marécageuses, etc.), est responsable de la baisse des performances zootechniques ainsi que de la saisie des foies lésés.

2.1.1. Baisse de la croissance pondérale et du rendement en viande

La fasciolose entraine des retards de croissance plus au moins graves selon l'espèce et l'âge des animaux (**Jeandel, 1991; Lescure, 1991**). L'impact de cette helminthose semble plus important dans les élevages intensifs (**Chick et al., 1980**).

Ainsi, l'infestation par *F. hepatica* des jeunes bovins à l'engraissement entraine une baisse du poids nécessitant un engraissement plus long afin d'obtenir le poids idéal des carcasses. En effet, la réduction du gain de poids de jeunes bovins peut atteindre 8 à 28% avec une infestation de 40 à 140 douves (**Mage, 1990**).

Selon **Dargie (1987)**, les bovins ayant des niveaux d'infestation de 30 à 80 douves présentent une baisse de croissance de 70 à 200 g par semaine, et de 350 à 1200 g par semaine pour des infestations jusqu'à 200 douves en comparaison avec des animaux traités ou non infestés, alors que chez les ovins, elle est de 30 g par semaine pour des infestations inférieures à 45 douves, et de 130 à 300 g par sem pour des infestations de 100 à 200 douves. Les ovins peuvent souffrir d'anémie (**Alzieu et Mage, 1991**).

Une étude de **Schweizer et al. (2005)**, a pu mettre en évidence une réduction moyenne de 9% du gain moyen quotidien chez des bovins en croissance. En outre, la baisse de croissance se traduit par un déclassement des carcasses à l'abattoir pour une moins bonne conformation.

Une conversion alimentaire moins efficace chez les animaux atteints de fasciolose avec une faible infestation en est la cause (**Dargie, 1987**), ainsi qu'une perte d'appétit lors de fortes infestations (**Alzieu et Mage, 1991**).

2.1.2. Diminution de la production laitière

La fasciolose se traduit également par une diminution de la sécrétion lactée et une modification de sa qualité. D'après l'étude de **Ross (1970)**, pour des niveaux d'infestation de 100 à 500 douves, la baisse de production laitière des vaches était de 8 à 20%.

Une étude réalisée, durant deux ans, sur un lot de vaches ayant une infestation modérée asymptomatique a révélé une diminution de la production laitière de 5% (**Vaast et blain, 1988**).

Selon **Dargie (1987)**, l'estimation de la perte de lait est de 90 à 300 Kg par lactation annuelle chez les vaches. Chez les ovins, un effet sur la sécrétion lactée est probable, les agneaux nourris par des brebis infestées ayant un gain de poids plus faible.

De plus la qualité du lait est affectée suite aux perturbations de la synthèse des protéines, des matières grasses et du lactose (**Mage et Legarto, 1986; Mage, 1990**).

Les conséquences de la fasciolose sont souvent sévères sur le foie qui est le siège des synthèses, des processus de catabolisme et de détoxification (**Alzieu et Mage, 1991**), aboutissant ainsi, aux altérations des synthèses glucidiques, protéiques et lipidiques (**Gonzalez et al., 1991**).

Quoique l'évaluation de l'incidence de la fasciolose sur la production laitière, qui est influencée par plusieurs facteurs (race, âge, alimentation, nombre de lactation, etc.), soit difficile, **Charlier et al., (2007)** ont pu mettre en évidence une réduction moyenne de la production laitière de 0,7 Kg par vache et par jour.

2.1.3. Effet sur la reproduction

Bien qu'il soit difficile d'évaluer l'impact de la fasciolose sur la fertilité, d'autres facteurs d'ordre nutritionnels, zootechniques et pathologiques étant plus importants, il est admis que la réduction des performances de reproduction s'observe lorsque l'invasion des canaux biliaires par les douvules coïncide avec la conception du fœtus (**Cawdery et Conway, 1971**); cet effet peut s'expliquer par le stress physiologique et nutritionnel qui accompagne l'infestation.

L'influence de la fasciolose sur la fertilité des bovins a été mise en évidence (**Barnoin et al., 1986; Mage et al., 1989**). En effet, elle retarde l'âge à la puberté et diminue la fertilité (**Dargie, 1987; Mage et al., 1989; Mage, 1990; Jeandel, 1991**).

La baisse de la fertilité chez les vaches laitières est estimée à environ 25% (**Mage, 1990**). Ces perturbations seraient liées aux troubles de la biotransformation des hormones stéroïdiennes.

Le traitement douvicide administré avant la période de reproduction favorise l'apparition des chaleurs (Cawdery *et al.*, 1977) et améliore la fertilité de 23% (Mage *et al.*, 1989).

Une expérience effectuée sur des bovins traités contre la fasciolose a montré un taux de gestation amélioré par rapport au lot non traité (Loyacano *et al.*, 2002).

2.1.4. Effet sur la production de la laine

Parmi les conséquences de la fasciolose, la diminution tant en quantité qu'en qualité de la laine est notable essentiellement au stade adulte du parasite. Une réduction de 23% et 50% du poids de la laine a été évaluée avec des infestations de 45 et 350 douves, respectivement (Dargie, 1987). La perte de l'appétit étant la principale cause.

2.1.5. Saisie des foies

Dans les pays développés, la saisie des foies infestés par la grande douve au niveau des abattoirs est régit par la réglementation, ce qui engendre des pertes économiques considérables.

La saisie est totale à cause des lésions qui altèrent les qualités nutritives et organoleptiques de cet organe noble.

En Algérie comme tous les pays en voie de développement, étant donnée la valeur marchande du foie (2000 DA le Kg), la saisie dépend du degré d'infestation, donc elle peut être totale ou seulement partielle.

En 1994, une étude menée par Mekroud, à l'abattoir de Jijel, a révélé que les saisies des foies douvés ont atteints 70%, avec une prévalence de 23% chez les bovins et de 16% chez les ovins, parvenant ainsi à estimer les pertes à plus d'un million de DA par an **Mekroud (2004)**.

2.2. Importance pour la santé humaine :

La fasciolose est une zoonose parasitaire (saprozoonose) qui est en recrudescence dans plusieurs régions du globe (Mas-Coma *et al.*, 1999; Parkinson *et al.*, 2007).

L'Homme peut contracter cette parasitose en consommant des végétaux aquatiques crus, cultivés ou sauvages, contaminés par des métacercaires (Nozais *et al.*, 1996; Cában-Hernández *et al.*, 2014), ou encore en nageant dans des eaux contaminés en zones d'élevage de bovins ou d'ovins atteints de fasciolose (Garcia *et al.*, 2007).

En France, c'est essentiellement le cresson, mais aussi le pissenlit et la mâche qui sont incriminés (**Gaillet, 1983; Dauchy *et al.*, 2006**). Au Pérou, le jus d'afla-afla a été reconnue responsable de fasciolose (**Marcos *et al.*, 2006**).

Habituee à consommer des végétaux crus, la population rurale serait plus exposée à la fasciolose. Cependant, les populations urbaines ne sont pas à l'abri car elles peuvent être infestées suite à la consommation des salades des champs vendues sur les marchés (**Euzéby, 1984**).

De 1970 à 1990, 2594 cas humains ont été recensés dans 42 pays (**Chen et Mott, 1990**).

En Europe, les rares cas décrits sont plutôt des cas sporadiques très localisés (**Dauchy *et al.*, 2006; Mas-Coma *et al.*, 2009**).

En Afrique du Nord, **Nozais *et al.*, (1996)** rapportent un chiffre de 130 cas humains infestés en Egypte. Des cas de fasciolose humaine avec une prévalence de 6,6% a été enregistré dans le Sud-Ouest de la Tunisie (**Hammami *et al.*, 2007**).

En Amérique du Sud, les nombreux cas diagnostiqués dans les zones hyperendémiques en Bolivie et au Pérou, où les prévalences les plus élevées ont été observées font de la fasciolose une maladie émergente (**Hillyer et Apt, 1997; Esteban *et al.*, 1999**) et un véritable problème de santé publique (**Mas-Comas *et al.*, 2009; Gonzalez *et al.*, 2011; Valero *et al.*, 2012**).

DEUXIÈME CHAPITRE : ÉTUDE DES ANTIGÈNES DE *FASCIOLA HEPATICA* ET IMMUNITÉ ANTI- FASCILOSE.

1. Antigènes de *F. hepatica*

1.1. Classification des antigènes de *F. hepatica*

F. hepatica est une mosaïque antigénique en perpétuel remaniements tout au long de son cycle évolutif (**Reddington et al., 1984**). Les antigènes sont classés en deux types différents qui sont :

1.1.1. Les antigènes figurés

Ils sont représentés par une partie du corps de la douve. Les antigènes figurés sont utilisés dans les réactions d'immunofluorescence.

1.1.2. Les antigènes solubles

Ils peuvent être libérés spontanément par le parasite; ce sont les antigènes circulants retrouvés dans le sérum, ou obtenus à partir du parasite. Lorsqu'ils sont extraits de la paroi, ils sont dits somatiques, alors que les produits d'excrétion-sécrétion sont dits métaboliques.

1.1.2.1. Les antigènes somatiques

Constitués par un matériel du corps parasitaire, les antigènes somatiques font partie intégrante de la structure du parasite. Ils sont libérés à la mort ou à la destruction de celui-ci. Ils correspondent généralement aux broyats de douves adultes dans lesquelles la proportion des antigènes métaboliques est faible.

1.1.2.2. Les antigènes de surface

Trois types de cellules tégumentaires libèrent des granules sécrétoires qui varient en fonction du stade de développement de *F. hepatica* chez l'hôte définitif. Ainsi, la douve immature fraîchement excystée, ayant des cellules de type 0, sécrète des granules T0. Une fois l'adolescaria arrivée au foie, les cellules de type 0 se différencient en cellules de types 1 sécrétant des granules T1. En fin, les granules T2 sont sécrétés par les douves qui se trouvent dans les canaux biliaires et possédant des cellules de type 2 (**Bennett et Threagold, 1975; Threagold, 1976; Hanna, 1980b; Reddington et al., 1984**).

Ces granules sécrétoires apparaissent dans le syncytium où ils subissent une exocytose et ajoutent leur contenu au manteau glycoprotéique externe (le glycocalyx). Ce dernier est éliminé par le parasite et renouvelé en permanence grâce aux granules sécrétoires : c'est le "Turn-over" du glycocalyx (**Reddington et al., 1984; Moreau et al., 1997**).

À l'aide de marqueurs radioactifs de surface, **Dalton et Joyce (1987)** ont caractérisé les protéines et les glycoprotéines de surface des différents stades de *F. hepatica* :

- Douves juvéniles : - Glycoprotéines de 180 et 200 kDa.
- Protéines de 52 et 170 kDa.
- Douves immatures : - glycoprotéines de 70, 85, 94, et 110 kDa.
- Douves adultes : - Glycoprotéines de 21, 25, 150, et 200 kDa.
- Protéines de 50 et 170 kDa.

Les cinétiques d'évolution des anticorps anti-T1 et T2 ont montré que ces antigènes étaient reconnus séquentiellement au cours de l'infestation. Antigéniquement similaires, les granules T0 et T1 induisent une réponse précoce et transitoire, or les antigènes des granules T2 étaient reconnus plus tardivement (**Hughes et al., 1982; Hanna et al., 1982**).

1.1.2.3. Les antigènes d'excrétion-sécrétion

Les produits d'excrétion-sécrétion de *F. hepatica* (*PESFh*) ont une double origine : les antigènes de surface sécrétés par le ver et les substances produites par son appareil digestif (**Lightowers et Rickard, 1988**), qui sont libérées spontanément, dans les tissus de l'hôte, par tous les stades de développement (**Moreau et al., 1997**).

La caractérisation des *PESFh*, par électrophorèse et immunoblot, a révélé la présence de plusieurs protéines de poids moléculaires allant de 10 à 200 kDa (**Dalton et al., 1985; Poitou et al., 1992**).

Les substances élaborées par le tube digestif du parasite sont nombreuses. Ainsi, les *PESFh* renferment un certain nombre d'enzymes protéolytiques ou protéases dont les fonctions sont spécifiques du stade évolutif (**Trap et Boireau, 2000**).

Dalton et Heffernan (1989) ont démontré que tous les stades de *F. hepatica* sécrètent un nombre considérable de protéases, la majorité d'entre elles ont été caractérisé par la présence d'une activité protéolytique de type cystéine. Les douves adultes sécrètent au moins cinq activités de type cathepsines L et au moins deux activités de types cathepsines B (**Heussler et Dobbelaere, 1994; Trap et Boireau, 2000**). Deux cathepsines L ont été purifié à partir des *PESFh* ; la CL1 a un PM apparent de 27 kDa (**Smith et al., 1993**) et de 29,5 kDa pour la CL2 (**Dowd et al., 1994**). Ces deux protéases jouent un rôle important dans la survie

des douves en permettant leur protection contre les différents effets destructeurs du SI de l'hôte (**Dixit et al., 2008; Meemon et Sobhon, 2015**).

Une autre enzyme protéolytique, la dipeptidyl peptidase I d'environ 200 kDa, dont l'activité a été mise en évidence dans les PES*Fh*. Elle catalyse le clivage au niveau de l'extrémité N-terminale des protéines en dipeptides (**Carmona et al., 1994**).

La leucine aminopeptidase a été mise en évidence dans les cellules épithéliales du tube digestif des douves adultes. Cependant, son activité est réduite dans les PES*Fh*. Cette enzyme dégrade les protéines de l'hôte en acides aminés (**Acosta et al., 1998**). Selon l'étude d'**Acosta et al. (2008)**, cette exopeptidase est impliquée dans l'hydrolyse cytosolique de l'hémoglobine préalablement dégradée par la dipeptidyl peptidase.

F. hepatica sécrète également plusieurs glycosidases qui sont responsable de la pénétration chez l'hôte et de la dégradation de ses tissus lors de la migration, notamment la β - galactosidase et la β -hexosaminidase, qui se trouvent en abondance dans les PES*Fh* (**Irwin et al., 2004**).

En outre, il existe dans les produits d'excrétion- sécrétion de *F. hepatica* des enzymes à activité anti- oxydante, telles que :

- Le superoxyde dismutase : est une enzyme dotée d'une activité anti- oxydante. Il s'agit d'une métalloprotéine qui a besoin de cuivre, de zinc et de manganèse pour fonctionner. **Piacenza et al., (1998)** ont identifié la forme extracellulaire de SOD dans les PES*Fh* du stade adulte. L'activité la plus importante a été décelée dans les PES*Fh* par comparaison à celle des fractions somatiques (**Jefferies et al., 2001**).

- Les glutathion S transférases sont les constituants majeurs des PES*Fh* (**Jefferies et al., 2001**). Ayant un poids moléculaire de 26 kDa, ces enzymes assurent la détoxification des composants endogènes toxiques et des xénobiotiques (**Spithill et Dalton, 1998**).

1.2. Méthodes d'obtention des antigènes de *F. hepatica*

D'abord, il faut laver les douves et les conserver. Il est préférable d'utiliser les douves à l'état frais mais elles peuvent être conservées et transportées dans une solution saturée de sulfate d'ammonium ou dans du tampon phosphate, soit à l'état congelé, soit à l'état lyophilisé.

La désintégration permet l'obtention des antigènes somatiques. Pour cela on peut utiliser l'homogénéisation des tissus par le broyage dans un homogénéiseur. Mais préalablement, il est nécessaire :

- d'éliminer par dialyse le sulfate d'ammonium et les sels du tampon utilisés pour la conservation des douves ;
- de réhydrater les produits lyophilisés ;
- d'éliminer les agents bactériostatiques tels que le PMSF et l'azide de sodium.

Pour obtenir les antigènes d'excrétion- sécrétion, il faut faire incuber les douves ou les cultiver dans un milieu approprié. Pendant ou après cette étape, des substances supplémentaires peuvent être extraites en modifiant la composition du milieu sans désintégrer réellement les douves (**Buck *et al.*, 1976**).

1.2.1. Les constituants antigéniques

Des glycoprotéines, des lipoprotéines et des protéines ont été isolées de *F. hepatica*. Ces protéines conjuguées jouent un rôle essentiel sur le plan antigénique.

L'extraction des lipoprotéines est l'œuvre des solvants organiques. Avant ou après l'homogénéisation, la délipidation semble une étape importante. Elle s'effectue par l'emploi des détergents neutres tels que le Tween, Nonidet et Triton X-100, qui peuvent remplacer la fraction lipidique des complexes lipoprotéiques. L'élimination des lipides abaisse la réactivité non spécifique mais il leur revient le rôle important dans l'élimination du fer qui résulte de la dégradation du sang par le parasite (**Korach et Benex, 1966**).

D'autres substances doivent être aussi éliminées, car bien qu'elles ne soient pas antigéniques, elles sont susceptibles d'entraîner des complications. Ainsi, l'élimination du glycogène est réalisée par une méthode qui consiste essentiellement en un traitement préliminaire de l'extrait brut de *F. hepatica* par la β -amylase pendant 30 min à la température ambiante. Ce traitement peut être répété une fois que le produit brut ait été soumis à une digestion par l'hydroxyde de sodium ou par des enzymes protéolytiques. Les glucides ont généralement une faible sensibilité immunologique par rapport aux protéines.

1.2.2. Le fractionnement

Il y a toute une gamme de méthodes classiques d'isolement des protéines telles que l'électrophorèse, les méthodes chromatographiques et les méthodes immunologiques :

1.2.2.1. L'électrophorèse

Les premiers travaux concernant la séparation des différents constituants d'un broyat de douves adultes par électrophorèse en gélose, ont été effectués par **Biguet *et al.*, (1962)** qui ont obtenu 15 fractions :

- 7 fractions protéiques dont 5 majeures ;
- 2 fractions glycoprotéiques majeures ;
- 6 fractions lipoprotéiques dont 2 majeures.

La **figure 18** représente la répartition des fractions sur les versants anodiques et cathodiques.

Actuellement, le fractionnement par électrophorèse SDS-PAGE dans un système vertical sur un gel d'acrylamide, mis en contact avec une solution de coloration (bleu de Coomassie), est la technique la plus couramment utilisée pour déterminer le nombre ou la masse moléculaire des fractions antigéniques séparées.

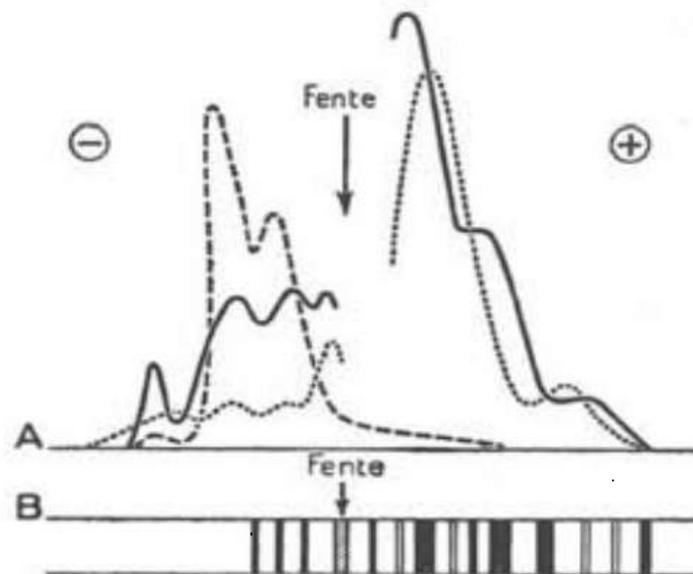


Figure 18 : A. Courbes densitométriques des protéinogramme (—), lipoprotéinogramme (.....) et glycoprotéinogramme (-----) de *F. hepatica*, d'après Biguet *et al.* (1962). B. Schéma de l'électrophorèse en gel d'amidon de cet antigène révélé à l'amido-schwartz.

1.2.2.2. Techniques chromatographiques

Plusieurs variantes de techniques chromatographiques peuvent être utilisées pour la séparation et la purification des antigènes de *F. hepatica* :

❖ **La chromatographie d'exclusion-diffusion ou gel filtration** : Elle est largement pratiquée pour le fractionnement et la séparation des antigènes parasitaires. Cette technique a été réalisée par de nombreux auteurs en utilisant différents types de gels tels que le Sephadex et le Sephacryl.

❖ **La technique HPLC** : Elle a été appliquée par **Rivera Marrero *et al.*, (1988)** en vue de la séparation des produits d'excrétion-sécrétion bruts de *F. hepatica*, ce qui a permis l'obtention d'un grand nombre de fractions correspondant à 10 pics distincts dont la majorité ont donné des réactions positives avec les immun-sérums obtenus de lapins infestés expérimentalement.

❖ **La chromatographie d'échange ionique** : C'est une technique de purification facultative dont l'application à l'analyse des antigènes parasitaires s'avère très intéressante, notamment lorsqu'il s'agit de purifier certaines molécules ayant des activités spécifiques. En effet, l'emploi d'un échangeur ionique DEAE-cellulose, combiné à une filtration moléculaire sur gel Sephacryl S-200, a permis d'isoler plusieurs enzymes parasitaires et de purifier l'haemoprotéine de *F. hepatica* à partir d'un broyat de douves adultes ou de produits d'excrétion-sécrétion de celles-ci (**McGonigle et Dalton, 1995**).

❖ **La chromatographie d'affinité** : C'est la méthode de choix, qui sert à purifier une enzyme, un substrat ou un composé semblable au substrat couplé à un support, ce qui permet l'adsorption spécifique de chaque composé, qui est ensuite libérée par dissociation du complexe par diverses méthodes telles que l'élution avec des concentrations élevées de substrat et utilisation d'agents de dépliement des protéines (ex. l'urée, la guanidine). Le couplage de lectines, telles que la Concanavaline A, à un support lui permet de réagir avec des protéines spécifiques.

La composition antigénique des préparations éluées à partir des immuno-adsorbants dépendra des immuns-sérums couplés aux supports. Pour isoler toute une gamme d'antigènes, il est préférable d'utiliser des immunoglobulines purifiées issues d'un mélange de sérums plutôt que d'un seul sérum (**Buck *et al.*, 1976**).

1.2.2.3. L'immunoélectrophorèse

C'est la technique immunologique la plus couramment utilisée pour la mise en évidence des antigènes parasitaires. Cette méthode a permis d'identifier les véritables antigènes parmi tous les constituants protéiques de *F. hepatica*.

Les 15 fractions antigéniques individualisées par **Biguet et al., (1962)**, lors d'une immunoélectrophorèse en gélose, réalisée avec des sérums de lapins hyperimmunisés, sont numérotées de 1 à 15 selon leur position du versant cathodique au versant anodique (**Fig. 19**).

Par cette technique, **Tailliez et Korach (1970a)** a mis en évidence une fraction antigénique correspondant à l'arc 2 d'IEP, spécifique du genre *Fasciola* et qui s'est avérée très efficace pour le diagnostic immunologique précoce de la fasciolose (**Levieux et al., 1992a; Pourquier et al., 1995**).

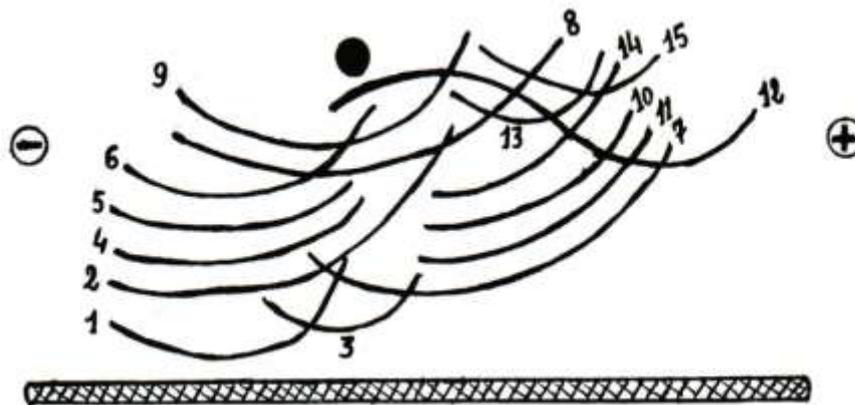


Figure 19 : Analyse immunoélectrophorétique en gélose des antigènes de *F. hepatica*, d'après Biguet et al. (1962).

1.2.3. Caractérisation des antigènes

Le produit isolé peut être différent du produit brut, nécessité oblige de le caractériser immunologiquement et, dans une certaine mesure, biochimiquement.

1.2.3.1. Caractérisation biochimique

Pour identifier les protéines, il faut déterminer le point isoélectrique, le poids moléculaire et l'activité biologique dans le cas des antigènes et des enzymes. La teneur en protéines des préparations antigéniques doit être mesurée. En outre, il faut indiquer toute activité enzymatique en termes et unités.

1.2.3.2. Caractérisation immunologique

Il faut déterminer la spécificité et l'activité du produit final, par des épreuves immunologiques avec une série définie de préparations de référence de sérums positifs homologues et des sérums négatifs. L'activité immunologique doit être exprimée en fonction de la réactivité en présence de préparations de sérums de référence. Il est donc indispensable de prélever des sérums provenant de cas confirmés par coproscopie, de les mélanger et de les répartir en petites quantités (**Buck *et al.*, 1976**).

1.3. Fractions antigéniques

La nature et la qualité de l'antigène préparé influent sur la réalisation pratique des techniques de diagnostic immunologique et la fiabilité des résultats. En pratique courante, il est essentiel, pour le diagnostic, d'utiliser des antigènes bien définis tant du point de vue biochimique qu'immunologique, ce qui permet leur utilisation reproductible dans les tests immunologiques basés sur la réaction Ag-Ac.

1.3.1. Extraits bruts

1.3.1.1. Les broyats

Initialement, des extraits aqueux ou alcooliques de broyats de grandes douves étaient utilisés en IEP afin de mettre en évidence la présence des anticorps chez les individus infestés. **Biguet *et al.* (1962)** à partir de leur homogénat brut, ont extrait un antigène standard qu'ils ont obtenu selon les étapes suivantes :

- Récolte de douves sur des foies parasités ;
- Lavage plusieurs fois dans une solution de NaCl à 9‰ ;
- Broyage à basse température ;
- Extraction par une solution de NaCl 0,018 M ;
- Centrifugation pendant une heure, à 12 000 t/min à 4 °C ;
- Dialyse du surnageant et conservation par lyophilisation.

Le manque de spécificité a entraîné l'abandon progressif de leur usage. En effet, la complexité de ces préparations antigéniques donnait des réactions croisées avec des immun-sérums dirigés contre plusieurs espèces parasitaires fréquemment rencontrées lors de parasitoses humaines.

1.3.1.2. L'antigène excrété-sécrété (E.S)

L'antigène E.S est la fraction la plus décrite. D'obtention facile, il est encore utilisé malgré les réactivités croisées connues avec d'autres helminthes. L'antigène ES est obtenu en réalisant les étapes suivantes :

- Récoltes des douves adultes dans les canaux biliaires ;
- Maintien en survie en milieu nutritif pendant 24 à 48 heures ;
- Récolte des surnageants après une période d'incubation ;
- Concentration et délipidation éventuelle de l'antigène ES ;
- Conservation par lyophilisation.

Actuellement, toutes les recherches sont orientées vers la production de préparations antigéniques à partir des PES*Fh* (**Pfister, 1990**).

1.3.2. L'antigène F2

L'antigène F2 a été isolé en premier par **Tailliez et Korach (1970a)** à partir de l'antigène ES, en plusieurs étapes et par différentes techniques de purification qui sont résumées sur la **figure 20**. La fraction II est dissociée par électrophorèse en trois sous-fractions : FII(a) et FII(b) qui sont, du point de vue antigénique, similaires et FII(c) qui peut être décomposée en deux sous-unités : FII(c₁) et FII(c₂).

Cet antigène est de nature protéique, il s'agit d'une protéine d'environ 20 kDa. Il est peu chargé en glucides (2%) et dépourvu de lipides. Cependant, il renferme une quantité notable de fer provenant essentiellement de l'hémoglobine et des cellules hépatiques lors de la nutrition du parasite (**Tailliez et Korach, 1970a**). L'immunofluorescence indirecte, utilisant un sérum anti-FII monospécifique, a montré *in situ* que l'antigène spécifique du genre F2 est localisé uniquement dans la région épidermique (cuticulaire) de *F. hepatica* (**Tailliez et Korach, 1970b**).

Très immunogène, la fraction II (FIIp) est hautement spécifique du genre *Fasciola* et ne présente pas de réactions croisées comme l'antigène E.S avec d'autres helminthes. C'est pourquoi, la présence d'anticorps dirigés contre l'antigène FIIp constitue un diagnostic de certitude de la fasciolose humaine. De plus, il est très diffusible, ce qui explique l'apparition précoce et rapide d'anticorps spécifiques qui apparaissent 2 semaines après l'immunisation expérimentale ou l'infestation naturelle (**Levieux et Levieux, 1994**).

Chez des bovins infestés expérimentalement, **Levieux *et al.*, (1992a)**, avec la méthode d'hémagglutination passive utilisant l'antigène F2, a observé une séroconversion au bout de 2 à 4 semaines ; plus précoce que dans la plupart des travaux utilisant l'antigène E.S.

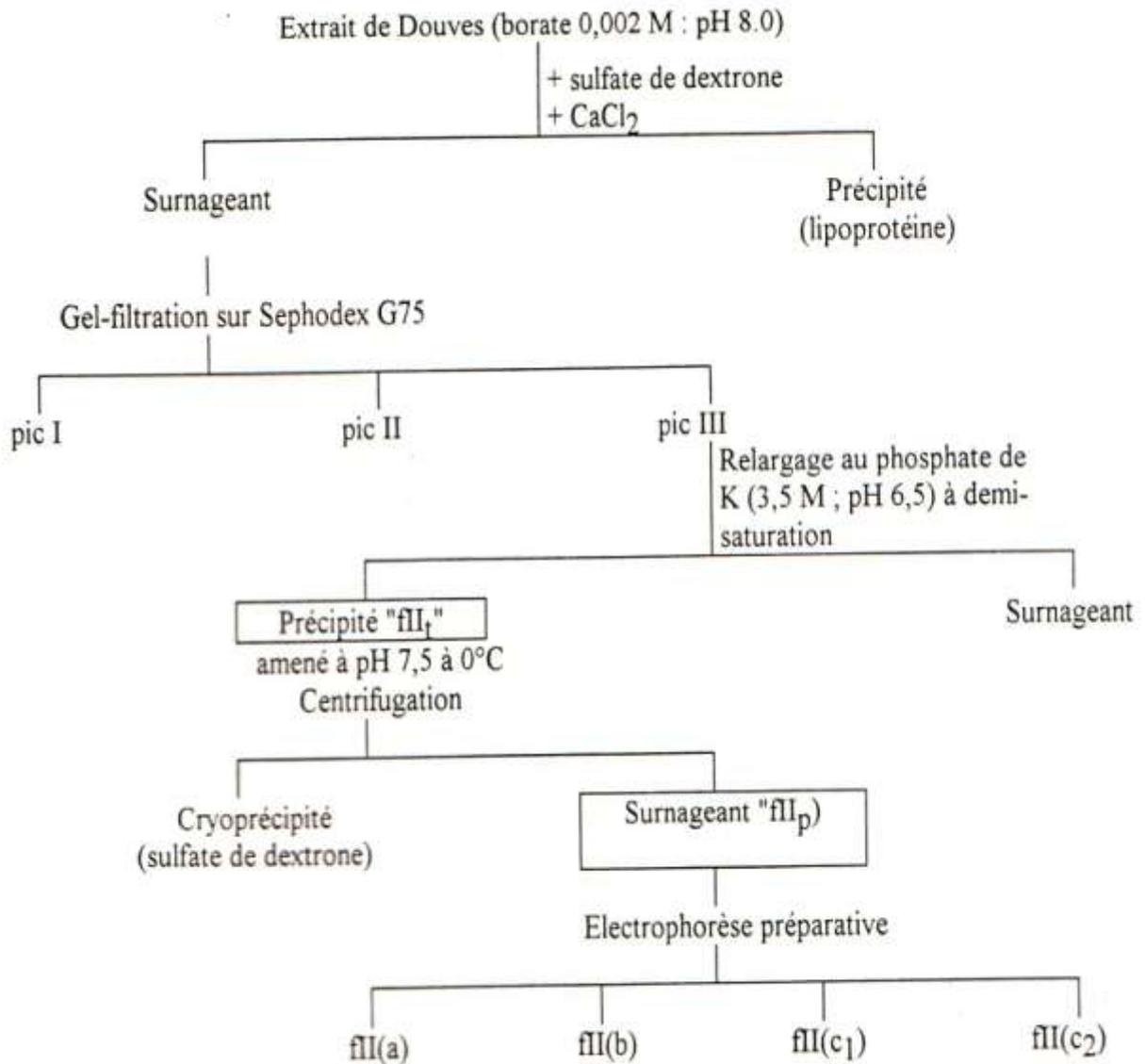


Figure 20 : Schéma de purification de l'antigène spécifique (fII) de *F. hepatica*, d'après Tailliez et Korach (1970a).

1.4. Communautés antigéniques de *F. hepatica*

1.4.1. Avec d'autres helminthes

À plusieurs reprises, **Biguet *et al.* (1962, 1965)** et **Capron *et al.*, (1968)** ont étudié, grâce à l'IEP, les communautés antigéniques entre divers helminthes en déterminant ainsi parmi la mosaïque antigénique, que la moitié des antigènes sont communes chez les cestodes, la quasi-totalité chez les nématodes et le quart environ chez les trématodes (**Biguet *et al.*, 1965**).

La comparaison de l'antigène standard de *F. hepatica*, par l'IEP, aux antigènes standards de divers helminthes (**Tableau 2**) a montré que seules les fractions antigéniques correspondant à l'arc 1, 2, 5, 7, et 14 sont spécifiques du genre *Fasciola*. Les fractions 1, 2, et 7 étant des fractions majeures (**Biguet *et al.*, 1962**). L'analyse immunoélectrophorétique du produit antigénique (P4), obtenu par les mêmes auteurs, a confirmé les parentés antigéniques avec *Echinococcus granulosus* pour la fraction 10, *Schistosoma mansoni* pour la fraction 11 et *Taenia saginata* et *Dicrocoelium lanceolatum* pour la fraction 12.

Tableau 2 : Fractions communes de divers helminthes avec *F. hepatica*
(d'après Biguet *et al.*, 1962).

Antigènes utilisés	Nombre de fractions communes avec <i>F. hepatica</i>	Numéro des fractions communes
- <i>Schistosoma mansoni</i>	3	9 ; 11 ; 13
- <i>Dicrocoelium lanceolatum</i>	3	4 ; 9 ; 12
- <i>Taenia saginata</i>	3	3 ; 9 ; 12
- <i>Onchocerca volvulus</i>	3	6 ; 8 ; 9
- <i>Trichinella spiralis</i>	3	6 ; 8 ; 15
- <i>Ascaris lumbricoïdes</i>	1	6
- <i>Hydatide</i>	1	10

Une analyse immunoélectrophorétique de la fraction E.S de *F. hepatica* et de sept espèces d'helminthes (**Fig. 21**), a révélée de nombreuses réactions croisées (**Biguet et al., 1962**).

F. hepatica possède donc des fractions antigéniques communes à d'autres helminthes responsables de réactions sérologiques croisées. Le diagnostic immunologique montre en pratique des réactions croisées avec *Cysticercus tenuicollis*, *F. gigantica* et agents d'autres distomatoses par hémagglutination passive, ainsi que plus faiblement avec *Schistosoma mansoni*, et avec *Babesia divergens* par ELISA (**Hanna et Hillyer, 1984**).

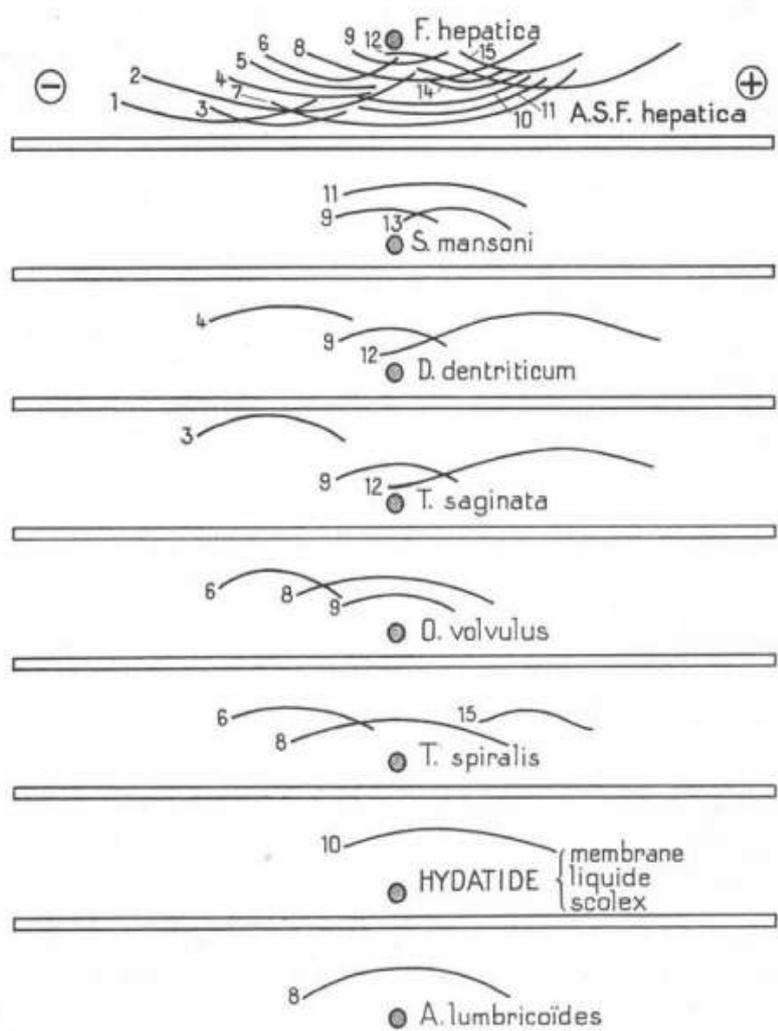


Figure 21 : Analyse immunoélectrophorétique en gélose des antigènes de *F. hepatica* : fraction E.S non purifiée et de sept autres helminthes par un sérum de lapin anti- *F. hepatica*, d'après Biguet et al. (1962).

1.4.2. Avec ses hôtes définitifs

Cette communauté d'antigènes n'est pas due aux souillures par le sang ou les débris tissulaires de l'hôte car elle ne concerne pas uniquement l'espèce-hôte sur laquelle les douves ont été prélevées pour extraire l'antigène, mais aussi d'autres espèces animales ; sur les 6 fractions communes à *F. hepatica*, aux bovins et aux ovins, 4 fractions sont communes au bœuf et au mouton. Ceci peut expliquer la diminution de la sollicitation de l'hôte à élaborer des anticorps et les résultats décevants des tentatives d'immunisation contre *F. hepatica* (**Capron et al., 1968**).

En outre, comme la plupart des antigènes helminthiques, celui de *F. hepatica* renferme une quantité importante d'un polyside, la substance C. Elle s'unit à la protéine C qui apparaît précocement (1^{ère} SPI) dans le sérum des individus atteints d'helminthoses y compris la fasciolose, donnant un précipité lors des réactions de précipitation d'où les fausses réactions positives (**Biguet et al., 1965**).

2. Immunité anti- *F. hepatica*

La réponse immunitaire à *F. hepatica* diffère d'un hôte à l'autre, les ovins étant sensibles, et les rats ou les bovins des hôtes résistants. Indépendamment des variations spécifiques de résistance, les animaux infestés développent toujours une réponse humorale dirigée contre des antigènes tégumentaires ou d'origine caecale. Cependant, la cinétique de reconnaissance de divers extraits antigéniques parasites dépend de l'étape du cycle parasitaire. Après une infestation expérimentale, le rat et le bovin développent une réponse immunitaire cellulaire précoce spécifique de *F. hepatica* (**Chauvin, 1994**).

2.1. Réponse immunitaire humorale

Depuis l'utilisation des PES F_h comme antigène de diagnostic, la réponse humorale anti-PES de douves adultes a fait l'objet de plusieurs travaux qui ont montré qu'elle est précoce ; l'augmentation du taux d'anticorps spécifiques est détectée à partir de la 2^{ème} ou la 3^{ème} SPI (**Zimmermann et al., 1982; Oldham, 1983; Boulard et al., 1985; Santiago et Hillyer 1986; Poitou et al., 1992**). De plus, elle démontre l'existence d'une communauté antigénique entre les douves juvéniles et adultes (**Chauvin et al., 1995**).

Aussi, les différentes études des isotypes d'immunoglobulines spécifiques des PES ont révélés que, durant la migration intra-hépatique des formes immatures de *F. hepatica*, les IgM restent élevés (**Wedrychowicz et Turner, 1987; Poitou et al., 1993; Chauvin et al., 1995**). Chez le rat infesté, les titres des IgM, IgG1, IgG2a et IgE sont élevés avec une augmentation

importante et précoce des IgG1, les IgG2a étant plus tardives. Une réponse IgE a été mise en évidence durant la migration des douves immatures dans le parenchyme hépatique (**Pfister, 1984; Poitou et al., 1993**). La réponse humorale spécifique est détectée dès la 2^{ème} SPI, mais elle n'est pas suffisante pour garantir une protection de l'hôte (**Baeza, 1992**).

Chez le mouton infesté, les anticorps spécifiques, principalement des IgG, sont détectés à partir de la 2^{ème} ou la 3^{ème} SPI ; la différence est significative à partir de la 3^{ème} semaine puis le taux d'anticorps augmente rapidement jusqu'à la 6^{ème} semaine et reste élevé plusieurs semaines (**Chauvin et al., 1995**). En revanche, **Clery et al. (1996)** ont observé, chez le bovin infesté, une prédominance des IgG1 qui augmentent entre la 8^{ème} et la 10^{ème} SPI par rapport aux IgG2.

2.2. La réponse immunitaire cellulaire

Chez différents hôtes de *F. hepatica*, une leucocytose d'apparition rapide est observée suite à l'infestation (**Furmaga et al., 1983; Poitou et al., 1993; Chauvin, 1994**). Elle semble induite par les jeunes douves en migration ; chez les ovins, le nombre de leucocytes circulants diminuent après la 10^{ème} SPI (**Chauvin, 1994**) et après la 8^{ème} SPI chez le rat (**Poitou et al., 1993**); périodes correspondant à la maturation des douves. **Furmaga et al. (1975)** ont observés une diminution du nombre de lymphocytes et une neutrophilie chez des animaux massivement infestés. Cette neutrophilie est aussi observée chez le rat (**Poitou et al., 1993**) et le bovin (**Furmaga et al., 1983**).

Une éosinophilie sanguine biphasique, avec un pic précoce à la 5^{ème} SPI et un second tardif à la 9^{ème} voire la 11^{ème} SPI, est observée chez les ovins, les bovins, les lapins et les rats (**Furmaga et al., 1983; Poitou et al., 1993; Chauvin, 1994**).

L'étude de la capacité des lymphocytes circulants à proliférer est réalisée par **Oldham (1985)**, après stimulation in vitro par un extrait total de douves, durant les 14 premières semaines après une infestation expérimentale chez le bovin. Une réponse lymphocytaire antigène-spécifique transitoire est mise en évidence à la 2^{ème} SPI, indiquant la présence de lymphocytes spécifiques de *F. hepatica* dans le sang.

Chez le rat infesté expérimentalement, l'aptitude des lymphocytes de la rate à proliférer en présence d'extrait total de douves (**Oldham, 1985**) ou des PESFh (**Poitou et al., 1992**) est mise en évidence. La cinétique de la réponse lymphocytaire antigène-spécifique montre une phase initiale d'activation dès la 2^{ème} SPI. **Poitou et al. (1992)** ont observé une seconde phase

de réponse attribuée à la libération séquentielle des antigènes excrétés-sécrétés par le parasite. Par ailleurs, les mêmes auteurs, observent une activation transitoire synchrone des splénocytes vis-à-vis des PES*Fh* et de la ConA.

Chez le mouton (hôte sensible) infesté par *F. hepatica*, **Zimmerman et al. (1983)** décrivent une immunosuppression de la lymphoprolifération, après une activation de ces cellules par les mitogènes. D'après l'étude de **Chauvin (1994)** suite à une primo-infestation expérimentale chez l'ovine, la réponse lympho-proliférative PES*Fh*-spécifique est augmentée entre la 2^{ème} et la 5^{ème} SPI. A partir de la 7^{ème} SPI, des vagues de stimulations sont observées. Par contre, une inhibition de la capacité des lymphocytes à proliférer en présence de la ConA est observée. Après une réinfestation expérimentale à la 6^{ème} SPI, la réponse immunitaire cellulaire PES*Fh*-spécifique est plus faible et plus courte qu'une réponse de primo-infestation, alors que la capacité de lymphoprolifération à la ConA est transitoirement augmentée, suggérant la mise en place d'un mécanisme immunologique, induit par le parasite, qui module la réponse immunitaire cellulaire vers une voie non protectrice.

Une stimulation de la réponse proliférative des lymphocytes circulants aux antigènes de douves adultes, en 2^{ème} SPI est décrite chez le bovin (hôte peu permissif) infesté par *F. hepatica* (**Oldham, 1985**).

2.3. Mécanismes effecteurs de l'immunité anti- *F. hepatica*

F. hepatica, tout au long de son évolution chez l'hôte définitif, se trouve au contact de divers tissus et organes au sein desquels se développent les mécanismes effecteurs de l'immunité. Dès que le parasite pénètre dans l'organisme hôte, l'interaction hôte-parasite commence ; le système immunitaire de l'hôte réagit pour éliminer le parasite qui déploie tous les mécanismes qui lui permettent de s'évader des réactions du système immunitaire.

2.3.1. Réactions locales à l'infestation par *F. hepatica*

Les jeunes douves entament leur migration en traversant la muqueuse intestinale en premier. Chez le bovin et le rat qui sont des hôtes résistants, une forte infiltration de la muqueuse intestinale par des mastocytes et des granulocytes éosinophiles est observée après une primo-infestation expérimentale (**Charbon et al., 1991; Wicki et al., 1991**). Le nombre des éosinophiles augmente fortement dès la 1^{ère} semaine post-réinfestation chez le bovin (**Wicki et al., 1991**). Après une primo-infestation chez le rat, le recrutement des éosinophiles

persiste durant au moins 17 semaines (**Charbon et al., 1991**) et lors de réinfestation, l'infiltration de la muqueuse par les éosinophiles est importante (**Doy et Hughes, 1982; Van Milligen et al., 1998**).

Les douves juvéniles cheminent par la cavité péritonéale pour gagner le foie. Les douves excystées *in vitro* et implantées dans la cavité péritonéale de rats préalablement infestés, sont aussitôt couvertes par des cellules inflammatoires dont les éosinophiles sont les plus nombreux, en plus des neutrophiles et des macrophages, les mastocytes sont précoces et transitoires pendant les 5 premières minutes (**Davies et Goose, 1981**).

Lors de leur migration intra-parenchymateuse, les douves immatures causent des lésions d'hépatite traumatique. Elles s'organisent autour d'une zone nécrotique constituées de cellules inflammatoires, essentiellement des macrophages, des lymphocytes et des granulocytes éosinophiles, qui forment un granulome. Les mêmes cellules infiltrent les espaces portes qui sont leurs voies d'entrée dans le parenchyme hépatique à partir de la circulation sanguine. Chez le bovin, les granulocytes neutrophiles et les lymphocytes sont recrutés 7 jours post-infestation (JPI), les éosinophiles apparaissent à partir de la 2^{ème} SAI (**Doy et Hughes, 1984**). Chez le mouton, l'afflux en grand nombre des éosinophiles est observé ; à la périphérie et au centre nécrotique de la lésion granulomateuse, à la 2^{ème} SAI. De plus, les éosinophiles sont observés dans l'infiltrat inflammatoire situé autour des douves immatures en migration (**Chauvin et al., 2001**). Par ailleurs, la sous-population lymphocytaire majoritaire est constituée de lymphocytes TCD₄⁺ qui sont précocement recrutés dès la 2^{ème} SAI. A partir de la 6^{ème} SAI, des follicules lymphoïdes se développent dans les espaces portes ; ils sont constitués de lymphocytes B centraux entourés par des lymphocytes T helper CD₄⁺ (**Chauvin et al., 1995**).

2.3.2. Mécanismes destructeurs anti- *F. hepatica*

2.3.2.1. Destruction par les macrophages

La destruction des schistosomes par les macrophages est décrite par **Sher et al., (1982)**. Activés par l'IFN- γ , les macrophages produisent du monoxyde d'azote (NO[•]) qui est toxique pour les parasites. Chez le rat infesté, une augmentation de la production du NO[•], au 7^{ème} JPI, par les macrophages péritonéaux entraîne la destruction des douves juvéniles *in vitro* (**Sibille et al., 2004**). **Piedrafita et al. (2000)** ont démontré que chez le mouton infesté, la destruction des douves juvéniles n'est pas due au monoxyde d'azote, mais elle est plutôt médiée par l'ion superoxyde.

Récemment, il a été rapporté que les formes juveniles de *F. hepatica* nouvellement excystées (FhNEJs) expriment une molécule appartenant aux facteurs de croissance TGF- β , désignée TLM (TGF Like Molecule), qui aide les jeunes douves dans leur évasion de la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) en réduisant la réponse NO cytotoxique des nouveaux macrophages dépendant de la TGF- β RI kinase (Japa *et al.*, 2015; Sulaiman *et al.*, 2016).

2.3.2.2. Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps

Etudié *in vitro*, l'ADCC permet la destruction du parasite en présence d'anticorps et de cellules effectrices (macrophages, plaquettes ou granulocytes éosinophiles) qui adhèrent au parasite par l'intermédiaire des IgE, des IgG (IgG2a qui interviennent plus précocement que les IgE) ou la fraction C3b du complément qui potentialise l'effet des immunoglobulines. L'activation des éosinophiles provoque la fusion des granulations à la membrane cellulaire et la libération de substances toxiques pour le parasite (Major Basic Protein (MBP), Eosinophil Cationic Protein (ECP), Eosinophil Peroxydase (EPO), Radicaux Oxygénés Intermédiaires (ROI)) (Maizels *et al.*, 1993).

Les éosinophiles semblent adhérer aux douves en présence de sérum immun (Doy *et al.*, 1980). Cependant, à la différence du modèle schistosome, le complément ne semble pas associé à cette adhésion ; en effet, les douves immatures ne sont pas marquées par un anti-C3 (Davies et Goose, 1981). La MBP des éosinophiles de bovins présente une forte activité létale pour les douves immatures (Duffus *et al.*, 1980). Selon Chauvin *et al.* (1995), divers éléments plaident pour l'existence d'un tel mécanisme au cours de la fasciolose. Ainsi, chez le bovin, un taux élevé d'anticorps homocytotropes est observé lors de l'élimination spontanée des parasites 20 à 28 SAI. Par ailleurs, chez le rat, une augmentation biphasique des IgE spécifiques de *F. hepatica*, synchrone de l'éosinophilie périphérique est observée (Pfister *et al.*, 1983; Poitou *et al.*, 1993). Toutefois, le rôle d'ADCC dans la défense anti- *F. hepatica* ne semble pas s'exprimer ou aboutir à un phénomène de protection, étant donné les divers mécanismes d'échappement potentiels de *F. hepatica*.

2.3.3. Mécanismes d'échappement de *F. hepatica*

Comme tous les parasites, *F. hepatica* développe plusieurs mécanismes d'évasion au système de défense de l'hôte, pour assurer sa survie et la pérennité de l'espèce (Fig. 22).

2.3.3.1. Renouvellement et variation antigénique

Au cours de la migration de *F. hepatica*, grâce aux granules sécrétoires T0 et T1 qui sont de même nature antigénique, puis T2 qui sont antigéniquement différents, le glycocalyx externe se renouvelle plusieurs fois. Ceci est à l'origine de la formation d'un précipité de complexes immuns à la surface des douves immatures (**Hanna, 1980a; Glauert et al., 1985**) qui permet à la douve d'échapper aux systèmes de reconnaissance de l'hôte et donc, à la réaction d'ADCC. En outre, **Glauert et al. (1985)** ont observé que les éosinophiles de bovins n'adhèrent aux douves immatures que dans les zones libres de précipité de complexes immuns.

2.3.3.2. Clivage des immunoglobulines

Des enzymes protéolytiques présentes dans les PES*Fh* sont capables de cliver les immunoglobulines. Chez le stade immature, une cathepsine B- like clive *in vitro* les immunoglobulines de souris, rats, lapins et moutons (**Chapman et Mitchell, 1982**). **Wilson et al. (1997)** ont identifiés dans les PES des douves juvéniles une cathepsine B qui clive les immunoglobulines. Une cystéine-protéase cathepsine L-like identifiée dans les PES*Fh* des douves adultes clivent les immunoglobulines *in vitro* (**Smith et al., 1993**) et inhibe *in vitro* l'adhésion des éosinophiles sur des douves immatures en présence de sérum immun (**Carmona et al., 1994**). **Hewitt et al. (1995)** ont démontré que les cathepsines L sont capables de cliver le CD23; un récepteur de faible affinité pour l'IgE à la surface des neutrophiles, des lymphocytes, des macrophages, des éosinophiles et des plaquettes.

2.3.3.3. Anticorps bloquants

Une inhibition des mécanismes potentiels d'ADCC impliquant les granulocytes éosinophiles pourrait être provoquée par la synthèse d'anticorps bloquants, notamment d'isotype M. En effet, la forte production d'IgM observée au cours de la fasciolose pourrait être impliquée dans un tel mécanisme d'évasion malgré la forte réponse éosinophilique. De plus, un dépôt d'IgM est observé à la surface des douves immatures en migration dans le parenchyme hépatique (**Chauvin et al., 1995; Tliba et al., 2000**). L'observation par **Glauert et al. (1985)** de l'absence de cytotoxicité des éosinophiles sur des douves immatures couvertes d'immunoglobulines bovines spécifiques ne peut que renforcer cette hypothèse. Un dépôt préférentiel d'IgM expliquerait ce phénomène, les anticorps impliqués *in vitro* dans les mécanismes d'ADCC médiés par les éosinophiles, notamment dans le modèle schistosome (**Capron et al., 1987**), étant soit des IgE soit des IgG2a.

2.3.3.4. Activation polyclonale

Pfister *et al.* (1983) ont décrit chez le rat une activation polyclonale de la sécrétion d'IgE qui est un aspect très commun des parasitoses, ayant comme effet l'épuisement du système immunitaire en brouillant la réponse spécifique (**Roitt *et al.*, 1986**).

2.3.3.5. Échappement à l'action du complément

Duffus *et al.* (1980) ont démontré un renouvellement rapide du glycocalyx des juvéniles lors d'incubation dans l'immun sérum de bovin, suggérant la possibilité d'un échappement du parasite à l'action du complément grâce à ce mécanisme. Selon l'étude de **Baeza (1992)**, *F. hepatica* est capable de se protéger de l'activité hémolytique du complément car elle inactive les premières étapes de la cascade de la voie classique. Aussi, la richesse du glycocalyx en acide sialique inhibe l'activation de la voie alterne du complément.

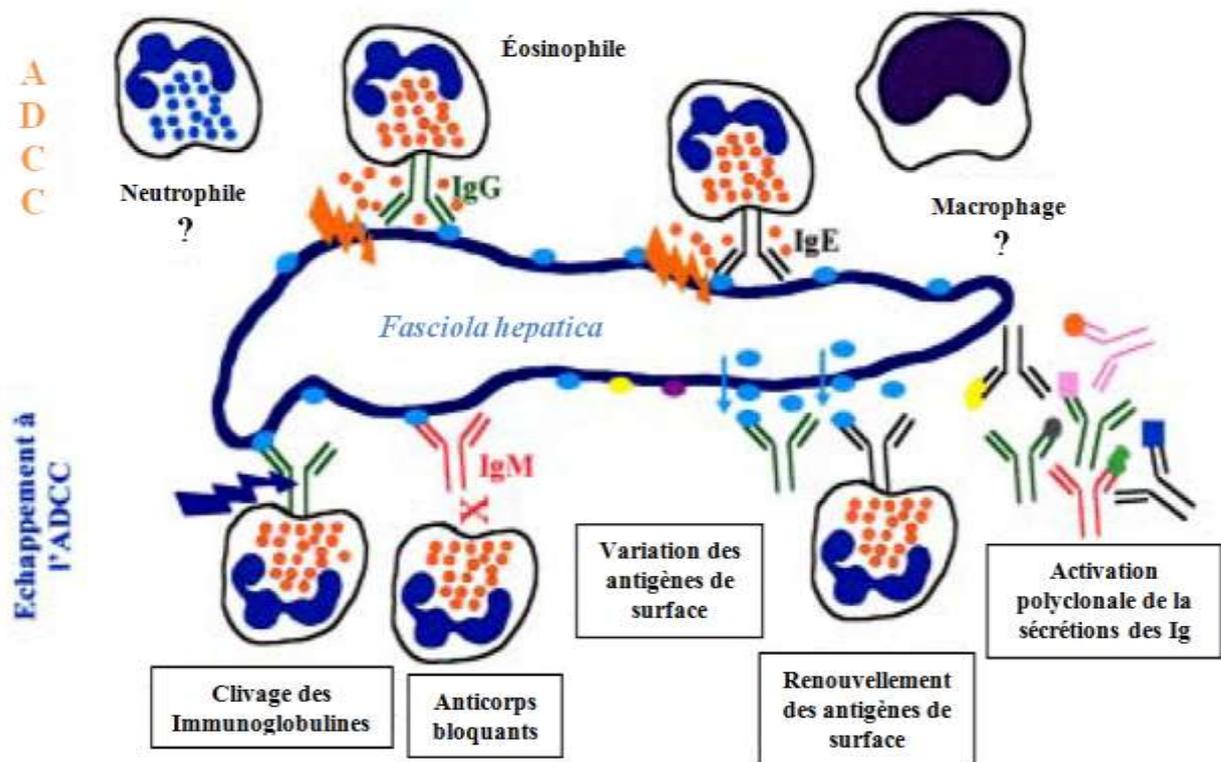


Figure 22 : Réaction d'ADCC et mécanismes d'échappement de *F. hepatica* (d'après Moreau, 1997).

TROISIÈME CHAPITRE : DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DE LA FASCIULOSE À *F. HEPATICA* ET PROPHYLAXIE MÉDICALE.

1. Méthodes de diagnostic immunologique

1.1. Détection des anticorps circulants

L'augmentation de la fréquence de la fasciolose animale et humaine dans les régions endémiques, la symptomatologie très polymorphe, parfois atypique, le souci de poser pour des raisons thérapeutiques un diagnostic fiable, justifient la mise au point de techniques d'immunodiagnostic sensibles et spécifiques pour le dépistage sérologique précoce de cette maladie.

La recherche des anticorps sériques et l'exploration de l'immunité cellulaire et humorale anti- *F. hepatica* peuvent être réalisées selon de nombreuses techniques.

1.1.1. Réaction de fixation du complément

La R.F.C. a été utilisée pour la première fois par Servantie en 1929 dans le diagnostic de la distomatose humaine selon une technique inspirée de celle appliquée par Kolmer pour le diagnostic de la syphilis.

Son principe repose sur la mise en évidence quantitative d'anticorps, classe ou sous-classe IgM, IgG1 et IgG3, fixant le complément par interaction avec un antigène délipidé de *F. hepatica* (**Pautrizel et al., 1963**).

La technique peut être décrite comme constituée de deux phases. Dans la 1^{ère} phase a lieu la réaction de l'antigène avec les anticorps éventuellement présents dans le sérum à analyser. Le complément, préalablement ajouté, est alors fixé. La 2^{ème} phase correspond à l'addition d'un système révélateur, nommé système hémolytique, composé par des immuno-complexes d'hématies de mouton et d'anticorps homologues (**Regalla, 1995**). Le résultat est donné par la plus forte dilution de sérum donnant une hémolyse totale à 50%. Comme la technique est standardisée, un taux supérieur ou égal à une dilution 1/4 est considéré comme positif (**Pautrizel et al., 1963**). Le principe de la RFC est résumé dans la **figure 23**.

Au cours d'une étude réalisée par **Capron et al. (1970)**, la sensibilité de la RFC (89%) était presque de la même grandeur que celles des autres tests sérologiques majeurs : Immunofluorescence (92%) et Immunoélectrophorèse (96%).

Bien qu'elle ait été améliorée par la mise au point d'un antigène délipidé, cette technique semble être délicate quant à sa mise en œuvre en parasitologie vétérinaire en raison du coût relatif à la purification et au titrage de l'antigène utilisé. De plus, elle manque de spécificité à cause des réactions croisées avec les antigènes des parasites agents de l'ascaridiose, l'hydatidose et des bilharzioses, qui seraient dues à la présence de la substance P1 ou d'une substance "P1 like" dans les produits de *F. hepatica* et les autres helminthiases (El-Mohtarim, 2016).

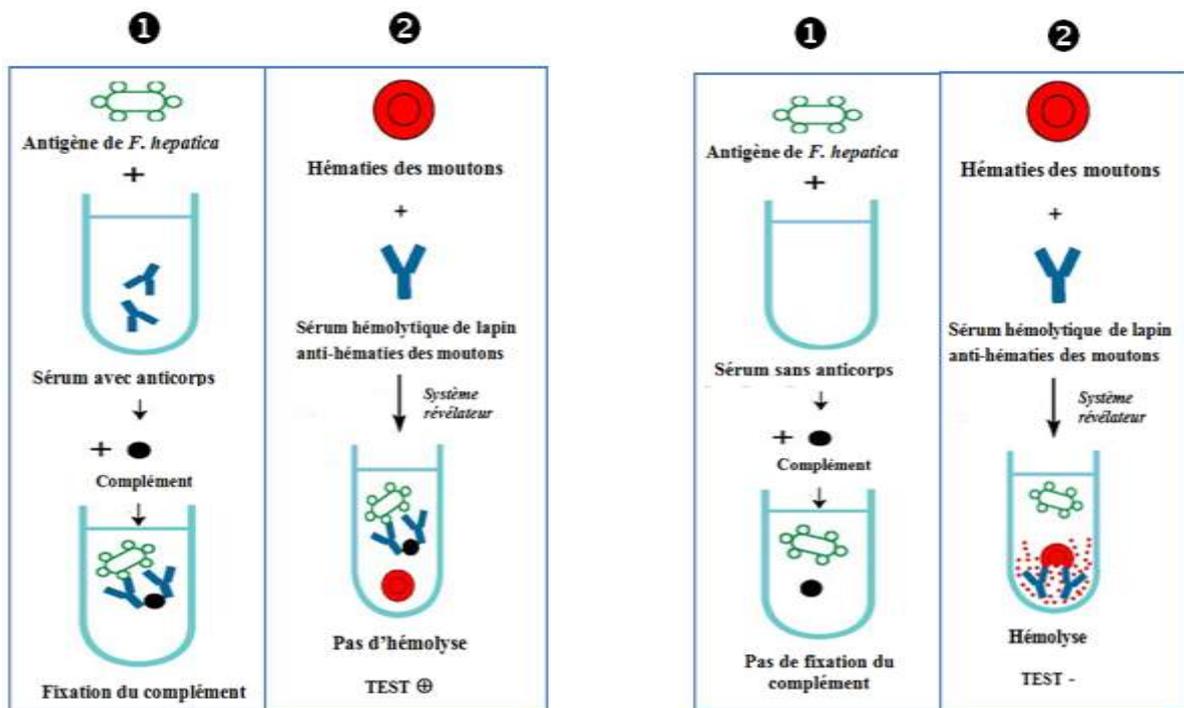


Figure 23 : Principe de la réaction de fixation du complément [4] (modifié et complété).

1.1.2. Immunofluorescence indirecte (I.F.I)

Mise au point en 1954 par Weller et Coons, la technique d'I.F.I permet de révéler à l'aide d'un sérum anti-espèce conjugué à un fluorochrome la présence d'anticorps fixés à des antigènes de *F. hepatica* constitués généralement par des coupes histologiques à congélation de la cuticule ou les zones musculaires qui entourent l'utérus et les glandes vitellogènes du parasite (Benex, 1972).

L'IFI comporte essentiellement deux phases: la première phase consiste à mettre en contact l'antigène et le sérum suspect. Si celui-ci contient des anticorps spécifiques, ils se

fixent sur les sites antigéniques. Les molécules non fixées sur l'antigène sont éliminées par lavage. La seconde phase consiste à la détection des globulines fixées sur l'antigène par l'action d'un conjugué fluorescent antiglobulines de l'espèce ayant fourni le sérum suspect. L'excès de conjugué est éliminé par lavage. Observé au microscope à fluorescence, le complexe antigène-anticorps apparaît fluorescent si le sérum contenait des anticorps spécifiques et non fluorescent dans le cas contraire. Les résultats sont exprimés par le taux de la plus grande dilution du sérum pour laquelle on observe encore une fluorescence spécifique. Lorsqu'un sérum donne des réactions douteuses à plusieurs dilutions successives, il est considéré comme positif à la 1^{ère} de ces dilutions et négatif pour les suivantes (**Belkaid et al., 1988**). Le principe de l'IFI est illustré par **la figure 24**.

L'intérêt de la réaction d'IFI pour le diagnostic de la fasciolose chez de nombreuses espèces animales a été suffisamment souligné par plusieurs auteurs (**Jemli et al., 1987; Tello et al., 1988; Abdul-Fattah et al., 1992**).

Outre son utilisation dans le diagnostic sérologique, cette technique a permis de déterminer, de manière précise, la localisation et la distribution de certaines protéines squelettiques dans les différents compartiments tissulaires chez la forme adulte de *F. hepatica*, comme par exemple l'actine dans la musculature sous-tégumentale et intestinale, les testicules, les glandes vitellogènes et les épines tégumentales en utilisant des anticorps monoclonaux anti-actine (**Stitt et al., 1992a**), et la tubuline dans le syncytium tégumental et les corps cellulaires tégumentaux et leurs connexions cytoplasmiques avec le syncytium de surface grâce à l'emploi d'anticorps dirigés contre la β - tubuline (**Stitt et al., 1992b**). Des études d'immunolocalisations histologiques ont été également menées à l'aide de la réaction d'IFI et d'anticorps monoclonaux spécifiques afin de déceler au sein des différents tissus de *F. hepatica* d'enzymes à activités antigéniques, exemples la GST localisée dans l'épithélium intestinal et la région subtégumentaire du parasite (**Creaney et al., 1995**), la TrxR dans des cellules parenchymateuses et les testicules (**Maggioli et al., 2004**) et la SAP2 dans les cellules épithéliales de l'intestin et la partie externe du tégument (**Cabán-Hernández et al., 2013**).

Cette méthode quantitative présente plusieurs avantages: elle est rapide, sensible, facile d'exécution et précoce; l'étude cinétique des anticorps fluorescents à l'occasion d'infestations expérimentales par *F. hepatica* a montré que le diagnostic des bovins infestés est possible dès la 2^{ème} semaine suivant l'infestation, et les réactions sérologiques sont positives dans 95% des cas suspectés en phase d'invasion (**Golvan et Ambroise-Thomas, 1984; Espinasse, 2006**).

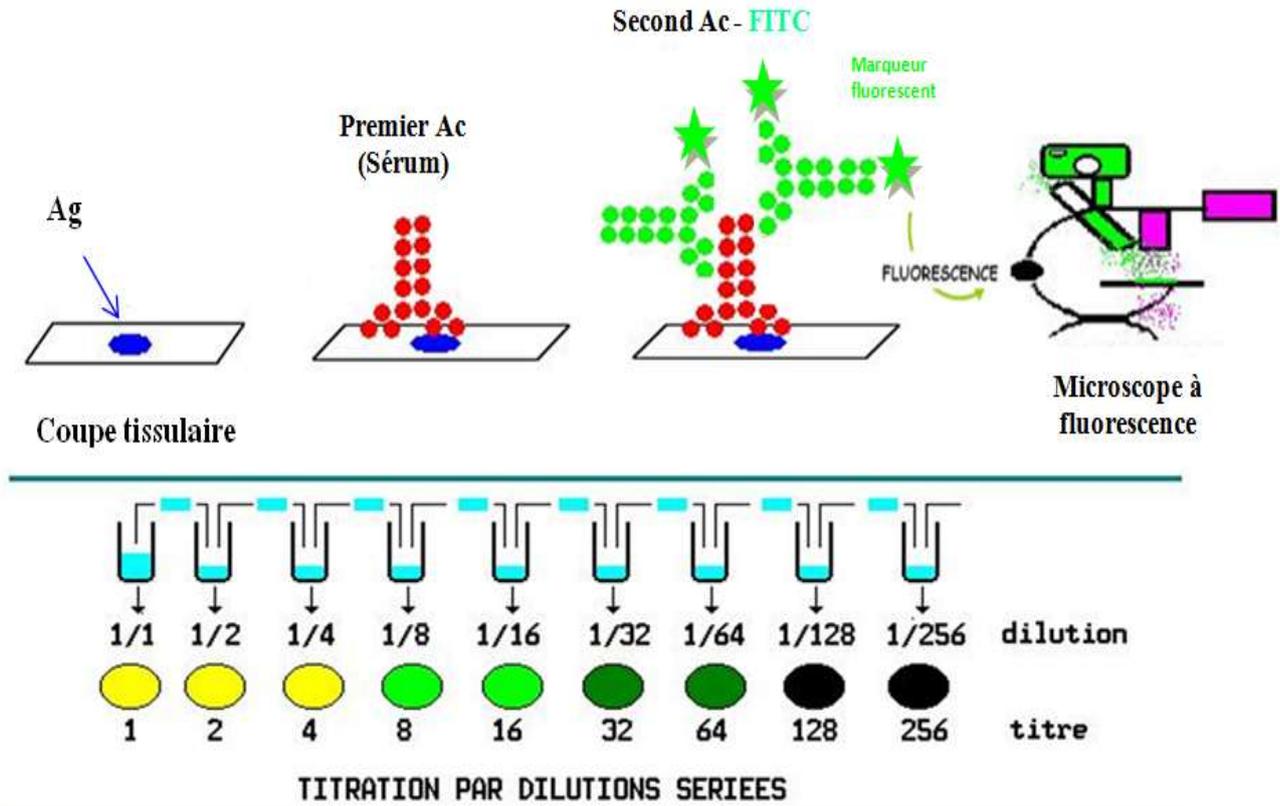


Figure 24 : Principe de l'immunofluorescence indirecte [5]
(modifié et complété).

En plus, les réactions sérologiques faisant appel aux antigènes figurés, comme c'est le cas de l'IFI, sont facilement reproductibles et économiques, le matériel antigénique servant de réactifs étant facilement disponibles. Elles révèlent directement les sites antigéniques de surface qui sont de surcroît les plus spécifiques et les plus actifs (**Ambroise-Thomas, 1979**).

Ces réactions sont par contre difficiles à automatiser, subjectives dans leur lecture (ce caractère peut être éliminé par des procédés de contre coloration) et excluent les antigènes sériques excrétés-sécrétés que l'on peut détecter par exemple par la méthode ELISA. S'ajoute à cela les problèmes de spécificité dont les causes sont multiples: autofluorescence tissulaire, présence de fluorochrome libre ou d'impuretés dans le fluorochrome réactif, effet de charge, communautés antigéniques et fixation d'anticorps nos spécifiques. Toutefois, ces causes d'erreurs peuvent être réduites par l'utilisation, lors de chaque lecture, de témoins (témoin sérum négatif, témoin sérum positif et témoin conjugué) (**Ambroise-Thomas, 1979; Golvan et Ambroise-Thomas, 1984**).

1.1.3. Hémagglutination indirecte (H.A.I)

Le principe de la technique d'H.A.I repose sur la mise en présence diverses dilutions des sérums étudiés et des hématies jouant le rôle de particules inertes à la surface desquelles sont fixés des antigènes parasitaires solubles. Des anticorps sériques dits agglutinines, reconnaissent spécifiquement des motifs antigéniques portés par ces hématies. La neutralisation de celles-ci par les anticorps se traduit macroscopiquement par une agglutination visible à l'œil nu (**Golvan et Ambroise-Thomas, 1984; Coombs *et al.*, 1987**). Le principe de cette technique est décrit en **figure 25**.

La préparation des globules rouges (G.R) sensibilisés est décrite par **Triboulet *et al.* (1969)** comme suivant : L'antigène utilisé est un extrait de *F. hepatica* délipidé. La sensibilisation est réalisée en milieu tamponné à pH 7,2 en mélangeant des G.R de moutons formolés, la solution antigénique et une solution aqueuse à 2,5% de l'agent de couplage, le glutaraldéhyde. Après 1 h d'incubation au bain-marie à 56°C, les G.R sont lavés en tampon phosphaté à pH 7,2 puis remis en suspension dans un sérum de lapin dilué.

La réaction proprement dite s'effectue dans des alvéoles de plaques en plastique. A chaque dilution du sérum étudié déposé dans un alvéole (0,5 ml), on ajoute une quantité fixe (0,1 ml) de suspension des G.R sensibilisés. A chaque série de dilutions d'un sérum à étudier est ajouté un témoin antigène où le sérum est remplacé par le diluant seul; de même un témoin sérum comportant des G.R du même lot, non sensibilisés par l'antigène, vérifie l'absence d'agglutinines anti-hématies de mouton dans le sérum. Un sérum négatif donne un sidément compact de globules qui se rassemblent au centre de la cupule. Un sérum est positif quand une nappe diffuse couvre tout le fond de la cupule (**Belkaid *et al.*, 1988**).

Cette technique quantitative a été mise au point pour la 1^{ère} fois par **Biguet *et al.* (1969)** pour le diagnostic sérologique de la distomatose à *F. hepatica*. Quelques années plus tard, le test d'H.A.I. a été considérablement amélioré par couplage des G.R du mouton ou du lapin avec la fraction purifiée (FIIP) de Tailleux, puis utilisé comme outil de diagnostic spécifique de *F. hepatica* chez les bovins (**Robert *et al.*, 1980**).

De faible coût, facile à exécuter et à interpréter, l'HIA a longtemps été une technique courante pour le sérodiagnostic de la fasciolose ovine (**Jemli *et al.*, 1991; Cornelissen *et al.*, 1992**) et bovine (**Levieux *et al.*, 1992a; Levieux *et al.*, 1992b**), ainsi que pour la

détermination des réactions croisées dues aux communautés antigéniques entre les différentes espèces parasitaires (**Azzab et el-Zayet, 1996**).

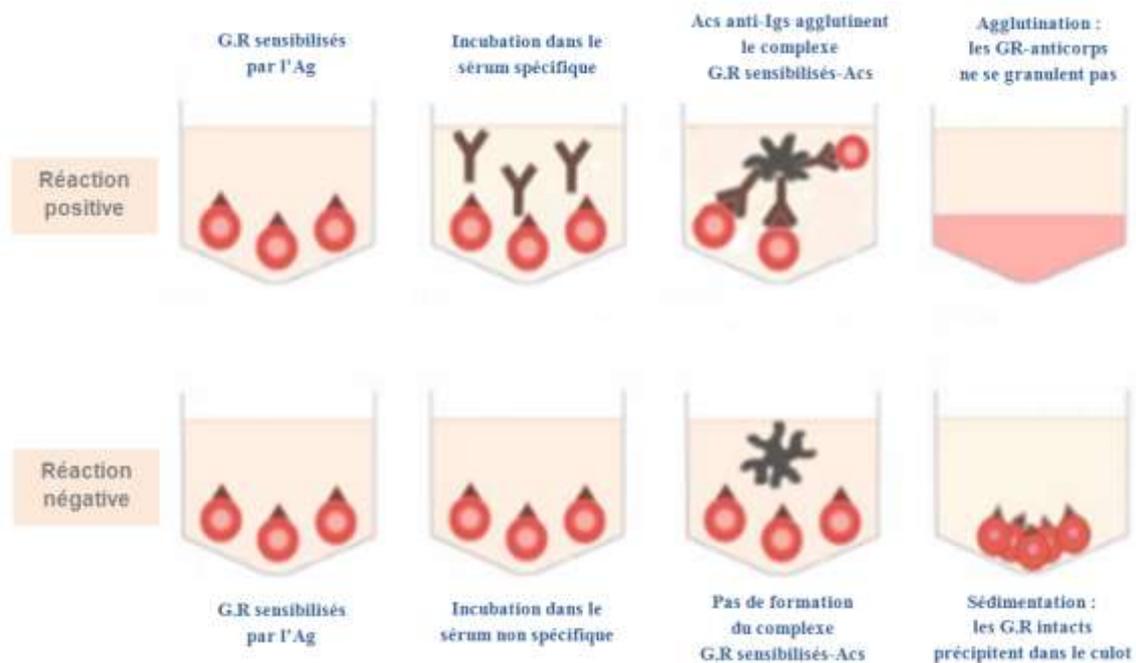


Figure 25 : Principe de l'hémagglutination indirecte [6]
(modifié et complété).

Une variante de cette technique utilisant des particules de latex sur lesquelles sont fixées les fractions antigéniques a également été introduite comme moyen de diagnostic sûr et facilement reproductible tant pour la fasciolose humaine (**Benex, 1964**) que pour la fasciolose animale (**Frick, 1970; Orejarena Avila et al., 2018**) ainsi que d'autres maladies infectieuses chez l'Homme, telles que la leptospirose (**Smits et al., 2000**) et la brucellose (**Abdoel et Smits, 2007**).

D'après **Haroun et Hillyer (1986)**, la sensibilité et la spécificité, enregistrées au cours du diagnostic sérologique de la fasciolose bovine et ovine à l'aide du test d'HAI, étaient supérieures à celles de l'immunodiffusion, mais pas très inférieures à celles de l'immunofluorescence et l'immunoélectrophorèse. Néanmoins, ce test avait une sensibilité analogue du point de vue quantitatif à celle de l'ELISA (95% de positivité pour l'HAI contre 97% pour l'ELISA). Dans le cas de l'HAI, les titres les plus élevés s'observent, dans les sérums des animaux parasités, dès la 3^{ème} semaine suivant l'infestation, alors que l'ELISA permet un diagnostic plus précoce, à partir de la 2^{ème} semaine de l'infestation (**Cornelissen et al., 1992**).

1.1.4. Méthode immunoenzymatique ELISA

L'ELISA est une nouvelle technique de dosage immunologique, mise au point au début des années 80 pour remplacer la RIA. C'est une technique qui entre dans le cadre plus général des tests immuno-enzymatiques ou EIA ("enzyme immunoassays") dans lesquels le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme, par opposition aux tests radio-immunologiques ou RIA ("radio immunoassays") dans lesquels l'anticorps est marqué par un isotope radioactif, d'où l'absence de dangers pratiques dans l'ELISA contrairement à la RIA (**Grange *et al.*, 2014**).

Cette technique consiste à mettre en évidence un composant de la réaction (Ag-Ac) par l'utilisation d'un antiserum (un anticorps) marqué par une enzyme. Cette dernière peut agir sur un substrat pour produire un composé chimique qui sert de signal mesurable par spectrophotométrie. La quantité d'anticorps est déterminée à partir de la mesure de la D.O induite par l'apparition du produit coloré (**Kamoun, 1977; Metais *et al.*, 1990**).

Il existe de nombreuses variantes de l'Elisa, mais la plus couramment employée pour les diagnostics sérologiques est celle dite "en phase hétérogène" ou méthode indirecte pour laquelle des antigènes solubles à l'état brut, standard ou purifié sont adsorbés sur une phase solide constituée par une microplaque à fond en U, généralement en polystyrène.

Cette méthode se déroule en plusieurs étapes (**Fig. 26**) :

- 1- Fixation de l'antigène sur le support inerte ;
- 2- Saturation des sites de fixation et élimination des antigènes en excès par lavage ;
- 3- Réaction antigène-anticorps spécifique ;
- 4- Fixation du conjugué (Ig anti- Ig, marquée par une enzyme) : on utilise fréquemment la peroxydase de Raifort, la phosphatase acide et la β - galactosidase d'*E. Coli*. ;
- 5- Dégradation par l'enzyme d'un substrat incolore en un substrat coloré : lorsque l'enzyme est la peroxydase, le substrat est H_2O_2 . Lorsqu'il s'agit d'une phosphatase, le substrat est le pNPP.
- 6- Lecture de la réaction enzymatique et interprétation des résultats: l'intensité de la coloration est une mesure semi quantitative du taux d'anticorps. Elle est enregistrée par un spectrophotomètre qui effectue une lecture automatisée de la D.O du sérum à tester. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un pourcentage qui correspond au rapport de la D.O de l'échantillon à tester par rapport aux échantillons de contrôle positifs et négatifs de référence.

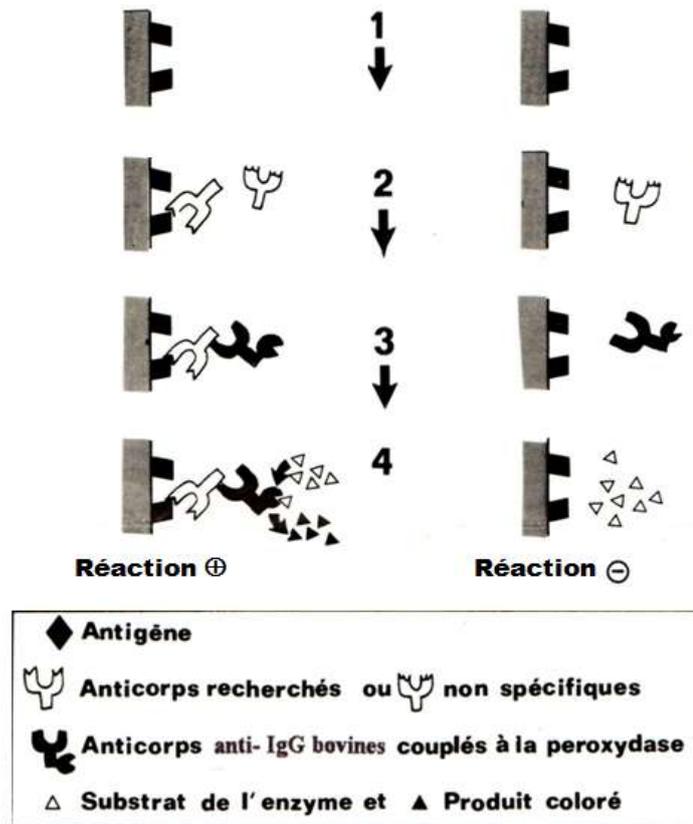


Figure 26 : Principe général de l'ELISA indirect (d'après Milon *et al.*, 1985).

En France, deux types d'antigènes ont été introduits comme réactifs pour l'ELISA indirecte :

- Le 1^{er} a été utilisé par **Boulard *et al.* (1985)** dans un test ELISA sur des échantillons individuels de sérums et de laits de vaches laitières. Il s'agit du produit excrété-sécrété (PES) de douves adultes recueillies en abattoir sur des bovins infestés naturellement par *F. hepatica*.

- Le 2^{ème} a été utilisé par **Pourquier *et al.* (1995)**. Il s'agit d'un antigène spécifique (antigène f2) purifié à partir d'extrait brut de douves adultes, puis intégré par l'institut Pourquier dans un kit ELISA utilisable sur sérums et laits de mélange (laits de tank). L'Ag f2 a été également adapté à l'immunodiagnostic bovine par le test d'HAI (**Levieux *et al.* 1992a; Levieux *et al.* 1992b**). Grâce à la haute spécificité de cet antigène, le seuil de positivité de l'ELISA Pourquier a diminué à 30%, ce qui confère au test une meilleure sensibilité ainsi qu'une bonne cohérence des résultats avec ceux de la dissection des foies en abattoir et des techniques coproscopiques les plus sensibles, qu'ils aient été obtenus sur les sérums individuels ou sur les sérums de mélange (**Rapsch *et al.* 2006**). Ultérieurement, des tests

ELISA standardisés basés sur l'emploi de cathepsines L recombinantes, ont été appliqués comme moyen de diagnostic précis de la fasciolose humaine et animale en Amérique latine (**Carnevale et al., 2001b; Arias et al., 2006; Gonzales Santana et al., 2013**).

L'application du test l'ELISA au dépistage et titrage des anticorps sériques anti- *F. hepatica* a fait l'objet de nombreuses études dont la plupart avaient comme objectif l'évaluation de la sensibilité et la spécificité des différentes techniques ELISA. L'ensemble des travaux menés montrent en général une haute sensibilité et une haute spécificité des techniques ELISA fasciolose (**Tableau 3**).

Les avantages essentiels de la méthode sont sa sensibilité, sa fiabilité et sa reproductibilité. Elle permet en effet de doser des taux d'anticorps dans les sérums testés de l'ordre de 10 à 50 ng/ml selon l'Ag utilisé dans le test ELISA. Actuellement, il existe un test ELISA ultrasensible utilisant des anticorps monoclonaux, capable de détecter des quantités de sous-nanogramme d'antigènes de *F. hepatica* dans les fèces de moutons et de bovins, facilitant ainsi le diagnostic précoce de la fasciolose animale (**Mezo et al., 2003**).

En outre, l'ELISA fait appel à un matériel banal et à des réactifs stables. La quantité d'Ag consommée étant très faible : 3 à 6 µg d'Ag par cupule, avec possibilité de récupérer l'Ag non fixé sur les parois (**Carlier et al., 1979**). Beaucoup plus sensible que l'inspection des foies à l'abattoir et que la coproscopie au laboratoire, l'ELISA indirect est caractérisée selon **Jemli et al. (1987)** par sa supériorité par rapport à l'immunofluorescence indirecte et à l'immunodiffusion en gélose; l'ELISA a permis au cours d'une étude sérologiques effectuée sur des sérums de moutons, la détection d'Acs sériques chez les sujets positifs dès la 2^{ème} semaine post- infestation, alors que l'I.F.I et l'I.D ne sont successivement positives qu'à partir de la 4^{ème} et 5^{ème} SPI. Par ailleurs, en raison de l'automatisation de la méthode ELISA, de la standardisation des réactifs ainsi que de la reproductibilité des résultats, cette méthode est actuellement préférée à celle de l'HAI (**Espinasse, 2006**).

Les inconvénients mentionnés dans la littérature à propos de cette technique, concernent surtout la courbe $[Ac] = f(DO)$ dont le tracé est sigmoïde ne permettant pas d'observer une relation directe que sur sa partie rectiligne centrale (**Carlier et al., 1979; Chauvin, 1994**). En plus, sa spécificité est limitée par les possibles réactions croisées des antigènes ES avec des anticorps induits par des trématodes (*Paramphistomum sp.* et *Dicrocoelium lanceolatum*) autres que *F. hepatica* (**Meissonier et Mage, 2007**).

Tableau 3 : Récapitulation des différentes techniques ELISA utilisées en diagnostic sérologique de la fasciolose et évaluation de leurs sensibilités (Se) et spécificités (Sp).

Moyen de diagnostic	Population examinée	Ag utilisé	Se	Sp	Seuil de positivité	Auteur
ELISA	-92 bovins (inspection des foies à l'abattoir)	Ag ES	86,1%	70%	36%	Doyle, 1972.
ELISA indirect	-88 bovins issus d'une région infestée	Ag ES	96,5%	98,5%	-	Ibbara <i>et al.</i> , 1998.
DIG ELISA	-85 bovins issus d'une région indemne de <i>F. hepatica</i>		97,5%	80%	-	
DOT ELISA			93,1%	95,4%	-	
ELISA	-31 génisses infestées naturellement	AgES	92%	94%	26%	Bossaert <i>et al.</i> , 1999.
ELISA	-2 veaux indemnes, 2 veaux infestés par une dose unique de métacercaires -6 veaux infestés par multiples doses	Ag ES	92%	94%	26%	Bossaert <i>et al.</i> , 2000.
		Ag S	92%	92%	22,5%	
IgG-ELISA	-100 individus présentant des manifestations cliniques de fasciolose	Ag S	100%	96,9%	-	Rokni <i>et al.</i> , 2003.
		CP	100%	98,4%	-	
ELISA	-256 bovins infestés naturellement -256 bovins indemnes -6 veaux expérimentalement infestés	Ag ES	98%	96%	15%	Salimi-Bejestani <i>et al.</i> , 2005.
ELISA	-132 cheptels (1303 génisses infestées ou indemnes)	Ag ES	95%	99%	30%	Alzieu <i>et al.</i> , 2005.
ELISA indirect	-167 bovins infestés naturellement -171 animaux provenant d'une région indemne	Ag f2	98,2%	98,3%	30%	Molloy <i>et al.</i> , 2005.
ELISA indirect	-152 patients atteints de fasciolose chronique et d'autres parasitoses	ferritine (FhFtn-1)	96,6%	95,7%	-	Cában-Hernández <i>et al.</i> , 2015.
		(FhTP16.5)	91,4%	92,4%	-	
ELISA indirect	-15 sérums de patients atteints de fasciolose	Ag S purif. (27 kDa)	100%	93,6%	30%	Shafiei <i>et al.</i> , 2015.
ELISA indirect	-191 sérums humains suspects de fasciolose et autres parasitoses	Peptide1 CL1	100%	87,3%	-	Meshgi <i>et al.</i> , 2018.
ELISA	-30 moutons infestés par <i>F. hepatica</i>	rCL1	100%	97%	-	Mokhtarian <i>et al.</i> , 2018.

1.1.5. Western Blot

Le Western blot (aussi appelé immunotransfert ou immunoblot ou encore immuno-empreinte) est une technique analytique de biologie moléculaire permettant le transfert des molécules séparées depuis un gel d'électrophorèse sur une membrane (**Marouf, 2001**). Il sert à détecter et identifier des protéines spécifiques dans des mélanges complexes (sérum, homogénat cellulaire ou tissulaire) à l'aide d'AcS dirigés contre ces protéines que l'on souhaite détecter. C'est aussi un outil de diagnostic complémentaire pour mettre en évidence des protéines particulières (protéines virales, parasitaires, etc.) présentes dans les sérums de sujets atteints de maladies [7]. Le Western blot permet la caractérisation et la quantification des protéines dans les homogénats de cellules et de tissus. Il permet également la détection d'éventuels processus de modification de la protéine (par ex., la phosphorylation) ou de dégradation (par ex., l'hydrolyse) ou encore d'expression, même à faible quantité (**Martins-Gomes et Silva, 2018**).

Plusieurs étapes sont nécessaires pour la réalisation de cette technique :

- 1- Séparation des protéines antigéniques sur gel de polyacrylamide, en fonction de leur poids moléculaire ;
- 2- Transfert des protéines séparées du gel sur une membrane de nitrocellulose par élution électrophorétique ;
- 3- Traitement de la membrane avec des anticorps, reconnaissant et se fixant à une protéine spécifique ;
- 4- Addition d'un marqueur du complexe Ag-Ac. Le marqueur est souvent un Ac conjugué à une enzyme (ex., la peroxydase) ;
- 5- Coloration par exposition de l'enzyme à son substrat et révélation de la protéine marquée (**Madigan et Martinko, 2007**).

L'immunotransfert a surtout été utilisé pour la détection et l'identification des peptides immunogènes spécifiques du trématode *F. hepatica*. En effet, en analysant des sérums appartenant à des vaches laitières exposées naturellement à l'infestation par *F. hepatica*, dans le but de caractériser les réponses en AcS vis-à-vis de trois préparations antigéniques, **Ortiz et al. (2000)** ont noté que ces vaches ont des anticorps qui reconnaissent un Ag majeur, de 28 kDa, dans les produits excrétés-sécrétés et un autre de 17 kDa dans l'extrait somatique, alors qu'un groupe de protéines de 60-66 kDa apparaît à la fois dans les préparations antigéniques excrétées-sécrétées et de surface. Chez l'Homme, cette technique a également été appliquée, à l'aide d'antigènes ES, pour rechercher des anticorps spécifiques chez les

patients atteints de fasciolose humaine (**Davelois et al., 2016**). À l'issue de leur étude, ces auteurs ont révélé deux glycoprotéines immunodominants, de PM d'environ 17 et 23 kDa, dans les sérums des patients examinés. Le test a détecté la présence d'anticorps avec une sensibilité de 96% et une spécificité de 100%.

Une analyse plus détaillée des antigènes ES de *F. hepatica* a été réalisée auparavant par la technique de Western blot (**Chauvin et al., 1995**). Elle permet d'évaluer qualitativement l'intensité de la réaction immunitaire due à chaque antigène. Parmi les 17 antigènes ES, huit induisent des Acs qui reconnaissent aussi des Ags autres que ceux de *F. hepatica*, chez les moutons infestés expérimentalement. Il s'agit des protéines de 12, 15, 27, 28,5, 30, 41 et 56 kDa. Les réactions les plus constantes concernent la protéine de 28,5 kDa contre laquelle les animaux réagissent spontanément dès le jour de l'ingestion des métacercaires et de manière beaucoup plus intense, à partir de la 6^{ème} ou 7^{ème} SAI.

Le Western blot présente de nombreux avantages par comparaison avec l'électrophorèse PAGE : les membranes de transfert sont plus faciles à manipuler que les gels. Les transferts électrophorétiques sont plus faciles à colorer, nécessitent moins de réactifs, permettent de minimiser le temps de lavage et d'incubation et sont réutilisables plusieurs fois (**Marouf, 2001**). D'autre part, le Western blot dépasse le concept de l'ELISA en permettant la séparation du mélange protéique par taille, charge et/ou conformation. Il permet de détecter plusieurs cibles, contrairement à l'ELISA qui permet de ne déceler qu'une seule protéine [8].

En outre, cette technique permet de réduire considérablement les risques de réactions croisées rencontrés généralement dans les autres techniques sérologiques (ex., I.F.I, H.A.I). De plus, à partir d'une population d'animaux infestés (résultats coproscopiques positifs vis-à-vis de plusieurs helminthes) et indemnes, elle permet de visualiser l'orientation de la réponse immunitaire vers les protéines antigéniques les plus spécifiques de *F. hepatica* (**Sarimehmetoglu, 2002**).

Les inconvénients du Western blot résident dans le fait qu'il est coûteux en temps par rapport à l'ELISA, et requiert une optimisation des conditions expérimentales (par ex., isolation des protéines, tampons utilisés, type de séparation, concentration de gel, etc.) [8]. En outre, il présente une résolution de faible qualité, des bandes parasites, une sensibilité réduite et une mauvaise intégrité des protéines (**Silva et McMahon, 2014**). De ce fait, au cours de la dernière décennie, de nouvelles techniques plus sensibles et automatisées telles que le Western blot à résolution cellulaire unique, l'électrophorèse

capillaire, DigiWest, le transfert de microfluides occidentaux automatisé et l'électrophorèse sur micropuce ont été développées pour réduire les problèmes potentiels associés au Western blot et augmenter les possibilités d'implications cliniques de cette technique (**Mishra *et al.*, 2017**).

1.2. Détection des antigènes circulants

Il s'agit de mettre en évidence des antigènes de *F. hepatica* à l'aide d'antisérums spécifiques. Les procédés de sérodiagnostic exposés précédemment, constituent en fait un excellent moyen pour confirmer la présence de douves adultes, à l'état vivant, dans les canaux biliaires des hôtes atteints de fasciolose. La recherche des Ags s'effectue soit sur le sang (Ags sériques), soit sur des fèces (copro-antigènes).

1.2.1. Les antigènes sériques

Les premiers travaux ayant pour objectif la recherche d'Ags dans le sang de sujets présentant des signes cliniques de fasciolose, reviennent à **Ambroise-Thomas et Desgeorges (1978)** en utilisant une technique immuno-enzymatique directe en sandwich. Puis, **Robert *et al.* (1980)** l'ont appliquée pour la recherche de l'antigène FII de Tailliez dans les fèces de bovins infestés expérimentalement. Les résultats obtenus ont permis alors d'envisager la possibilité de rechercher l'Ag FII dans le sang comme méthode de diagnostic précoce de la fasciolose bovine.

L'ELISA direct en sandwich est une variante de la technique Elisa, qui comme pour l'ELISA indirect, nécessite l'utilisation d'une paire d'Acs qui peuvent être des Acs monoclonaux ou polyclonaux: un dit de capture qui sert à capter l'Ag correspondant dans le sérum, l'autre de détection couplé à une enzyme. Elle est réalisable en quatre étapes (**Fig. 27**):

- 1- fixation de l'Ac spécifique correspondant à l'Ag recherché sur un support inerte ;
- 2- Addition du sérum à tester pour former le complexe (Ac-Ag) ;
- 3- Fixation sur le complexe (Ac-Ag) d'une antiglobuline marquée par une enzyme ;
- 4- Addition du substrat de l'enzyme. Si la réaction est positive (présence d'Ags dans le sérum), le substrat devient coloré et l'appréciation de la coloration est ainsi obtenue.

Peinado Pelaez *et al.* (1988) ont réalisé des électro-immunodiffusion (EID) et des ELISA pour la détection comparée des Ags et des Acs chez des ovins et des caprins. L'EID a donné, respectivement pour les ovins et des caprins, 88,4% et 96,4% de positivité et

l'ELISA 72,6% et 91,8% pour la détection de l'Ag. Selon ces auteurs, la détection des antigènes circulants par ELISA est possible après 48 h et dure jusqu'à 20 j.

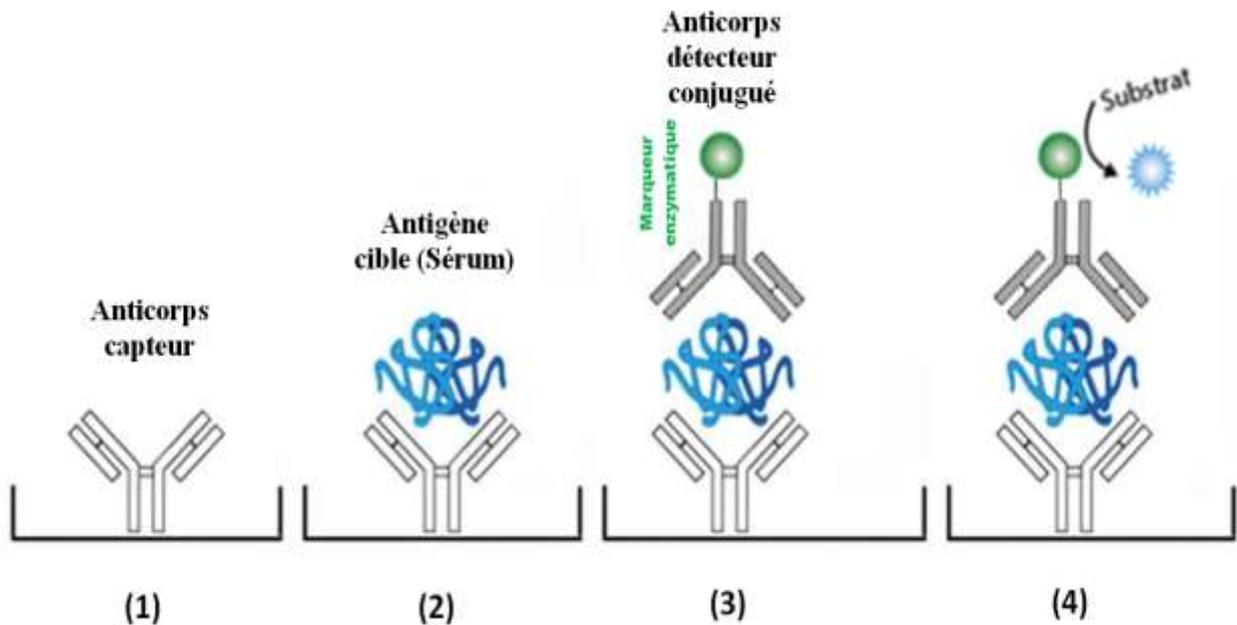


Figure 27 : Principe général de l'ELISA direct en sandwich [9].

Par ailleurs, **Langley et Hillyer (1989)** ont recherché par la méthode ELISA, la présence d'immun-complexes dans le sang sur des bovins infestés par *F. hepatica*. Le test utilise un Ac de lapin hautement spécifique et ayant une forte affinité pour les antigènes sériques ES dans les complexes immuns. Ces derniers sont détectables à leur maximum entre 6 à 8 semaines de l'infestation et déclinent à la 10^{ème} semaine.

En outre, selon **Leclipteux et al., (1998)**, la détection d'antigènes d'ES sanguins chez les bovins infestés par *F. hepatica* débute à partir du 6^{ème} jour après l'infestation et atteint un niveau stable au bout de 13 jours. De même, **Upadhyay et Kumar (2004)** ont montré la précocité des tests de détection des antigènes somatiques ou d'ES et leur intérêt dans le diagnostic précoce de l'infestation fasciolienne chez les veaux. Néanmoins, la détection des antigènes dans le sang reste limitée aux 7 premières SAI, car il se forme par la suite des immuns complexes. En plus, à la fin de la période prépatente, lorsque les douves adultes s'installent dans les canaux biliaires, la circulation des antigènes dans le sang est moindre (**Almazan et al., 2001**).

1.2.2. Les copro-antigènes

Le diagnostic de la fasciolose peut être effectué par examen coproscopique (ou coprologie) qui consiste à rechercher microscopiquement la présence des œufs de *F. hepatica* dans les excréments des animaux parasités. Mais, cette méthode de diagnostic non spécifique demeure plus ou moins limitée car les premiers œufs ne sont détectables qu'à partir du 3^{ème} mois de l'infestation, et ne permet de recenser qu'un faible pourcentage d'animaux infestés, notamment dans les zones de faible prévalence parasitaire, ou en cas de fasciolose chronique (**Pourquier et al., 1995**).

Afin de pallier à ces inconvénients, différents tests ELISA ont été adaptés par plusieurs auteurs comme moyen de diagnostic précoce et précis pour la détection des antigènes présents dans les matières fécales des animaux. **Abdel-Rahman et al. (1998)** ont évalué la détection des copro-antigènes en utilisant une méthode ELISA basé sur des anticorps monoclonaux (AcM) pour la détection d'un copro-antigène de 26 à 28 kDa de *F. hepatica* dans les fèces de bovins infestés. D'après ces auteurs, ce test est plus sensible que le comptage des œufs fécaux (détection des coproantigènes dès la 6^{ème} SAI, c'est à dire avant que les douves ne parviennent à maturité et commencent à pondre ses œufs), rapide, facile à réaliser et se prête bien à un grand nombre d'échantillons.

Dans une étude effectuée par **Estuningsih et al., 2009** sur 150 bovins, à un abattoir de Jakarta (Indonésie), un test ELISA a été développé à l'aide d'AcM dirigés contre les copro-antigènes de type catépsines (CL1). Les résultats obtenus ont montré que la sensibilité et la spécificité de l'ELISA copro-antigène étaient respectivement de l'ordre de 95% et 91%, alors que celles de l'ELISA détectant les Ags sériques étaient par ordre respectif de 91% et 88%, et que l'ELISA copro-antigène a été capable de détecter 100% du bétail avec plus de 15 douves. Toutefois, **Almazan et al. (2001)** en utilisant un test ELISA pour la détection d'antigènes ES dans les sérums et les fèces de moutons infestés expérimentalement, ont noté que la technique de recherche des Ags fécaux est plus tardive que celle de la détection des Ags dans le sang (l'ELISA copro-antigène est positif à la 4^{ème} SAI, alors que l'ELISA antigène sérique à la 1^{ère} SAD).

À l'heure actuelle, l'ELISA copro-antigène est considéré comme un outil sensible et spécifique, approprié à la détermination et le contrôle de l'efficacité des médicaments que l'on utilise habituellement pour traiter l'infestation par *F. hepatica* et vérifier l'échec du traitement

et la pharmaco-résistance en détectant les populations parasitaires adultes ayant survécu à un régime de traitement (**George et al., 2017**).

2. Essais de vaccination contre *F. hepatica*

Deux types de prophylaxie ont été envisagés afin de conférer une protection contre ce parasite chez diverses espèces animales. Il s'agit de l'immunisation passive qui permet de protéger l'animal à l'aide du transfert de sérums immuns ou de cellules lymphoïdes, et l'immunisation active qui correspond à la vaccination.

Depuis plusieurs décennies, la vaccination est considérée comme une stratégie de contrôle alternative souhaitable pour pallier aux inconvénients de la lutte chimique et l'emploi des douvicides pour le traitement des animaux, en raison des risques dus aux résidus chimiques dans les aliments et la présence de populations de parasites résistants aux anthelminthiques (**Overend et Bowen, 1995; Gaasenbeek et al., 2001; Alvarez-Sanchez et al., 2006; Kelley et al., 2016**).

Les tentatives de vaccination contre *F. hepatica* à l'aide des différentes préparations antigéniques dérivant généralement du parasite même, sont très nombreuses. Mais, les résultats obtenus ne sont pas ni satisfaisants ni reproductibles d'une espèce à une autre voire au sein d'une même espèce (**Haroun et Hillyer, 1986; Toet et al., 2014**). En outre, un vaccin commercial contre la fasciolose n'est actuellement pas disponible (**McManus et Dalton, 2006**). Les vaccins utilisés peuvent être soit des extraits de parasites, soit des antigènes fonctionnels définis qui diffèrent par le niveau de protection obtenu.

2.1. Métacercaires irradiées

Le traitement des métacercaires par des doses appropriées de rayons X permet l'atténuation de leur pouvoir pathogène sans toutefois atténuer leur pouvoir immunogène. Cette méthode a été utilisée par de nombreux auteurs avec plus ou moins de succès en fonction des espèces concernées; chez le rat une protection de 50% (réduction de l'installation des parasites dans les canaux biliaires) a été obtenue (**Armour et Dargie, 1974**). Chez le bovin sensibilisé 3 fois par des Métacercaires irradiées (MI), une réduction de 70% de la charge parasitaire a été observée par **Nansen (1975)**. Par contre, les moutons étaient difficiles à vacciner par cette méthode. En effet **Campbell et al. (1978)**, malgré 3 infestations avec 100 ou 1000 MI, n'obtenaient aucune résistance chez le mouton.

2.2. Complexes immuns

Howell (1979) a vacciné des rats en utilisant des immuncomplexes (IC) obtenus par culture de métacercaires dans l'immunsérum de rat, et mélangés à l'adjuvant complet de Freund (ACF). **Sandeman et Howell (1980)** ont également testé des IC obtenus par la culture de métacercaires désenkystés dans du sérum de moutons infestés. Bien que la vaccination avec ce composé a entraîné la formation d'Acs, il n'y avait aucune réduction du nombre de douves, ni même des lésions hépatiques chez les moutons vaccinés. D'après ces auteurs, tel résultat n'était guère surprenant quand on connaît la grande réceptivité des moutons à *F. hepatica*.

2.3. Antigènes somatiques

De nombreuses expériences ont été menées, donnant des résultats variés. Par exemple, **Lang et Hall (1977)** ont immunisée des souris avec un extrait somatique de douves immatures, âgés de 10 à 16 jours, ce qui a conduit à une baisse importante de l'intensité parasitaire avec absence des lésions hépatiques. **Huges et al. (1981)** n'ont pas réussi à protéger des rats ayant reçus deux injections d'Ags somatiques de douves adultes mélangés à l'ACF, à 3 semaines d'intervalle par voie intra-musculaire. Par contre, **Oldham et Hughes (1982)**, par voie intrapéritonéale, ont obtenu une diminution significative de la charge parasitaire avec l'extrait de vers adultes. D'après **Burden et Hammet (1980)**, les extraits somatiques d'œufs ou de formes juvéniles ne donnent guère de résultats chez les rats, quelle que soit la dose ou la voie d'injection des Ags.

2.4. Antigènes excrétés-sécrétés

Lang (1976) a protégé des souris à l'aide du milieu de culture de douve immatures contenant des produits excrétés-sécrétés (PES). Chez le rat, Avec l'utilisation des PES de douves immatures de 4 semaines, une résistance positive est obtenue, alors que les PES de douves adultes ne donnent chez le même modèle aucun résultat (**Rajasekariah et al., 1979**). Aussi, **Davies et al. (1979)** n'ont pas obtenu d'effet probant en utilisant des antigènes issus du milieu de culture des métacercaires juste désenkystées, complétés avec l'ACF et injectés par voie sous-cutanée. Ultérieurement, **Hanna et al. (1988)** ont essayé l'AgT1 isolé avec un anticorps monoclonal spécifique, à partir des granules tégumentaires du glycocalyx. Ils ont conclu que même si l'AgT1 induit la formation d'Acs anti-AgT1 dans le sérum, ils n'engendrent pas de protection contre *F. hepatica*.

2.5. Hémoglobine de la douve

L'hémoglobine (Hb) a été isolée et purifiée à partir du produit ES de *F. hepatica* adulte en une hémoprotéine de 200 KDa, par chromatographie sur gel Sephacryl S-200 et une chromatographie d'échange ionique sur DEAE-Sepharose (McGonigle et Dalton, 1995). Elle existe sous deux isoformes monoacétylées à leurs extrémités N-terminales, qui diffèrent par deux sites d'acides aminés (HbF1: 119Y/123Q; HbF2: 119F/123L) (Dewilde *et al.*, 2008).

L'Hb intervient dans le transport et le stockage de l'O₂, facteur vital pour la survie du parasite surtout dans les secteurs à faible tension d'oxygénation comme le canal biliaire. Ainsi, comme la production d'œufs par *F. hepatica* dépend du métabolisme oxydatif, son développement peut être compromis par l'immunisation avec l'Hb (Spithill *et al.*, 1999).

L'Hb a été utilisé comme antigène vaccinal seul ou en association avec les cathepsines (Cat) ou encore à l'état recombiné. Les essais de vaccination chez le bovin avec l'Hb seul, Hb/CatL1 et Hb/CatL2 conféraient une réduction de la charge des parasites (43,8%, 51,9% et 72,4%, respectivement) et une diminution de la viabilité des œufs de l'ordre de 30-75%, 0-80% et 0,7% respectivement, par rapport aux témoins. Par ailleurs, la vaccination des bovins avec l'Hb combinée à CatL2 dans l'ACF a engendré une réduction de la charge parasitaire de 72% par comparaison aux animaux témoins (Dalton *et al.*, 1996). En revanche, Dewilde *et al.* (2008) n'ont pas réussi à promouvoir la protection contre *F. hepatica* en vaccinant des bovins avec l'homoprotéine HbF2 recombinant.

2.6. Glutathione S-transférase

Les GST de *F. hepatica* ont été purifiées par chromatographie d'affinité en deux espèces majeures de PM 26 000 et 26 500 kDa identifiées par SDS-PAGE, ainsi que d'autres isoenzymes résolues par électrophorèse bidimensionnelle (Wijffels *et al.*, 1992). L'immunocytochimie a montré que les GST existent au niveau des cellules parenchymateuses et les tissus périphériques du parasite, alors que certains GST extracellulaires sont associés aux lamelles de l'épithélium intestinal (Wijffels *et al.*, 1992). Elles sont également exprimées dans les œufs et chez les formes juvéniles nouvellement excystés, et présentes dans les excréctions-sécrétions.

Chez les helminthes, les GST représentent le principal mécanisme de détoxification des xénobiotiques, des composés hydrophobes, des électrophiles et des radicaux libres (Brophy et Pritchard, 1994; Torres-Rivera et Landa, 2008). Elles ont en outre un rôle dans l'interaction hôte-parasite et le catabolisme des acides biliaires (LaCourse *et al.*, 2012).

La GST purifiée de *F. hepatica* adulte était le premier antigène défini à induire des niveaux élevés de protection chez les moutons, en permettant chez les animaux traités une anémie moins marquée, une altération de la migration larvaire et une réduction du nombre de parasites installés dans le foie (**Sexton et al., 1990**). Bien que, chez le mouton, la vaccination avec la GST native ou conjugué à l'adjuvant (GST/ACF) ait provoqué une réduction significative de 57%, elle a échoué à réduire la charge de parasites chez des rats infestés expérimentalement avec *F. hepatica* (**Howell et al., 1988**).

En plus, il a été démontré que le niveau de protection dépend de l'espèce et l'adjuvant utilisé. Par exemple, avec la GST dans le Quil A/Squalene Montanide 80® (Quil A/SM), une réduction de 69% de la charge parasitaire a été obtenue (**Morrison et al., 1996**). D'autre part, la vaccination à l'aide de protéines GST homologues de *Schistosoma* spp., étroitement apparentées aux GST de *F. hepatica*, a permis au moyen de deux injections espacées, la réduction de l'intensité parasitaire chez les souris (de 40 à 43%) et chez les rats (de 50 à 72%) (**Brophy et Pritchard, 1994**).

2.7. Protéases de type cathepsine L (CL)

Les cathepsines L sont des endopeptidases à cystéine sécrétées par les formes adultes de *F. hepatica* (**Dixit et al., 2008; McVeigh et al., 2012**). Ce sont des biocatalyseurs indispensables à la dégradation des protéines par le lysosome, et interviennent dans de nombreux processus biologiques fondamentaux chez les trématodes (par ex., la virulence, l'invasion et la migration tissulaire, la nutrition et l'évasion immunitaire (**Robinson et al., 2008b; Kasný et al., 2009**)).

Les CL sont considérées comme des cibles prometteuses pour la mise au point de nouveaux médicaments et vaccins chimiothérapeutiques contre un certain nombre de trématodes, en raison de leur implication dans différentes interactions hôte-parasite et leur capacité à digérer un large éventail de substrats de l'hôte (**Spithill et Dalton, 1998; Kasný et al., 2009**).

Des essais de vaccination ayant pour but d'évaluer le potentiel des Cathepsine L comme vaccins, ont été effectués soit sous forme de protéines natives, recombinantes ou en cocktail. D'après **Wijffels et al. (1992)**, le premier essai de vaccination avec un mélange de CL1 et de CL2 n'a pas donné aucune réduction significative de l'intensité parasitaire chez les moutons traités. Cependant, la production d'œufs des parasites est réduite de 69,7% et les œufs produits ont perdu 80% de leur viabilité. A l'opposé, chez le bovin, la vaccination avec ces deux

cathepsines a permis une diminution à la fois de la charge parasitaire (42,5%) et la viabilité des œufs (40 à 65%) (**Dalton et al., 1996**).

Un cocktail de cathepsines L et d'hémoglobine utilisé par **Spithill et al. (1997)** a induit une protection significative de 72% chez les bovins vaccinés. En analysant les réponses immunitaires contre *Fasciola* pendant l'infestation expérimentale des animaux, les auteurs ont suggéré que l'infection chronique est corrélée avec une réponse des lymphocytes T auxiliaires de type 2, ce qui implique que les réponses des cellules T auxiliaires de type 1 tendent à la baisse au cours d'une fasciolose chronique.

Les études de la spécificité des substrats ont suggéré que la CL pourrait jouer un rôle dans l'entretien de la protéine précurseur B de la vitelline, une protéine majeure de la coquille de l'œuf de *F. hepatica*, ce qui explique la réduction de la viabilité des œufs observée chez plusieurs espèces d'animaux vaccinés (**Spithill et al., 1999**). D'autre part, **Villa-Mancera et al. (2014)** ont montré que l'association de l'adjuvant Quil A avec les mimotopes de la CL1 obtenus par clonage sur le phage sauvage M13KE permet, selon l'immuno-réactivité des clones utilisés, la réduction de la charge moyenne des douves de 47 à 80% chez des caprins infestés par 200 métacercaires de *F hepatica*.

2.8. Protéines de liaison aux acides gras (FABP)

L'antigène FABP appartient à une famille de protéines impliquées dans la liaison et le transport d'une large gamme de molécules à groupements hydrophobes, à travers les membranes biologiques (**Spithill et al., 1999**). La FABP est la première fraction d'Ag définie et purifiée à être testée comme vaccin contre la fasciolose (**Hillyer, 1979; Hillyer, 2005**). Cet Ag offre l'avantage d'une protection croisée avec d'autres trématodes dont *S. mansoni*. En effet, comme les parasites ne peuvent pas synthétiser les acides gras (AG) de longue chaîne, ils sont capables de récupérer les précurseurs des AG de l'hôte via le transporteur FABP. En conséquence, la vaccination contre la FABP peut interférer avec le processus de synthèse des AG, constituant ainsi une cible de vaccination prometteuse (**Meyer et al., 1970**).

Plusieurs tentatives de vaccination avec la FABP donnant des protections variables ont été décrites. La vaccination avec un groupe de peptides dérivant de *F. hepatica* (FhS_{mIII(M)}) a réduit les charges parasitaires chez les souris (de 69 à 78%) (**Hillyer, 1985**) et chez les veaux (de 55%) (**Hillyer et al., 1987**), au moment de la phase virulente d'infestations expérimentales. En plus, plusieurs FABP recombinantes ont été testées. Une protéine FAB

recombinante de 15 kDa (Fh15) a protégé la souris de l'épreuve virulente par *Schistosoma bovis cercariae* (réduction de 72% par rapport aux témoins). Toutefois, Fh15 dans l'adjuvant de Freund n'a pas réussi à induire une protection significative contre *S. bovis* chez les souris (**Abáné et al., 2000**). Par ailleurs, des Souris Balb/C ont été vaccinés avec du FAB native de *F. hepatica* (Nfh12) ou recombinante (Rfh15) dans un système d'adjuvant adapté (Ada), et ensuite soumises à l'infestation par 150 cercaires de *S. mansoni*; la FAB_(Nfh12) a induit des réductions significatives de la charge de vers (83%), des œufs dans les tissus (82-92%) et des lésions hépatiques (85%) par rapport aux contrôles infestés. En revanche, les souris vaccinées avec Rfh15 ne présentaient que des réductions des œufs piégés dans le foie et l'intestin (53 et 60% respectivement) et des lésions hépatiques (45%), avec une augmentation significative du TNF α , de L'Il-6, de L'Il-2, de L'Il-4 ainsi qu'une réponse élevée en Acs (IgG, IgG1, IgG2a, IgM et IgE) (**Vicente et al., 2016**).

2.9. Leucine Aminopeptidase (LAP)

Les aminopeptidases catalysent l'élimination des acides aminés des extrémités N-terminales des protéines. Ils sont présents dans les tissus et les cellules sous forme soluble et associée à la membrane (**Acosta et al., 2008**). Les leucines aminopeptidases de *F. hepatica* (FhLAP) sont associés aux cellules épithéliales qui tapissent le tube digestif du parasite, ce qui suggère que ces enzymes interviennent dans les étapes finales du catabolisme des peptides générés par la dégradation du tissu hôte par des endoprotéases, telles que les protéases CL (**Acosta et al., 2008**).

Les LAP n'ont pas été complètement caractérisées chez les helminthes, mais il existe des preuves qu'elles participent aux différents processus vitaux, en particulier dans la nutrition des parasites. De ce fait, en raison de leur rôle métabolique important, les FhLAP ont été considérées comme des candidats pertinents pour le développement de vaccins contre la fasciolose (**Changklungmoa et al., 2012**).

La vaccination des moutons avec FhLAP native induit les niveaux les plus élevés de protection signalés à ce jour (**Piacenza et al., 1999**). Les moutons immunisés avec FhLAP seul présentaient une réduction de 89% de la charge parasitaire et, en association avec les cathepsines L1 et L2 natives, les charges étaient réduites de 76% (**Piacenza et al. 1999; Acosta et al., 2008**).

D'autre part, une forme recombinante, rFhLAP, a protégé des lapins contre *F. hepatica* (Acosta *et al.*, 2008). Les lapins immunisés avec rFhLAP dans l'adjuvant de Freund à des intervalles de 4 sem, puis soumis à un traitement par voie orale avec 50 métacercaires, ont développés une résistance à l'infestation, se traduisant par une réduction nette de l'intensité des parasites (réduction de 79% par rapport aux témoins non vaccinés) (Acosta *et al.*, 2008).

Plus récemment, une forme fonctionnelle recombinante de *FhLAP* (r*FhLAP*) a été utilisée en combinaison avec des adjuvants de différents types, visant la vaccination des moutons contre une infestation expérimentale par des métacercaires de *F. hepatica*. L'immunisation avec le r*FhLAP* a induit une réduction significative de la charge de douves dans tous les groupes vaccinés ; 83,8% dans le groupe Freund, 86,7% dans le groupe Alum, 74,4% dans le groupe Adyuvac 50, 49,8% dans le groupe Ribi et 49,5% dans le DEAE-D, sans qu'il y'ait de modification de taille significative des douves récupérées dans les différents groupes de vaccination (Maggioli *et al.*, 2011).

PREMIÈRE PARTIE : PROTOCOLE DE SEPARATION ET DE PURIFICATION DES PROTEINES ANTIGENIQUES

1. Matériel et méthodes

1.1. Préparation des antigènes totaux

1.1.1. Collecte et lavage des parasites

Les douves utilisées pour la préparation des produits antigéniques de *F. hepatica* sont prélevées à l'abattoir de Seybouse (ex-Juano) d'Annaba sur des foies de bovins saisis pour fasciolose. L'inspection des foies au niveau des abattoirs est nécessaire au cours de cette opération, et comporte deux phases :

- L'examen visuel des deux faces du foie douvé, permet d'observer dans le cas d'une atteinte de fasciolose à *F. hepatica* une hypertrophie des trajets fibrosés au niveau du parenchyme et un épaissement des canaux biliaires.

- La réalisation d'incisions transversale et longitudinale qui permettent la détection des parasites au niveau du parenchyme hépatique ou les canaux biliaires. A la coupe des canaux, il s'échappe un liquide sanieux, brun, dans lequel on peut apercevoir des douves vivantes qui peuvent être dégagées vers l'extérieur par une forte pression (**photo 1**).

Une fois collectées, les douves sont mises à conserver dans un récipient contenant de l'eau physiologique (NaCl 9‰) en présence d'un antiseptique, l'azide de sodium (NaN_3) à 0,01%. Durant cette étape, les formes adultes et actives sont rapidement sélectionnées. Les parasites immatures, partiellement ou complètement sectionnés sont éliminés. Ensuite, elles sont replongées plusieurs fois dans des boîtes de pétri remplies de solution NaCl, et sont rincées soigneusement pendant 1 h jusqu'à ce qu'on les débarrasse de toute trace de sang, de bile ou d'autres impuretés (**photo 2**).

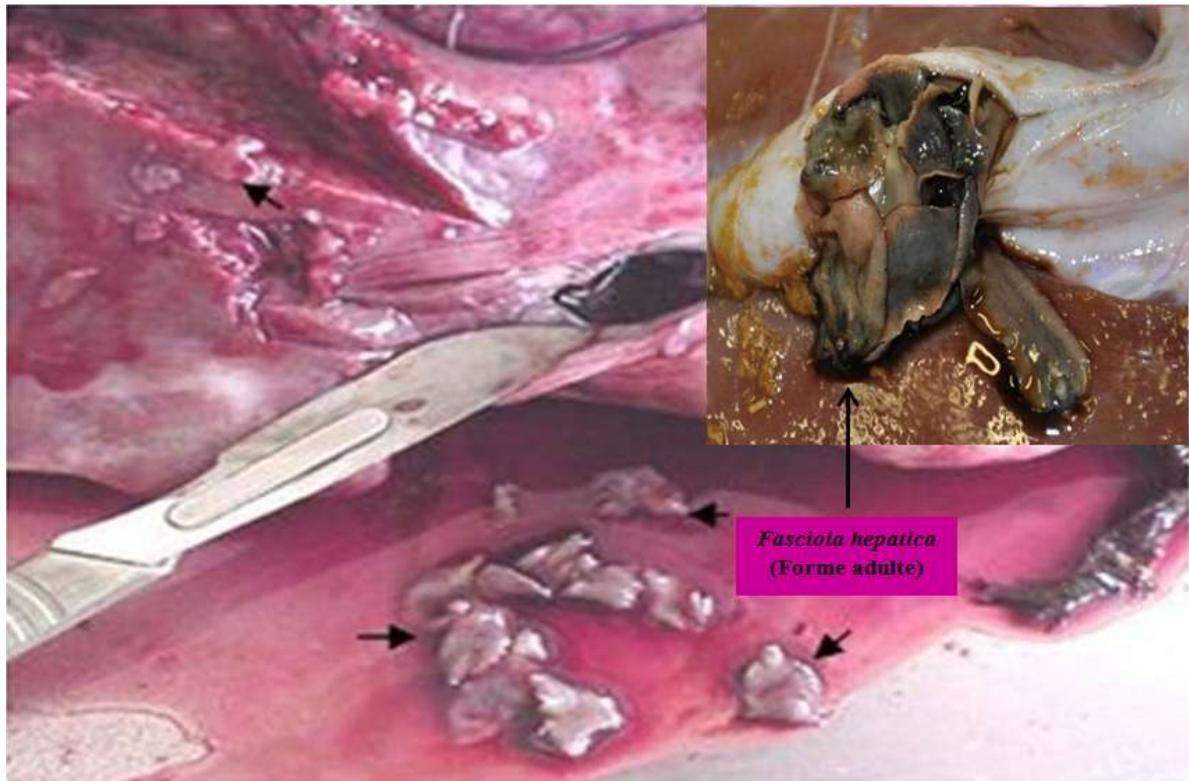


Photo 1 : Foie de bovin parasité par des formes adultes de *F. hepatica*.
(Les flèches indiquent des douves adultes extériorisées du canal biliaire).

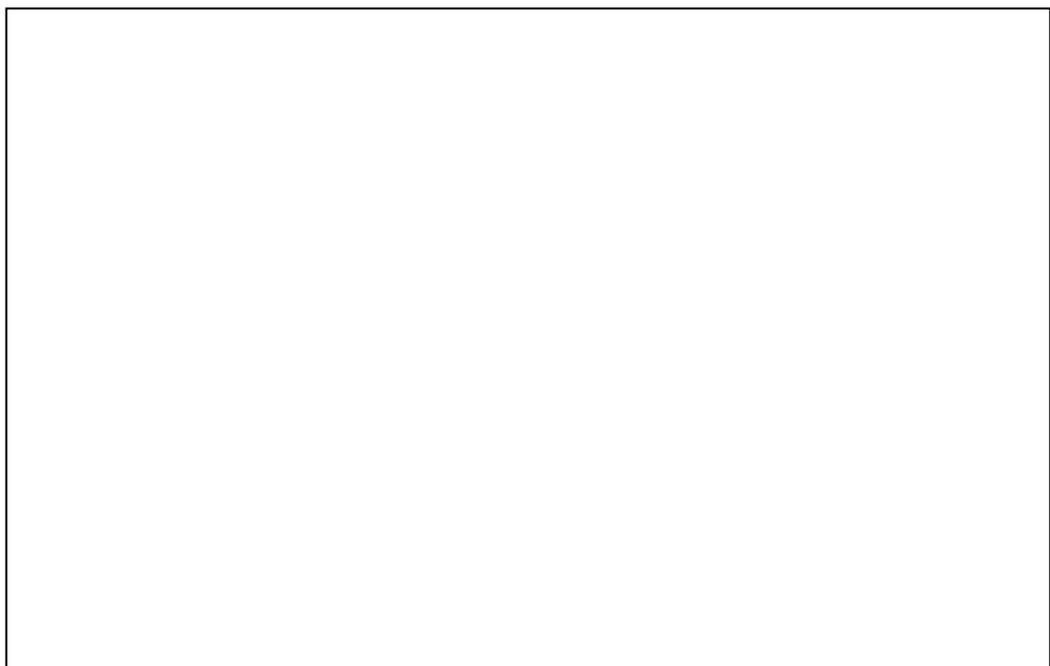


Photo 2 : Lavages en série et sélection des douves adultes et vivantes de *F. hepatica* avant leur incubation.

1.1.2. Obtention des antigènes excrétés-sécrétés

La technique d'obtention des produits d'excrétion-sécrétion de *F. hepatica* (PESFh) est celle décrite par **Boulard *et al.* (1995)** et modifiée ultérieurement par **Chauvin *et al.* (1997)**. Les douves adultes, vivantes et intactes, recueillies sur des foies de bovins saisis à l'abattoir, ont subi plusieurs lavages avec une solution de NaCl, puis incubées à la T° ambiante, pendant 3 h dans du tampon PBS, 0,15 M pH 7,2 contenant 1 mM PMSF et 0,02% NaN₃, à raison de 20 douves/50 ml PBS (**photo 3**).

Cette manipulation est réalisée sur place, dans l'abattoir où s'est effectuée la collecte des parasites. Le milieu d'incubation est ensuite transporté vers le laboratoire, à 4°C et dans des conditions isothermes afin d'éviter les problèmes dus à l'interruption de la chaîne de froid, en particulier l'effet protéolytique des protéases sur les produits excrétés-sécrétés (**Lehner et Sewell, 1980; Carmona *et al.*, 1994**). Il est alors passé successivement à travers deux filtres en nylon d'une porosité de 40 et 20 µm de façon à éliminer les œufs, centrifugé pendant 30 min (Centrifugeuse Beckman J.6), à 4 °C et une vitesse de 3500 t/min pour éliminer les débris particulaires.

Le surnageant contenant les antigènes excrétés-sécrétés de *F. hepatica* est concentré par précipitation au sulfate d'ammonium (SA) à forte concentration, dessalé par dialyse à l'eau distillée et rééquilibré par une autre dialyse avec du PBS, puis stocké à -20 °C jusqu'à utilisation. La **figure 28** regroupe les différentes étapes nécessaires pour l'obtention et la préparation des antigènes excrétés-sécrétés.

Les taux des protéines, carbohydrates et lipides contenus dans les excréments et sécrétions de *F. hepatica* sont déterminées avant et après l'étape de concentration par le sulfate d'ammonium, par dosage colorimétrique selon les méthodes décrites dans la section ci-dessous relative aux dosages des constituants antigéniques de *F. hepatica*.

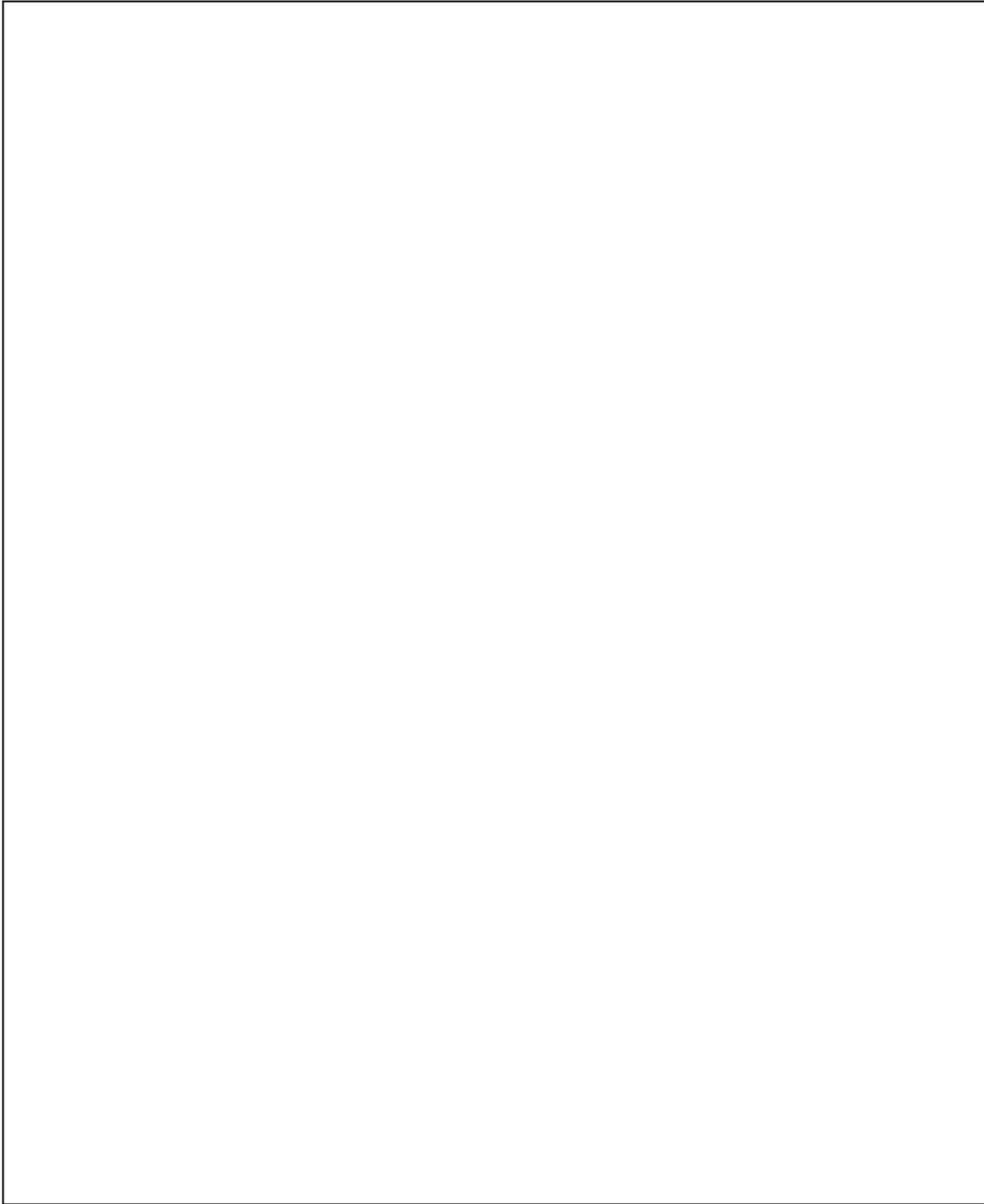


Photo 3 : Incubation des douves adultes et vivantes dans un milieu stérilisé et tamponné pour l'obtention de leur produit excréte-sécrété (PES).

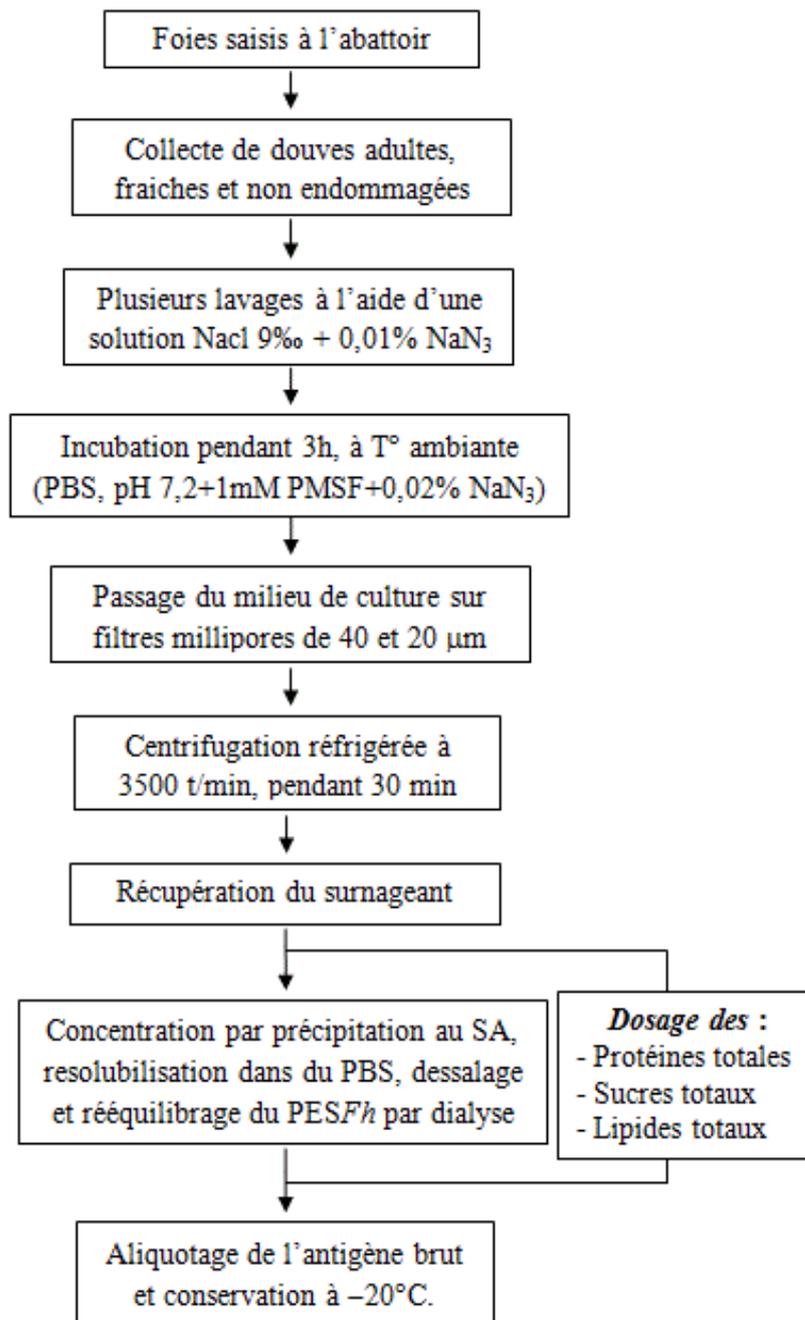


Figure 28 : Étapes d'obtention des produits excrétés-sécrétés bruts de *Fasciola hepatica* (PESFh).

1.1.3. Obtention des antigènes somatiques

Les douves maintenues dans le milieu d'incubation sont récupérées et utilisées pour la préparation des antigènes somatiques de *F. hepatica* (ASFh). Après plusieurs lavages dans le tampon PBS, les douves sont soumises, trois fois de suite, à une congélation à -20 °C et une décongélation à la T° du laboratoire afin de fragiliser leurs parois. Plus de 100 douves décongelées sont rincées et séchées, à l'air ambiant. Après avoir été pesées et ajustées à 10 g, elles sont broyées au Potter, puis désintégrées à 4 °C par deux cycles d'ultrasons de 60 secondes chacun, à l'aide d'un sonicateur (Sonifier B-30) en utilisant une sonde moyenne, à l'amplitude 4. L'homogénat obtenu est dilué avec du tampon PBS, pH 7,2 contenant 0,8 mM PMSF et 0,01% NaN₃, dans un rapport de 2 ml/1g douves, avant centrifugation à 12 000 t/min, à basse T° pendant 1 h. Le surnageant récupéré après centrifugation constitue l'antigène somatique brut. Des fractions de celui-ci sont prélevées pour dosage avant et après précipitation au sulfate d'ammonium (SA), alors que le reste de la solution antigénique est mis en aliquotes dans des tubes Ependorf et conservé à -20 °C jusqu'à utilisation ultérieure. La **figure 29** ci-dessous résume les principales étapes de préparation des antigènes somatiques de *F. hepatica*.

1.1.4. Obtention des antigènes tégumentaires

Les antigènes de surface ou tégumentaires de *F. hepatica* (ATFh) ont été isolés selon la méthode de **Morales et Espino (2012)**. Des douves adultes fraîchement prélevées sur des foies de bovins sont lavées plusieurs fois avec du PBS refroidi de manière à empêcher la libération des produits excrétés-sécrétés, d'enzymes parasitaires ainsi que la constriction musculaire des ventouses buccales et ventrales, et éviter que ces produits s'attachent à la surface des parasites. Ensuite, les douves lavées sont maintenues à 4 °C, dans une solution PBS contenant le détergent non ionique Nonidet P-40 (1% NP-40), à raison de 1 parasite/2 ml PBS-1% NP-40. Ce produit se combine avec les lipoprotéines des membranes en formant des micelles. Après 1 h d'incubation, sous agitation douce afin de favoriser l'enrichissement des protéines à la surface du tégument, le liquide renfermant les protéines tégumentaires est recueilli, puis centrifugé pendant 45 min à la vitesse de 30 000 t/min (Ultracentrifugeuse Beckman L7). Le surnageant est alors dialysé contre l'eau distillée, à 4 °C, sous agitation continue pendant 24 h pour éliminer les résidus du détergent liés aux protéines solubles. Un dosage des constituants antigéniques présents dans le surnageant est enfin effectué avant que celui-ci soit aliquoté et conservé à -20 °C.

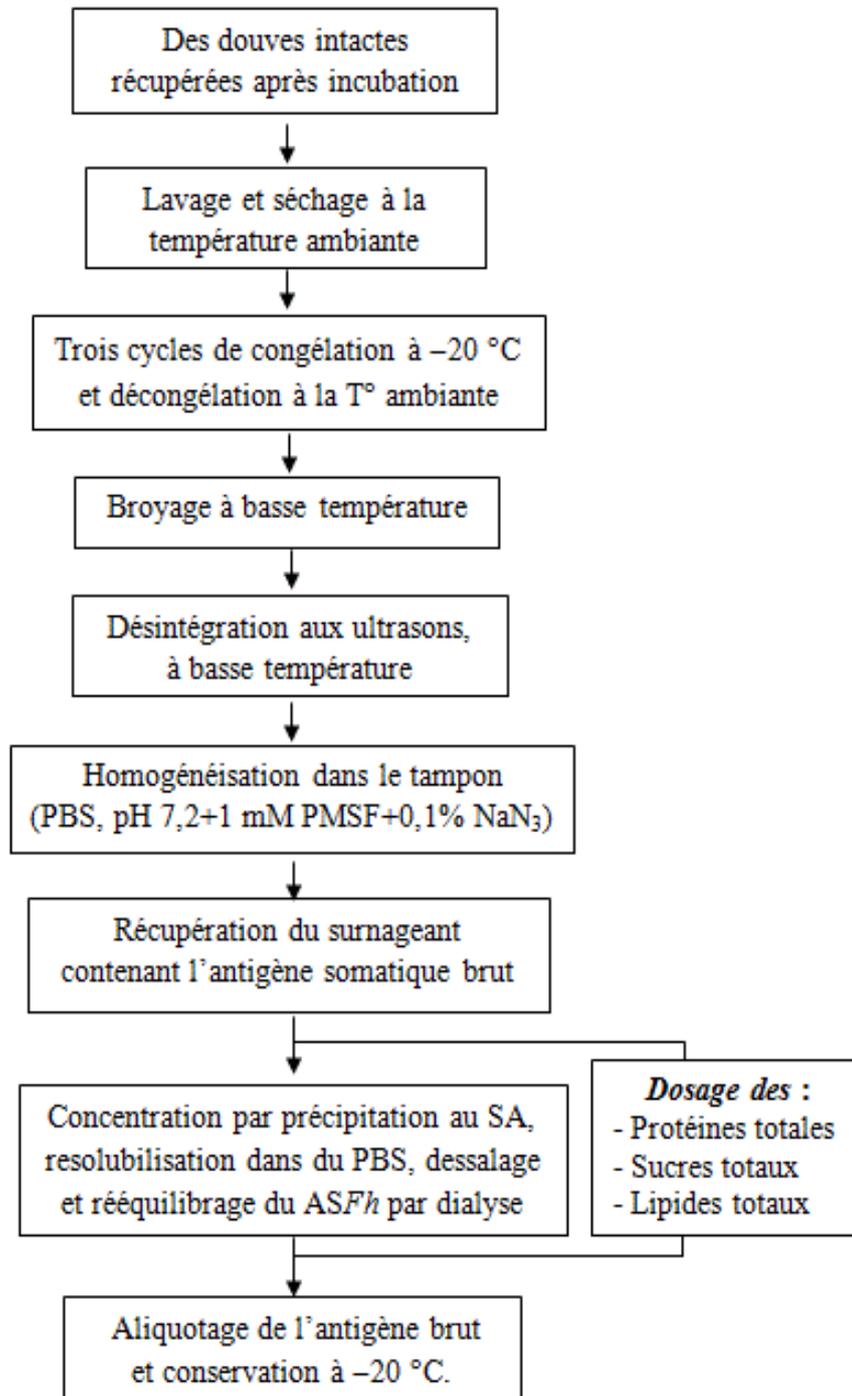


Figure 29 : Étapes d'obtention des antigènes somatiques bruts de *Fasciola hepatica* (ASFh).

1.1.5. Concentration par précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation des protéines par adjonction de sels, encore appelée précipitation par "salting-out" ou relargage, est la méthode de fractionnement des protéines solubles la plus largement utilisée. Son principe est lié à la compétition qui peut apparaître pour les molécules d'eau entre les ions du sel et les molécules des protéines afin d'assurer leur solvatation. A des concentrations de sel suffisamment élevées, il se produit une modification au niveau de la couche d'hydratation des protéines due à l'exclusion des molécules d'eau par les ions du sel, ce qui favorise les interactions protéine-protéine et permettra la formation du précipité. Après centrifugation et dessalage, les protéines précipitées se redissolvent et retrouvent leur fonction (Sine, 2003; Hainque *et al.*, 2008).

Cette manipulation est effectuée dans un milieu froid (dans un bac contenant de la glace pillée) sous agitation magnétique continue, par addition directe à un volume donné de l'échantillon la quantité de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ requise pour atteindre 80% de saturation (cette quantité en gramme peut être déterminée en se référant au **tableau I** (Annexe I). Le mélange protéine-sel est conservé une nuit à 4 °C pour permettre la précipitation des protéines et la formation du culot. Après centrifugation du mélange à 5 000 t/min pendant 30 min, le culot est récupéré et est repris avec 5 ml de PBS, pH 7,2. Le volume final est ensuite dessalé pendant 24 h par deux cycles de dialyse contre l'eau distillée et enfin rééquilibré, pendant 12 h de temps, au moyen d'une autre dialyse avec du PBS.

1.2. Quantification des constituants antigéniques

1.2.1. Dosage des protéines

La concentration des protéines totales des différentes préparations antigéniques a été déterminée par la méthode de **Bradford (1976)**, en utilisant le colorant bleu de Coomassie G-250 qui se fixe aux protéines solubles pour former, en milieu méthanolique acide, un complexe coloré en bleu-violacé.

Cette méthode colorimétrique est basée sur le fait que la longueur d'onde d'absorbance maximale de la solution de bleu de Coomassie augmente de 465 nm à 595 nm après liaison avec les acides aminés basiques (Arginine, Histidine, Lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines [10]. Ainsi, l'intensité de la coloration du complexe formé, et par conséquent la quantité des protéines à doser, sera proportionnelle à la variation d'absorbance ou les densités optiques (D.O) fournies par le spectrophotomètre.

La réalisation du dosage dépend de l'utilisation de quantités croissantes d'une solution aqueuse de sérum albumine bovine (BSA) à la concentration de 1,25 mg/ml, réparties dans des tubes à essai dans un volume final de 100 µl ajusté avec une solution de NaCl (9 ‰) (**Tableau II**, Annexe I). A ce volume, le réactif de Bradford est ajouté à raison de 2,5 ml par tube. Après agitation vigoureuse, les tubes à essai sont incubés pendant 20 min à la T° ambiante, puis leurs D.O respectives sont lues à 595 nm contre le blanc, à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-VIS Spectrophotometer 1202). Les dosages sont effectués en triplicata et les valeurs densitométriques moyennes correspondant aux différentes concentrations de BSA (**Tableau III**, Annexe I) permettent de tracer une courbe d'étalonnage $DO_{moy.} = f([BSA])$ (**Fig. I**, Annexe I). On procède de manière identique, dans les mêmes conditions de travail, aux dosages des divers échantillons de *F. hepatica* (protéines somatiques, d'excrétion-sécrétion et de surface).

1.2.2. Dosage des carbohydrates

Le dosage des sucres totaux est réalisé selon la méthode au phénol-acide sulfurique. Cette méthode est très sensible puisqu'elle permet la détermination quantitative de microquantités de sucres simples et leurs dérivés méthylés, des oligosaccharides et des polysaccharides (**Dubois et al., 1956**).

Son principe repose sur la condensation par estérification d'un chromogène (phénol) avec les produits de déshydratation des sucres simples. En milieu acide fort (présence d'acide sulfurique) et à chaud, Les hexoses se déshydratent en dérivé furfural (l'hydroxyfurfural) qui se combine facilement avec le phénol, en donnant une coloration Jaune-orangé dont l'intensité est proportionnelle à la quantité du phénol fixée, et par conséquent à la concentration du sucre à doser (**Ruiz, 2005**).

Ce dosage colorimétrique dépend de la réalisation d'une droite d'étalonnage à partir de quantités croissantes d'une solution-mère de D-glucose à la concentration de 1mg/ml : 200, 400, 600, 800 et 1000 µg déposées dans des tubes à essai et ajustées à un volume final de 1 ml. Ensuite, chaque tube reçoit successivement, dans un milieu froid, 50 µl de phénol à 80% et 2,5 ml d'acide sulfurique à 95% (**Tableau IV**, Annexe I). Après agitation, les tubes sont maintenus pendant 5 min à 100 °C, puis à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance de la couleur caractéristique est mesurée au spectrophotomètre, à 490 nm, et les valeurs des D.O obtenues en triplicata pour chaque tube (**Tableau V**, Annexe I) permettent de tracer

la courbe d'étalonnage $DO_{\text{moy}} = f([\text{D-glucose}])$ (**Fig. II**, Annexe I). Parallèlement, des prises d'essai (1 ml) par échantillon des différents produits antigéniques sont analysées dans les mêmes conditions. Leur teneur en carbohydrates est obtenue en insérant l'absorbance de l'échantillon inconnu dans l'équation de la droite calculée à partir de la courbe d'étalonnage.

1.2.3. Dosage des lipides

La détermination de la teneur en lipides totaux présents dans les produits antigéniques de *F. hepatica* a été effectuée par la méthode de **Frings et al. (1972)** basée sur la réaction sulfo-phosphovanillique. Cette réaction couramment utilisée pour le dosage des lipides sériques sans extraction préalable, met en œuvre des réactifs acides concentrés (l'acide sulfurique à 95% et l'acide phosphorique à 85%) et une solution aqueuse de Vanilline à 0,6%. Les lipides à chaud en milieu sulfo-phosphorique développent avec la vanilline une coloration rose-violacée dosable au spectrophotomètre (**Crehange et Metais, 1972**).

Pour l'élaboration de la gamme d'étalonnage, cinq dilutions sont utilisées: 200, 400, 600, 800 et 1000 μg . Ces dilutions sont préparées à partir d'une solution mère d'acide oléique (1 mg/ml) dans l'acide sulfurique. Dans des tubes à essai, les réactifs sont alors ajoutés dans l'ordre d'addition indiqué dans le **tableau VI** (Annexe I). Après leur addition dans les tubes, les deux premiers réactifs (acide phosphorique et solution sulfurique) sont soigneusement mélangés par agitation douce, puis placés pendant 15 min à la T° ambiante jusqu'à la dissipation du dégagement thermique provoqué par le mélange.

Chaque solution étalon d'acide oléique dissout dans l'acide sulfurique à un volume final de 1 ml, est délicatement additionnée au tube contenant les deux acides. Après agitation lente, le 3^{ème} réactif (vanilline) est alors ajouté à raison de 1 ml/tube. Ensuite, tous les tubes sont incubés à 40 °C pendant 1 h jusqu'à ce que la coloration prenne son maximum d'intensité. Après refroidissement des tubes, les colorations sont lues au spectrophotomètre à 540 nm et les DO_{moy} issues des dosages répétitifs (**Tableau VII**, Annexe I) sont reportées en fonction des concentrations croissantes de la gamme étalon : $DO_{\text{moy}} = f([\text{Oléate}])$ (**Fig. III**, Annexe I), donnant ainsi une droite qui sert à déterminer la concentration des lipides totaux dans les différents produits de *F. hepatica*, par extrapolation de la valeur de DO lue pour chaque échantillon sur cette droite référentielle.

2. Fractionnement et purification des protéines antigéniques

2.1. Fractionnement par chromatographie d'exclusion moléculaire

Ce type de chromatographie liquide constitue un outil très valable pour la séparation initiale des protéines d'origine virale et parasitaire, et permet d'avoir un aperçu général sur leur composition en substances antigéniques avec un minimum de manipulation (Zimmerman et Clark, 1986; Payment et trudel, 1989a).

2.1.1. Principe général

La séparation par filtration sur gel repose sur le concept essentiel des deux phases : une phase mobile (liquide) qui traverse une phase stationnaire (solide). Il s'ensuit une migration différentielle où les divers composants initialement présents dans la phase mobile sont sélectivement séparés sur la base de leur taille moléculaire et de leur forme (Kamoun, 1977). Les molécules de la phase mobile, de dimension plus grande que le diamètre des pores, ne pénétreront pas les pores des billes et traverseront très rapidement le gel ; elles sont ainsi éluées les premières de la colonne. Les molécules plus petites pourront pénétrer plus ou moins profondément dans les pores du gel suivant leurs dimensions et leurs formes. Elles seront donc éluées de la phase stationnaire dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes (Marouf, 2001).

2.1.2. Méthodologie

2.1.2.1. Mise au point préalable

Le principe de mise au point est d'élaborer une méthode permettant l'isolement et la purification des divers constituants antigéniques de *F. hepatica* d'une manière simple, douce et reproductible, et l'adapter aux conditions opératoires très rigoureuse qui pourraient éventuellement constituer de sources potentielles d'instabilité et de dénaturation pour les protéines à analyser. Pour cela, nous avons testé plusieurs paramètres et agents :

- Les dimensions de la colonne en verre : pour une bonne résolution chromatographique, nous avons choisi une colonne plus longue et de plus faible diamètre intérieur.
- Le volume et la concentration de l'échantillon : afin de minimiser le temps de rétention ou une trop grande dispersion des protéines dans le gel, et obtenir des fractions dont les pics sont assez étroits [11], nous avons utilisé des échantillons de petits volumes (1-2 ml) et de concentrations importantes (≥ 10 mg/ml).
- Le pH et la force ionique du tampon d'éluion : nous avons opté pour le tampon PBS dont les caractéristiques sont compatibles avec la stabilité des protéines à pH aux alentours de 7 à 7,5. Ce tampon contenant du phosphate (en mélange mono- et dibasique) maintient le pH

neutre pour une force ionique faible du milieu. Ce sont les conditions optimales qui aident à prévenir les interactions non spécifiques et les agrégations des protéines chargées qui peuvent retarder l'élution des analytes [12].

- Le débit d'écoulement de l'éluant : après plusieurs essais, nous avons utilisé un débit modéré de la pompe péristaltique afin de donner suffisamment de temps pour les petites molécules de pénétrer et diffuser dans les pores de la matrice, ce qui se traduit par une résolution protéique homogène [12].
- La phase stationnaire : nous avons testé deux types de gels, le Sephadex G-100 et le Sephadex G-200, qui ne diffèrent que par la granulométrie des billes, c'est-à-dire par leur domaine de fractionnement. Le dernier offre la résolution la plus élevée, car il sépare les molécules sur une large gamme de poids moléculaire (de 5 à 600 kDa) [13], alors que le Sephadex G-100 avec une limite d'exclusion inférieure (de 4 à 150 kDa) n'inclut pas certaines protéines à séparer dont les poids moléculaires dépassent cette fourchette.

Enfin, pour le bon fonctionnement de notre dispositif de chromatographie dans des conditions de travail optimales, nous avons procédé au réglage de l'ensemble des équipements utilisés comme suivant :

- Le détecteur (spectrophotomètre à UV : Modèle LINEARTM UVIS 200) est réglé à une longueur d'onde de 280 nm pour un intervalle de sensibilité de 0 à 2.
- L'enregistreur (traceur de chromatogramme : Modèle KIPP&ZONEN BD-41) est ajusté à une tension de 10 mV et une vitesse de défilement du papier de 0,2 mm/min.
- Le distributeur (collecteur de fractions : Modèle Universal) est maintenu à un débit de 0,25 ml/min.
- La pompe péristaltique multicanaux (Aspirateur de l'éluant : Marque IPC ISMATEC) est ajusté à un débit d'écoulement de 25 ml/h.

2.1.2.2. Préparation du gel

Nous avons utilisé comme support le Sephadex G-200 (Sigma). C'est une résine préparée par réticulation du dextrane avec l'épichlorohydrine pour former des microbilles poreuses dont les mailles sont bien définies [14]. Ce composé se présente sous forme de poudre très fine qu'il faut faire gonfler dans un excès de solvant avant son utilisation sous forme de suspension. La préparation du gel est effectuée en dissociant environ 7 g de Sephadex dans 70 ml de PBS 0,15 M pH 7,2, soit un rapport de 1 g gel/10 ml tampon. Ensuite, la suspension formée est manuellement agitée de manière douce à l'aide

d'une baguette en verre tout en éliminant, de temps en temps, les particules qui apparaissent sur sa surface. Enfin, le gel est laissé s'hydrater parfaitement pendant une nuit, à 4 °C, avant de subir un chauffage à 90 °C pendant 5 h, pour le dégazer complètement et éviter la formation des bulles d'air lors du remplissage de la colonne.

2.1.2.3. Préparation de la colonne

La colonne utilisée est une burette en verre de 65 cm de longueur et 1,1 cm de diamètre, à l'extrémité de laquelle on a placé un morceau de laine spéciale (laine de verre) pour bloquer la phase solide et ne laisser pas passer le gel avec le solvant. La colonne est remplie, à la T° ambiante, en position légèrement inclinée en versant soigneusement la suspension bien homogène du gel le long de sa paroi interne à l'aide d'un entonnoir, afin d'empêcher l'emprisonnement des bulles d'air. Une fois le gel est versé, la colonne est remise immédiatement en position verticale, puis l'espace au-dessus du gel est rempli avec l'éluant (tampon PBS, pH 7,2) jusqu'à 2 à 3 cm du haut de la colonne. On laisse s'écouler l'éluant à travers le gel pendant plusieurs heures grâce à la pompe péristaltique, à un débit d'écoulement très lent (5 ml/h) de façon à obtenir une sédimentation homogène du gel. Enfin, La colonne est prête lorsque le fluide à la sortie du spectrophotomètre fournisse une D.O de 0,02 pour une longueur d'onde de 280 nm.

2.1.3. Technique retenue

Les différents extraits antigéniques de *F. hepatica* sont fractionnés séparément dans des conditions de travail identiques, à travers une colonne de dimension (1,1 cm x 65 cm) contenant approximativement 70 ml de gel Sephadex G-200 équilibré en tampon PBS 0,15 M pH 7,2. Après avoir testé l'homogénéité du gel en faisant passer 10 ml de Bleu Dextran (Sigma-Aldrich) préalablement préparé selon la procédure décrite par **Viet *et al.* (2008)**, chacun des échantillons, dont la concentration en protéines est connue, est déposé à raison de 1 à 2 ml à la surface du gel, puis introduit délicatement en ouvrant le robinet en bas de la colonne. Dès que l'échantillon pénètre complètement, on ajoute quelques ml d'une solution de saccharose à 3% qui sert à stabiliser les protéines diffusant dans les mailles du gel. L'éluion des protéines fractionnées est effectuée avec le tampon d'équilibrage, au moyen d'une pompe péristaltique, à un débit d'écoulement de 25 ml/h. Des fractions de protéines récoltées pour chacun des produits antigéniques, à raison de 2 ml/tube, sont analysées par spectrophotomètre à l'UV, à 280 nm. Pour chaque type d'échantillon fractionné, les tubes collectés correspondant aux différents pics de chacun des chromatogrammes obtenus sont

reconstitués en pools. Des petits aliquotes sont prélevés de chaque pool pour le dosage des divers constituants antigéniques, tandis que le reste est conservé à basse T° pour une utilisation ultérieure.

2.2. Purification sur colonne d'affinité

2.2.1. Principe

La chromatographie d'affinité repose sur les propriétés d'interactions biologiques qui peuvent exister entre deux substances : un ligand spécifique fixé généralement sur un support inerte introduit dans une colonne à chromatographie, et une molécule d'intérêt présentant une affinité spécifique pour cet effecteur. En faisant passer dans cette colonne le mélange de substances contenant la protéine à isoler, le ligand ne retient que celle-ci alors que les autres protéines sortent librement de la colonne. Dans un second temps, en changeant les conditions de l'élution, on dissocie le complexe effecteur-protéine spécifique, et la protéine souhaitée est alors éluée de la colonne à l'état pur (**Metais *et al.*, 1990**).

Dans notre cas, la purification met à profit la propriété de liaison des composés gluco-conjugués présents dans le produit antigénique à purifier et une lectine (la Concanavaleine A) ; substance naturelle susceptible de reconnaître et lier spécifiquement des structures glycaniques. Ainsi, la Concanavaleine A (ConA) fixée sur un gel activé (Sepharose 4B) permet de fractionner des glycoprotéines en fonction de l'accessibilité des résidus glucosyls et/ou mannosyls de leur chaîne glycanne (**Kamoun, 1977**).

2.2.2. Technique

Seule la 1^{ère} fraction (pool du 1^{er} pic), issue du fractionnement de l'antigène somatique par filtration sur gel, est soumise à une chromatographie sur colonne d'affinité ConA-Sepharose 4B (Sigma chemical) de 1 cm de diamètre et 15 cm de longueur, préalablement équilibré à la T° ambiante avec 10 fois son volume de tampon d'élution : Tris 10 mM, pH 7,2 contenant 0,5 M NaCl, 1 mM MnCl₂ et 1 mM CaCl₂. Après concentration de l'échantillon au SA à 80% de saturation, le précipité est resolubilisé dans 5 ml de tampon Tris, puis le volume final est déposé sur la colonne pour subir une chromatographie d'affinité permettant de purifier les protéines des glyco-conjugués. L'élution de la colonne est réalisée en deux étapes : les protéines non adsorbées par le gel sont éluées en premier temps dans le tampon Tris jusqu'à ce que le liquide à la sortie du spectrophotomètre fournisse une D.O. inférieure à 0,02. Ensuite, la fraction non protéique adsorbée est éluée à l'aide de 25 ml d'une solution concentrée de D- glucose 0,6 M. Des petits volumes d'éluât de l'ordre de 2 ml/tube recueillis

à raison de 12 ml/h, en utilisant la pompe péristaltique, permettent de former deux pools distincts : la fraction non liée et la fraction liée. La 1^{ère} fraction subit alors un dosage pour déterminer le taux des protéines, aliquotée dans des tubes Eppendorf puis stockée à -20 °C jusqu'à utilisation. Ces fractions aliquotées sont destinées à l'analyse par électrophorèse et serviront, dans la suite des expériences, à tester l'activité antigénique des protéines purifiées et sensibiliser les plaques ELISA en vue d'analyses sérologiques.

2.3. Electrophorèse SDS-PAGE des protéines antigéniques

Cette technique a été effectuée en conditions dénaturantes selon la procédure décrite par **Laemmli (1970)** avec quelques modifications. Elle tire avantage de l'emploi d'appareillage et de plaques de verre qui permettent l'électrophorèse simultanée de plusieurs échantillons pour des fins analytiques et comparatives.

2.3.1. Principe

L'électrophorèse a pour but de séparer des molécules chargées au travers d'un gel (un polymère) sous l'effet d'un champ électrique. Le principe de base repose sur le fait que le détergent anionique SDS réagit avec les protéines pour former des complexes chargés négativement. Comme la quantité de SDS fixée par chaque protéine est, en général, fonction de la taille de la protéine, la séparation se fait sur la base de la masse moléculaire (**Payment et trudel, 1989b**).

Le pouvoir de résolution de la technique repose sur l'utilisation d'un gel de regroupement superposé sur un gel de séparation. Le premier gel permet la concentration des protéines antigéniques en une mince bande, menant à une meilleure séparation [15].

2.3.2. Méthodes

2.3.2.1. Préparation des solutions et des gels d'électrophorèse

Plusieurs solutions ont été préparées dans les quantités indiquées dans l'annexe II :

- **Solution A** : Acrylamide/N.N'-méthylène-bis-acrylamide (30 : 0,8)
- **Solution B** : Tampon pour le gel de concentration (Tris-Hcl 1 M, pH 6,8)
- **Solution C** : Tampon pour le gel de séparation (Tris-Hcl 1,5 M, pH 8,8)
- **Solution D** : Tampon de migration (Tris 0,025 M, pH 8,8 + Glycine 0,192 M + SDS 0,1%)
- **Solution E** : SDS 10%
- **Solution F** : Persulfate d'ammonium 1,5%
- **Solution G** : Bleu de bromophénol 0,1%

Pour la séparation des protéines antigéniques de *F. hepatica*, nous avons utilisé un gel de séparation de 12% (p/v) et un gel de concentration de 5% (p/v) d'acrylamide avec un rapport acrylamide/bis-acrylamide de 30:0,8. Les gels sont préparés à partir de plusieurs réactifs dans les proportions suivantes :

✓ **Gel de séparation à 12%**

- Acrylamide/bis-acrylamide (Solution A)	41,6 ml
- Tris-Hcl 1,5 M pH 8,8 (Sol. C)	14 ml
- H ₂ O bidistillée, autoclavée	47 ml
- SDS 10% (Sol. E)	540 µl
- Persulfate d'ammonium (Sol. F)	500 µl
- TEMED	120 µl

Volume total: 104 ml.

✓ **Gel de concentration à 5%**

- Acrylamide/bis-acrylamide (Solution A)	9,68 ml
- Tris-Hcl 1 M, pH 6,8 (Sol. C)	12,66 ml
- H ₂ O bidistillée, autoclavée	30 ml
- SDS 10% (Sol. E)	500 µl
- Persulfate d'ammonium (Sol. F)	200 µl
- TEMED	40 µl

Volume total:40 ml.

- Le TEMED est ajouté juste avant le coulage du gel afin d'éviter la polymérisation rapide du gel.

- Les deux volumes préparés permettent de préparer un double gel de dimension (10 x 10 cm).

2.3.2.2. Préparation des échantillons

Les différents échantillons protéiques de *F. hepatica* et les protéines servants de marqueurs de masse moléculaire : standards de faible masse moléculaire (14000 – 97400 Da) et de masse moléculaire élevée (43000 – 205000 Da) (Sigma) (**Tableau VIII**, Annexe I) sont dissociés par chauffage à 100 °C, dans un bain-marie bouillant, en présence d'un tampon

contenant 4% SDS, 1 mM EDTA, 2,5% 2- mercaptoéthanol, 10% glycérol et 125 mM Tris-Hcl, pH 6,8 et finalement 0,02% de bromophénol qui servira à repérer le front de migration, alors que le glycérol sert à donner aux échantillons la densité nécessaire pour qu'elles se déposent facilement au fond des puits [16].

2.3.2.3. Migration électrophorétique

Nous avons utilisé comme appareillage une mini-cuve (SOMATCO, E-4100 mini vertical system) remplie de tampon de migration (solution D) et reliée à un générateur de courant (APELEX ST-606). Le gel de polyacrylamide est coulé entre deux plaques de verre de dimension (10 x 10 cm) et l'épaisseur du gel est réglée à 1,5 mm grâce à un espaceur en plastique. Avant la polymérisation du gel, on insère le peigne entre les deux plaques. Dès que le gel devient solide, on retire doucement le peigne et on charge les échantillons dans les puits formés, à raison de 100 µl/puits.

Après avoir placé les échantillons du côté de la cathode sur le support vertical, en contact avec la solution d'électrophorèse, on applique un courant de 50 V jusqu'à ce que les échantillons migrent complètement à travers le gel de concentration, puis on augmente le courant à 100 V. La migration est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol arrive à environ 1 cm de l'extrémité inférieure du gel.

2.3.2.4. Traitement du gel

Les protéines séparées sur gel sont révélées par coloration au nitrate d'argent (AgNO_3) selon la méthode décrite par **Merril et al. (1982)**. Dans un premier temps, les protéines sont fixées par immersion dans une solution contenant 50% de méthanol et 12% d'acide acétique pendant 30 min. Le gel est par la suite lavé à l'eau déionisée pendant une nuit puis mis en contact avec une solution à 10% de glutaraldéhyde pendant 30 min, sous agitation douce. Après 3 bains de lavage à l'eau déionisée, de 5 min chacun, le gel est placé dans une solution de AgNO_3 , 12 mM durant 30 minutes.

Cette étape est suivie d'un rinçage rapide à l'eau déionisée puis de deux rinçages avec la solution de révélateur composé de 0,3 M de carbonate de sodium et 0,5 ml de formol par litre. Le gel est gardé dans cette solution jusqu'à l'apparition des bandes protéiques. Lorsque les bandes montrent l'intensité désirée, la révélation est arrêtée en émergeant le gel dans une solution de décoloration à 1% (v/v) d'acide acétique.

3. Tests d'immunoréactivité des fractions antigéniques

3.1. Immunodiffusion d'Ouchterlony

3.1.1. Obtention des sérums de lapins

Dans le but de produire des sérums polyclonaux de lapins anti-*ASFh*, nous avons immunisé deux lapins mâles, de poids moyen de 2 kg, par l'extrait somatique brut de douves adultes. Après rasage des lapins sur la partie dorsale, à deux endroits distincts en utilisant une lame de rasoir et de l'alcool éthylique pour stériliser les endroits rasés (**Photo I**, Annexe I), les lapins reçoivent, dès la 1^{ère} semaine, des injections sous-cutanées (en points multiples) de 200 µg d'extrait brut dans un volume de 500 µl de tampon PBS, pH 7,2, émulsionnés avec un volume égal d'adjuvant complet (AFC).

Pour les 2^{ème} et 3^{ème} immunisations, 100 µg du même produit antigénique additionné de 500 µl de PBS et 500 µl d'adjuvant incomplet (AFI), sont administrés aux lapins respectivement 7 et 15 jours après la 1^{ère} immunisation. Des saignées sont effectuées au niveau des oreilles par ponction intraveineuse à l'aide d'une aiguille. Le 1^{er} prélèvement concernant le sérum négatif s'est fait avant l'immunisation, les autres prélèvements destinés à l'immunodiffusion sont recueillis une semaine après la dernière injection dans des tubes secs, puis centrifugés à 3500 t/min, pendant 15 min. Le sérum récupéré est immédiatement conservé à -20 °C jusqu'à utilisation.

3.1.2. Principe du test

Le test d'Ouchterlony est une technique d'immunoprécipitation fondée sur la diffusion d'antigènes et d'anticorps en milieu gélifié à partir de puits placés en vis-à-vis. Lorsque les molécules d'anticorps rencontrent les molécules d'antigènes, la liaison Ag-Ac conduit à la précipitation des complexes immuns dans la zone de rencontre. Le précipité se forme au sein de la gélose, dans la zone où les concentrations des deux solutions sont comprises dans la zone d'équivalence (**Hainque et al., 2008**).

Cette procédure de faible technologie permet plusieurs applications : l'identification des différentes fractions d'un antigène inconnu par un anticorps polyspécifique, l'évaluation et la comparaison d'anticorps dans des sérums animaux ou humains dirigés contre des antigènes protéiques ou glucidiques complexes et peut fournir des informations sur la quantité relative d'activité de l'anticorps et la nature des épitopes antigéniques dans différentes préparations (**Hornbeck, 2017**).

3.1.3. Technique

L'immunodiffusion a été réalisée en utilisant des lames porte-objet de microscopie. Les lames sont préparées en y coulant une couche de gélose à 1% sur une épaisseur d'environ 2,5 mm, préalablement liquéfiée dans du tampon véronal, pH 8,2 (composition : Annexe II) par chauffage au bain-marie, à 90 °C, pendant 1 h. Une fois la gélose est solidifiée à la T° ambiante, des puits périphériques équidistants de diamètre 3 mm sont creusés dans le gel, avec un emporte-pièce, autour d'un puits central. Ensuite, les différentes fractions antigéniques à tester sont déposées, sans dilution préalable, dans les puits périphériques à raison de 50 µl/puits, alors que l'immun-sérum du lapin est déposé, à la dilution 1/100^{ème}, dans le puits central.

Après dépôt des échantillons, les lames sont incubées à la T° ambiante dans une enceinte légèrement humidifiée par du papier filtre imprégné d'eau. Lorsque les protéines diffusent et l'équilibre est atteint, environ 48 h, les lames sont lavées plusieurs fois au sérum physiologiques pour éliminer les protéines indésirables, et les arcs de précipitation sont enfin révélés après coloration avec une solution d'amido Schwartz à 0,1% (composition : Annexe II), pendant 5 min, suivie d'une décoloration dans une solution d'acide acétique à 5%.

3.2. ELISA indirect

3.2.1. Réactifs

3.2.1.1. *Tampons* (composition : Annexe II)

- Tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M pH 9,6. Ce tampon est utilisé comme solution de dilution de l'antigène.
- Tampon PBS 0,15 M pH 7,2, Tween 20. Ce tampon sert à diluer les sérums à tester et le conjugué. Il est également utilisé comme solution de lavage.
- Tampon citrate, pH 5,5. Il est utilisé pour diluer le chromogène.
- Substrat chromogène ABTS dont le mode de préparation est présenté dans l'annexe II.

3.2.1.2. *Antigènes*

- Produit brut excrété-sécrété de *F. hepatica* (PESFh), utilisé comme antigène dans le test Elisa à la concentration de 2,5 µg/ml.
- Fraction purifiée (F.p) à partir de l'extrait somatique brut de *F. hepatica*, utilisée à la concentration de 2,5 µg/ml.

3.2.1.3. Sérums

80 sérums de bovins ont été examinés par le test Elisa afin d'y rechercher et dépister la présence d'anticorps anti- *F. hépatica*. A cet effet, des prises de sang ont été prélevées à l'abattoir d'Annaba (Seybouse, ex-Juano) à la veine jugulaire, sur des bovins juste avant l'abattage en utilisant des tubes secs, sous vide (Venoject) de 10 ml. Le sang prélevé est mis à coaguler pendant 2 h à la T° ambiante, puis centrifugé à 4 °C et 2500 t/min pendant 15 min. Le sérum surnageant est récupéré, aliquoté (200 µl) et stocké dans des tubes Eppendorf à -20 °C jusqu'à utilisation.

Des sérums de références utilisés pour corriger les valeurs densitométriques du test Elisa ont également été utilisés. Il s'agit d'un sérum standard positif constitué d'un pool de 4 sérums de bovins ayant à l'abattage une forte charge de douves adultes, et un sérum standard négatif constitué d'un pool de 4 sérums de bovins provenant d'une région indemne de la fasciolose, et ne présentant aucune lésion hépatique à l'examen post-mortem de leurs foies.

3.2.2. Principe

Il s'agit d'une technique immuno-enzymatique de détection et de quantification, qui permet de révéler la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum testé grâce à l'emploi de deux anticorps; l'un est spécifique à l'antigène de *F. hepatica* préalablement fixé par adsorption sur un support en polystyrène, le second, marqué par une enzyme chromogène, est capable de réagir avec le complexe immun (Ag-Ac) en donnant une réaction colorée détectable à des concentrations très minimales (**Lin, 2015**).

3.2.2.1. Mise au point du test

Pour la mise au point de la technique Elisa, nous avons testé :

- deux agents saturants afin de minimiser le bruit de fond : gélatine à 0,5% dans du PBS et lait écrémé en poudre à 10% dans du PBS.
- la dilution du sérum du 50^{ème} au 300^{ème}.
- la dilution du conjugué anti- IgG du 1 000^{ème} au 10 000^{ème}.
- la dilution du substrat chromogène du 10^{ème} au 100^{ème}.

3.2.2.2. Technique Retenue

Le test Elisa a été réalisé à des températures variables en plusieurs étapes, selon la méthode de **Chauvin et Boulard (1992)**. Les plaques de microtitration à 96 cupules (Nunclon Surface, NUNC, Danemark) sont sensibilisées par dépôt de 100 µl par puits

d'antigènes à 2,5 µg/ml en tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M pH 9,6 (composition : Annexe II). Après 3 lavages avec le tampon PBS 0,15 M, pH 7,2 + 0,1% Tween 20 (PBSt) (composition: Annexe II), les plaques sont incubées 1 h à 37 °C puis une nuit à 4°C. Ensuite, elles sont saturées par dépôt de 100 µl par puits de tampon PBSt additionné de gélatine à 0,5%. Après incubation de 30 min à 37 °C, le liquide est éliminé et les sérums témoins positifs et négatifs sont placés dans chaque plaque.

Les sérums témoins et les sérums à tester sont dilués au 200^{ème} dans du PBSt et déposés, à raison de 100 µl par puits, dans 4 puits pour les sérums témoins et dans 2 puits pour les sérums à tester, puis incubés 1 h à 37 °C. Après 3 lavages en PBSt, le conjugué anti- bovin IgG dilué au 10 000^{ème} dans du PBSt est déposé à raison de 100 µl par puits et incubé 30 min à 37 °C. Après plusieurs lavages en PBSt, la révélation est obtenue par addition de 100 µl par puits du chromogène ABTS (Sigma) dilué au 50^{ème} dans du tampon citrate 0,1 M pH 5, en présence du substrat H₂O₂ à 0,03% dans du tampon citrate, 0,1 M pH 5,5 (mode de préparation : Annexe II). La réaction est arrêtée après 30 min d'incubation à 37 °C, par addition de 50 µl de H₂SO₄, 2N. L'intensité de la réaction dans chaque cupule est mesurée au moyen d'un lecteur automatique de D.O (Multiskan Titertek) à 405 nm. Le **Tableau A** de l'annexe III récapitule la méthodologie de réalisation de cette technique.

3.2.3. Étude statistique

Nous avons utilisé le test de Wilcoxon (test unilatéral) pour vérifier s'il existe ou non des différences entre les deux tests ELISA utilisant chacun un réactif antigénique de nature différente : l'ELISA avec le produit excrété-sécrété (ELISA_(PES)) et l'ELISA avec la fraction purifiée (ELISA_(F.p)), appliqués simultanément pour l'analyse d'un même effectif d'échantillons (80 sérums de bovins).

Cette analyse effectuée après un test de la normalité des échantillons grâce au logiciel Ri 386 (3.5.0.2018) permettra la comparaison appariée des valeurs des D.O_{moy} obtenues pour l'ensemble des sérums analysés par les deux types d'ELISA.

4. Résultats et discussion

4.1. Préparation, dosage et concentration des extraits bruts de *F. hepatica*

4.1.1. Obtention d'antigènes stables

Au cours de cette première partie pratique, afin de mettre en évidence la complexité antigénique du parasite *F. hepatica*, et permettre une meilleure illustration de sa composition moléculaire diversifiée, nous avons mis aux points différents protocoles qui nous ont permis d'élaborer trois catégories d'antigènes bruts. Il s'agit essentiellement des antigènes d'origine métabolique libérés avec les excréctions-sécrétions du parasite dans le milieu d'incubation et les antigènes somatiques issus de la désintégration et du broyage mécanique des cellules et des tissus parasitaires. Ces deux formes antigéniques ayant fait l'objet de nombreux travaux d'ordre biochimique et immunologique, ont été préparées selon les étapes et les procédés techniques présentés précédemment dans la partie relative à l'obtention des antigènes totaux de *F. hepatica* (**Fig. 28** et **Fig. 29**, respectivement). Les antigènes tégumentaires existant sous forme de structures hétérogènes très complexes, ancrées à la surface du glycocalyx, n'ayant d'ailleurs pas suscité jusqu'à ces dernières années autant d'intérêt que les deux antigènes précédents, ont été obtenus par solubilisation de l'enveloppe externe du parasite à l'aide d'un détergent puissant, le Nonidet P-40, permettant ainsi la libération des constituants membranaires constitués principalement de glycoprotéines et de glycolipides.

Les majeures difficultés souvent rencontrées durant les différents procédés d'isolement des antigènes parasitaires, voire au cours d'une étape d'extraction ou de purification de la molécule d'intérêt, résident dans deux inconvénients primordiaux : la faible quantité d'échantillons récoltés à partir du matériel parasitaire brut qu'ils soient à l'état homogénéisé ou présents à l'état soluble dans le liquide d'incubation, et l'instabilité structurale des molécules antigéniques vis-à-vis des divers effecteurs physico-chimiques environnants (T° , pH, force ionique, pression osmotique, etc.) ou de l'existence de produits et de réactifs chimiques au sein de la solution dans laquelle sont maintenus les parasites de *F. hepatica* (sels, ions divalents, métaux lourds et détergents ioniques) ou encore à cause de la présence de certains additives (antiseptiques et éléments nutritifs) dont l'effet pourrait être inhibiteur ou dénaturant sur les constituants actifs des composés antigéniques. A cela s'ajoutent les problèmes dus aux techniques de broyage aux ultrasons, avec congélation et décongélation successives et conservation des échantillons pour une longue durée, qui pourraient également constituer des risques potentiels de dégradation protéique à ne pas sous-estimer.

D'autre part, il a été rapporté par plusieurs auteurs (**Carmona et al., 1994; Dowd et al., 2000; Sajid et McKerrow, 2002; Shriffi et al., 2014**) que le matériel antigénique de *F. hepatica*, en particulier les produits excrétés-sécrétés, renferment dans leur composition des substances labiles qui peuvent être facilement altérées par autolyse à cause de la présence d'enzymes protéolytiques libérées naturellement dans le milieu de culture des parasites. De ce fait, afin de diminuer les effets indésirables des agents dénaturants sur nos échantillons et minimiser les risques de perte de leur activité antigénique, nous avons procédé à l'extraction des différents produits antigéniques dans des conditions de travail optimales et ménagées ; toutes les étapes d'extraction et de préparation des antigènes somatiques et membranaires ont été réalisées à basse température (dans un bac à glace), dans des conditions stériles (sous hotte à flux lumineuse, à l'aide de moyens et d'instruments stériles). Les antigènes excrétés-sécrétés produits par *F. hepatica* dans leur milieu d'incubation ont également été obtenus dans des conditions d'hygiène et de stérilisation strictes : le maintien des parasites dans un milieu tamponné, en présence d'un antiseptique, l'azide de sodium (NaN_3) et d'un agent anti-protéase (PMSF), nous a permis en effet d'effectuer une incubation à l'air ambiant pour une durée assez longue par comparaison à celle de l'incubation conventionnelle réalisée généralement à l'étuve (à 37 °C), sans qu'il se produise la moindre dénaturation ou auto-dégradation des échantillons récoltés.

4.1.2. Obtention de produits antigéniques concentrés

La précipitation par des sels est un procédé analytique qui a l'avantage de concentrer les protéines présentes en faibles quantités dans les solutions aqueuses tout en éliminant certains contaminants non protéiques, indésirables (**Hainque et al., 2008**). En effet, l'état dilué des différents extraits antigéniques ainsi que leurs faibles taux en protéines, nous ont amené à soumettre tous les échantillons que nous avons récoltés à l'état brut à une précipitation par le sulfate d'ammonium (SA). Ceci est additionné en petites fractions jusqu'à ce que la concentration en sel dans la solution protéique soit à 80%, c'est à dire à la saturation nécessaire pour provoquer la précipitation de toutes les protéines solubles.

Bien que cette étape comporte, quant à elle, un pouvoir de dénaturation non négligeable du fait de l'emploi d'un sel trop concentré et de force ionique très élevée, les résultats qui en découlent, mentionnés dans le **tableau 4** ci-dessous, prouvent que le protocole de travail mis en œuvre pour la concentration des échantillons est assez performant puisqu'il a permis, d'une part, d'augmenter les concentrations des

protéines dans les différents extraits antigéniques d'un facteur allant de 3 à 6 fois par rapport à leurs concentrations initiales et diminuer, d'autre part, les taux des lipides initialement présents dans les extraits bruts d'un facteur compris entre 3 et 4.

Dans la pratique, la précipitation au SA est une opération qui semble très intéressante, en particulier lorsque les échantillons qui en résultent sont destinés à des applications analytiques d'un grand intérêt (ex. chromatographies, électrophorèse, etc.) qui font généralement appel à certains critères intrinsèques de l'échantillon à analyser (par ex. un volume et une concentration protéique adéquats), ainsi qu'à une composition dépourvue de contaminants lipidiques qui sont habituellement considérés comme constituants indésirables, souvent responsables d'une faible spécificité au cours des tests immunologiques basées sur les propriétés de reconnaissance antigènes-anticorps comme les tests d'immunodiffusion et d'ELISA.

Tableau 4 : Détermination par dosage colorimétrique des concentrations des constituants antigéniques (protéines, sucres et lipides) présents dans les différents extraits de *F. hepatica* ; à l'état brut^a et après concentration au sulfate d'ammonium (A.C)^b.

Échantillon	<i>Extrait somatique</i>			<i>Produits excrétés-sécrétés</i>			<i>Extrait tégumentaire</i>		
	Brut ^a	A.C ^b	F.C	Brut ^a	A.C ^b	F.C	Brut ^a	A.C ^b	F.C
Composé									
[Protéines] (mg/ml)	12	35,7	+3	0,85	4,93	+5,8	1,1	3,8	+3,4
[Carbohydrates] (mg/ml)	2,1	5,1	+2,4	2,3	6,7	+2,9	0,06	0,12	+2

- **F.C** (facteur de concentration) : c'est le rapport entre la concentration d'une substance après et avant précipitation au SA ou l'inverse.
- Le signe (-) de la valeur du F.C signifie la diminution de la concentration des lipides d'un facteur donné après précipitation.

4.1.3. Dosage des produits antigéniques

Le dosage des différentes substances biochimiques est basé sur le développement de réactions colorées dues à la combinaison des molécules à doser avec leurs colorants utilisés. Dans ce type de dosage, dit colorimétrique, l'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration de la substance ciblée. A cet effet, trois produits ont été utilisés comme étalons ou standards à des dilutions croissantes (BSA, D-glucose et acide oléique) pour déterminer respectivement les concentrations des protéines, des sucres et des lipides qui existent à l'état soluble soit dans les échantillons de départ (extraits bruts), soit dans les différentes fractions isolées ou purifiées au cours d'autres étapes ultérieures, par chromatographie ou électrophorèse. Chaque composé étalon réagit avec son colorant spécifique en donnant un complexe dont les nuances de couleurs deviennent plus intenses au fur et à mesure que la concentration de l'étalon augmente (**photos II, III et IV** : Annexe I). Cela a permis d'établir, après lecture au spectrophotomètre et détermination des valeurs densitométriques (DO) pour chaque gamme d'étalonnage, une courbe qui nous a ensuite servi de référence pour estimer les concentrations exactes des composés à doser (**Fig. I, II et III** : Annexe I).

D'après les résultats consignés dans le **tableau 4** ci-dessus, on constate que les protéines sont les constituants les plus abondants du matériel antigénique brut de *F. hepatica* : ils prédominent dans l'extrait somatique avec des taux très élevés (12 mg/ml) par comparaison à leurs concentrations dans les produits d'excrétions-sécrétions et l'extrait tégumentaire (respectivement 0,85 et 1,1 mg/ml). Les résultats du dosage montrent cependant des taux assez modérés pour les sucres et les lipides dans les différents extraits bruts de *F. hepatica*, avec une nette prédominance d'une part pour les sucres présents dans les produits excrétés-sécrétés (2,3 mg/ml contre 2,1 et 0,06 mg/ml dans l'extrait somatique et l'extrait tégumentaire respectivement), et d'autre part pour les lipides présents dans l'extrait somatique (2,8 mg/ml contre respectivement 0,185 et 0,11 mg/ml dans les produits excrétés-sécrétés et l'extrait tégumentaire).

Selon des travaux décrits dans la littérature, les protéines existent majoritairement au niveau du parasite à l'état combiné avec des sucres et des lipides, soit sous forme de glycoprotéines ou de lipoprotéines impliqués probablement dans divers processus d'interaction hôte-parasite, notamment dans la variation de la composition antigénique du glycocalyx, permettant ainsi l'échappement et la protection du parasite vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte (**Hanna, 1980a; Trudgett *et al.*, 2000; Aldridge et O'Neill, 2016**).

Par ailleurs, d'autres études ont démontré que les protéines en tant que constituants principaux du tégument et des produits excrétés-sécrétés, possèdent un pouvoir antigénique considérable et sont responsables de la virulence des formes larvaires de *F. hepatica* durant leur migration à travers la cavité péritonéale et le parenchyme hépatique vers la lumière du canal biliaire (Wilson *et al.*, 2011; Haçariz *et al.*, 2014). Toutefois, les carbohydrates, en particulier les résidus glycosylés, sont considérés de manière générale comme étant des substances dépourvues d'activité immunologique, ce qui se traduit souvent par une faible sensibilité par rapport aux protéines lors des tests sérologiques (Cervi *et al.*, 1992; Gaudier *et al.*, 2012).

4.2. Fractionnement, purification et analyses électrophorétiques des échantillons

4.2.1. Obtention des fractions enrichies d'antigènes

Pour la séparation des constituants protéiques de *F. hepatica* et l'obtention d'un maximum de fractions enrichies d'antigènes, nous avons eu recours au fractionnement des échantillons parasitaires en utilisant une chromatographie de filtration sur gel Sephadex G-200. Les tracés chromatographiques obtenus à l'issue de cette manipulation, correspondant aux différents extraits analysés, à savoir l'extrait somatique, le produit d'excrétion-sécrétion et l'extrait tégumentaire, font apparaître des profils d'aspects distincts, dont le nombre des fractions obtenues est différent : le profil d'élution obtenu après chromatographie de 1 ml d'homogénat somatique brut (12 mg de protéines), a montré cinq fractions antigéniques (Fig. 30). La 1^{ère} fraction (F.1) obtenue juste après le volume mort de la colonne, dans un volume d'élution compris entre 18 et 35 ml, apparaît sous forme d'un pic asymétrique, très développé avec une branche ascendante, abrupte correspondant aux concentrations protéiques les plus élevées. Les autres fractions (F.2, F.3, F.4 et F.5) apparues successivement dans des volumes d'élution allant de 35 jusqu'à 100 ml, sont représentées par des pics mineurs, presque identiques et espacés, indiquant manifestement une bonne résolution chromatographique.

En revanche, les produits excrétés-sécrétés et tégumentaires, dont les profils d'élution sont illustrés par la figure 31 et la figure 32 respectivement, fractionnés après concentration au SA par la même technique chromatographique dans des conditions de travail identiques à celles fournies pour l'extrait somatique brut, n'ont révélé que peu de fractions : le 1^{er} produit n'a donné en fait que trois pics dont deux majeurs séparés par un pic mineur, alors que le 2^{ème} a montré quatre pics hétérogènes parmi lesquels un seul de taille assez développée, présentant un plateau très étalé qui correspond aux fractions les plus riches en protéines.

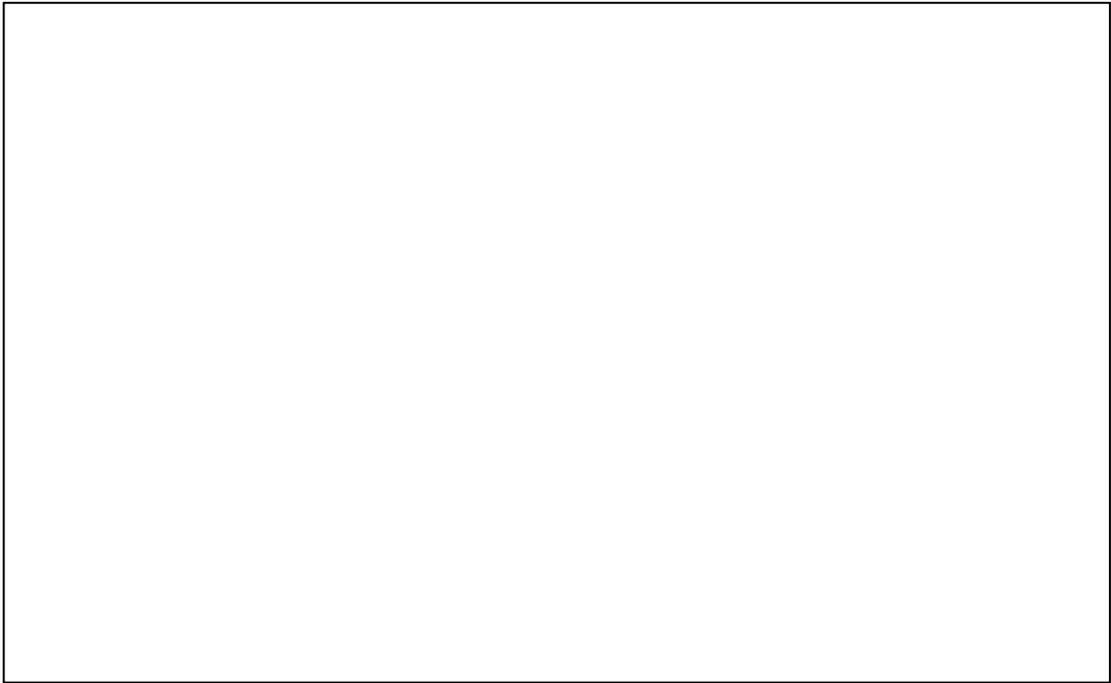


Figure 30 : Tracé de la séparation chromatographique de l'extrait somatique brut sur gel Sephadex G-200. Colonne : 1,1 x 65 cm ; Eluant : tampon PBS 0,15 M pH 7,2 ; Débit : 25 ml/h ; Fractions collectées : 2 ml.

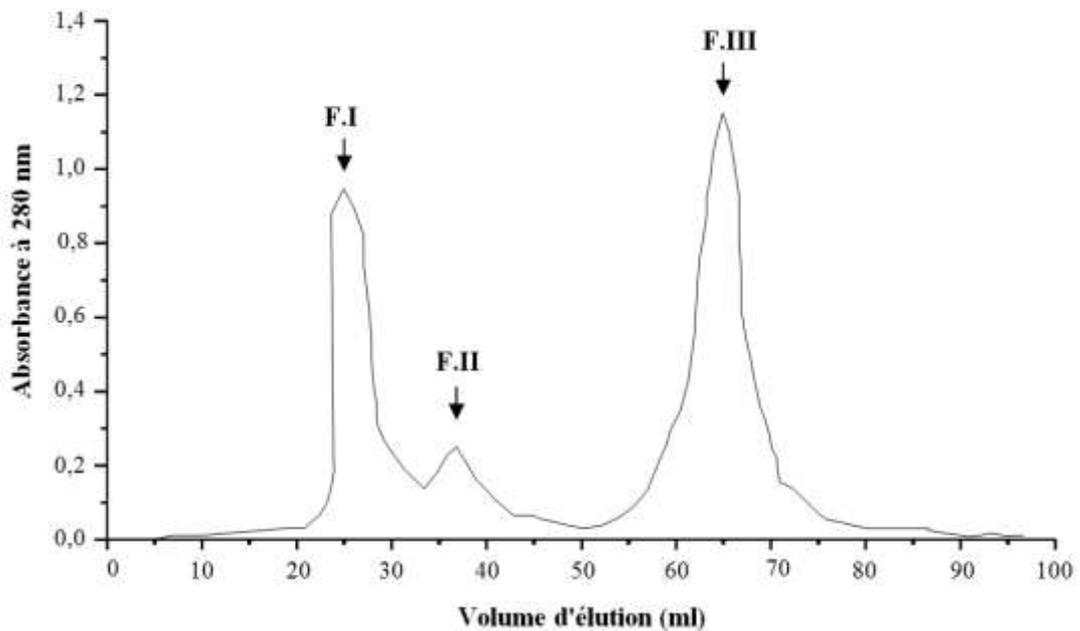


Figure 31 : Tracé de la séparation chromatographique du produit excrété-sécrété, après concentration au SA, sur gel Sephadex G-200. Colonne : 1,1 x 65 cm ; Eluant : tampon PBS 0,15 M pH 7,2 ; Débit : 25 ml/h ; Fractions collectées : 2 ml.

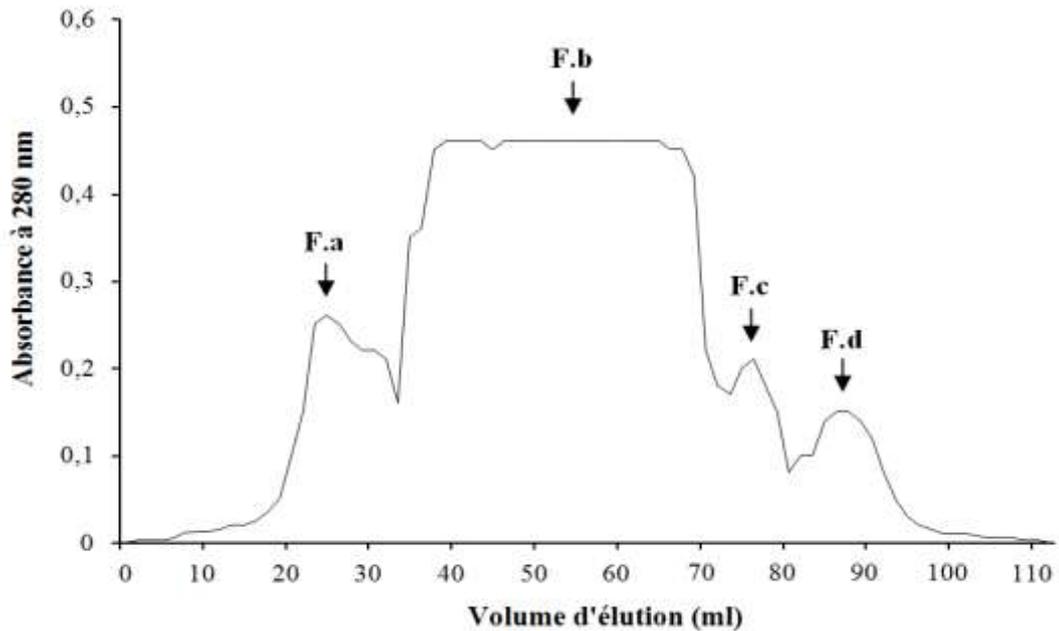


Figure 32 : Tracé de la séparation chromatographique de l'extrait tégumentaire, après concentration au SA, sur gel Sephadex G-200. Colonne : 1,1 x 65 cm; Eluant : tampon PBS 0,15 M pH 7,2 ; Débit : 25 ml/h ; Fractions collectées : 2 ml.

Bien que les produits antigéniques de *F. hepatica* soient connus et étudiés depuis plusieurs décennies avant d'être utilisés à grande échelle comme réactifs pour des fins diagnostiques (Oldham, 1983; Ruiz-Navarrete *et al.*, 1993; Palmer *et al.*, 2014) ou des essais vaccinaux (Muro *et al.*, 1997; Jayaraj *et al.*, 2009; Maggioli *et al.*, 2016) dans la lutte contre ce parasite, les travaux décrits dans la littérature portant sur la purification et la caractérisation des antigènes isolés à partir de *F. hepatica* sont très peu nombreux et dans la plupart des cas moins concluants en ce qui concerne cet aspect pratique.

Toutefois, nos résultats sont en nette concordance avec ceux dégagés par les quelques études citées précédemment : ils se rapprochent en effet des résultats démontrés par Cecchini et Kasali (1989) qui, en filtrant le broyât total de douves adultes de *F. hepatica* sur gel Sephadex G-200 ont déterminé six fractions peptidiques dont la 2^{ème} fraction, ayant le PM le plus supérieur, a révélé par le test Elisa une activité immunologique semblable à celle du produit excrété-sécrété. Aussi, ils concordent parfaitement avec les résultats rapportés par Cervi *et al.* (1992) qui ont constaté, parmi les six fractions obtenues par fractionnement de l'homogénat total de *F. hepatica* sur gel Sephadex G-100, l'existence de deux fractions (F.I_a et F.I_b) ayant la capacité de révéler un comportement antigénique identique vis-à-vis de l'antisérum spécifique. Elles se sont alors inscrites dans la 1^{ère} fraction (F.I) et, par conséquent, cinq fractions

antigéniques qui diffèrent par leur composition chimique et leurs propriétés immunologiques sont retenues comme résultat final de cette étude.

Le fractionnement des produits excrétés-sécrétés récoltés à partir d'une solution saline dans laquelle sont incubées des douves adultes de *F. hepatica* pendant 4 à 6 h, à 37 °C, par chromatographie d'exclusion moléculaire standard à basse pression (**Zimmerman et Clark 1986**), a permis l'obtention de quatre pics distincts. Certaines des fractions immunoréactives, obtenues à l'issue de cette chromatographie, sont identifiées par Dot-ELISA comme étant des épitopes spécifiques pour l'immunodiagnostic de la fasciolose bovine.

En outre, des résultats similaires (quatre pics) sont obtenus en fractionnant à l'état brut ce même produit parasitaire à l'aide d'une chromatographie liquide dite de protéine rapide (FPLC), sur une colonne Superdex 75 HR (**Mezo et al., 2003**). Il en ressort que seuls les antigènes contenus dans le pic IV (peptides de 7 à 40 kDa, révélés par SDS-PAGE) sont spécifiques lorsqu'ils sont utilisés dans le diagnostic sérologique des animaux infestés, par le test ELISA. L'obtention lors de ces deux travaux d'un nombre de pics supérieur à celui obtenu dans notre travail, s'explique par l'emploi de méthodes chromatographiques plus performantes permettant l'obtention d'une meilleure résolution chromatographique de l'échantillon analysé.

D'autre part, afin de faciliter l'identification de polypeptides spécifiques destinés à l'analyse par Western blot vis-à-vis de l'anti-sérum humain, **Morales et Espino (2012)** ont fractionné l'extrait tégumentaire à l'aide d'une chromatographie de gel filtration, à travers une colonne de Superose HR 12/300, et obtiennent un tracé chromatographique renfermant quatre pics, dont le profil est comparable à celui obtenu dans notre cas par fractionnement du même produit sur gel Sephadex G-200. Plusieurs polypeptides de l'ordre de 52, 38, 24-26 et 12-14 kDa sont identifiés par Western blot comme étant les composants les plus immuno-réactifs dans l'extrait tégumentaire de *F. hepatica*, alors que l'analyse par la technique dite de désorption-ionisation laser assistée par matrice en spectrométrie de masse (MALDI-MS-MS) a révélé parmi ces peptides, la présence de certaines enzymes telles que l'énolase, l'aldolase, la GST et la FABP.

Le **tableau 5** ci-dessous regroupe les valeurs densitométriques ($DO_{moy.}$) lues au spectrophotomètre ainsi que les résultats relatifs au dosage des protéines, des carbohydrates et des lipides existants dans les différentes fractions antigéniques obtenues à l'issue du fractionnement de l'homogénat somatique brut de *F. hepatica* à travers une colonne de gel Sephadex G-200. D'après les données du tableau, on remarque que toutes les fractions antigéniques séparées par filtration sur gel sont des glycoprotéines. Les proportions d'association protéine-carbohydate se révèlent plus importantes dans les fractions antigéniques F1, F2 et F3 par rapport aux autres fractions (F4 et F5), et prédominent nettement dans la composition de la 1^{ère} fraction.

Les résultats concernant la nature glycoprotéique des fractions isolées sont compatibles avec ceux constatés par **Cervi et al. (1992)** qui, par analyse électrophorétique SDS-PAGE des cinq fractions issues d'une filtration sur gel Sephadex G-100 suivie d'une coloration au bleu de Coomassie combinée à une coloration PAS, ont constaté que les fractions colorées sont toutes des glycoprotéines de PM allant de 14 à 94 kDa, parmi lesquelles une seule fraction riche en protéines et en carbohydrates (4,5 et 1,25 mg/ml respectivement) s'est révélée très réactive avec la ConA et est donc purifiée sur colonne d'affinité. Selon ces mêmes auteurs, le rapport protéine/glucide était impliqué dans l'induction d'une réaction d'hypersensibilité retardée chez des rats immunisés par cette fraction antigénique.

Contrairement aux protéines et aux carbohydrates, les taux des lipides dans les différentes fractions antigéniques, à l'exception de la 1^{ère} fraction, sont négligeables au point que les résultats du dosage de certaines fractions (F.4 et F.5) sont nuls.

Les lipides bien qu'ils n'assurent aucun rôle sur le plan antigénique et n'interviennent pas dans les modalités d'interaction hôte-pathogène (**Korach et Benex, 1966**), il leur revient le rôle principal dans le transfert et le transport des métabolites et des nutriments provenant de l'hôte ainsi que le stockage de certains éléments minéraux (**Kozat et Denizhan, 2010**).

Tableau 5 : Résultats obtenus par le dosage colorimétrique des constituants antigéniques présents dans l'extrait somatique brut de *F. hepatica* et dans les fractions issues du gel filtration de cet extrait sur Sephadex G-200.

	Extrait brut initial	Fractions issues du gel filtration				
		F.1	F.2	F.3	F.4	F.5
Lecture $DO_{moy.}$	0,72*	0,35*	0,18*	0,10*	0,328	0,11
[Protéines] (mg/ml)	12	5,7	2,85	1,65	0,53	0,15
Lecture $DO_{moy.}$	0,24*	0,16*	0,39	0,31	0,07	0,09
[Carbohydrates] (mg/ml)	2,1	1,3	0,35	0,28	0,05	0,07
Lecture $DO_{moy.}$	0,12*	0,08*	0,08	0,03	-	-
[Lipides] (mg/ml)	2,8	2,14	0,11	0,075	-	-

N.B : Les valeurs marquées d'Astérix (*) sont obtenues après une dilution $1/10^{\text{ème}}$ de l'échantillon à doser.

4.2.2. Obtention de la fraction purifiée 40 kDa

Seule la 1^{ère} fraction (F.1), issue de la filtration sur gel de l'extrait brut de *F. hepatica*, est purifiée à travers une colonne d'affinité ConA- Sepharose 4B, et le profil chromatographique obtenu est donné par la **figure 33**.

Avant la réalisation de cette étape, la nature glycoprotéique des antigènes présents dans toutes les fractions somatiques a d'abord été vérifiée par la réaction de précipitation en milieu liquide ou réaction de "ring test", en présence d'une lectine, la ConA ; substance naturelle capable de reconnaître spécifiquement une structure glycanne, et permet ainsi de fractionner les glycoprotéines en fonction de l'accessibilité des résidus mannosyls et/ou glucosyls de leur chaîne glycanne (**Farahnak et al., 2010; McAllister et al., 2011; Ravidà et al., 2016**).

La 1^{ère} fraction (F.1), dont le taux en carbohydrates est très élevé par rapport aux autres fractions, a effectivement montré une réaction fortement positive vis-à-vis de la

ConA, se traduisant par la formation d'un anneau clairement individualisé (résultat non présenté). Cette propriété de liaison (interaction covalente entre la ConA et les résidus glycosylés) est donc mise à profit pour purifier les composés protéiques des contaminants glucidiques liés à la F.1, en utilisant le gel d'affinité ConA-Sepharose 4B. Suite à cette purification, deux pics sont mis en évidence : le 1^{er} correspondant aux fractions récupérées en premier temps dans le tampon Tris, représente la molécule protéinique non adsorbée sur la lectine ConA (fraction non- liée), le second représente la fraction glucidique adsorbée (fraction liée), éluée ensuite à l'aide d'une solution concentrée de D-glucose. Le dosage de la molécule purifiée, dont l'homogénéité est examinée par électrophorèse SDS-PAGE, a révélé une forte proportion de protéines contrairement à la fraction adsorbée qui en est complètement dépourvue.

Ce type de chromatographie basée sur l'utilisation de supports actifs capables d'adsorber spécifiquement des substances d'intérêt biologique, s'est révélé depuis plusieurs décennies comme une technique fiable, permettant à de nombreux auteurs de purifier à homogénéité des produits antigéniques appartenant à diverses espèces parasitaires. C'est pourquoi, cette technique est appliquée avec succès pour isoler la fraction glycoprotéique 27 kDa de *Fasciola gigantica* par **Ghosh et al. (2005)** sur une matrice de gel couplée à la ConA.

En outre, elle a servi à l'isolement d'un antigène somatique en purifiant le broyat de douves adultes sur un gel Sepharose sur lequel sont immobilisées des δ - globulines anti-*Shistosoma mansoni* (**Shaker et al., 1994**).

Plus récemment, des glycoprotéines faisant partie intégrante du tégument des formes juvéniles de *F. hepatica* nouvellement enkystées (FhNEJ) sont purifiées par affinité après biotinylation ciblée des glycanes, puis identifiées par chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem. Parmi les protéines identifiées au niveau du tégument de ces formes larvaires de *F. hepatica*, dix-huit glycoprotéines ont été détectées dans la fraction glycosylée, parmi lesquels des cathepsins de *F. hepatica* (FhCB3, FhCL1, FhCL3) (**Garcia-Campos et al., 2016**).

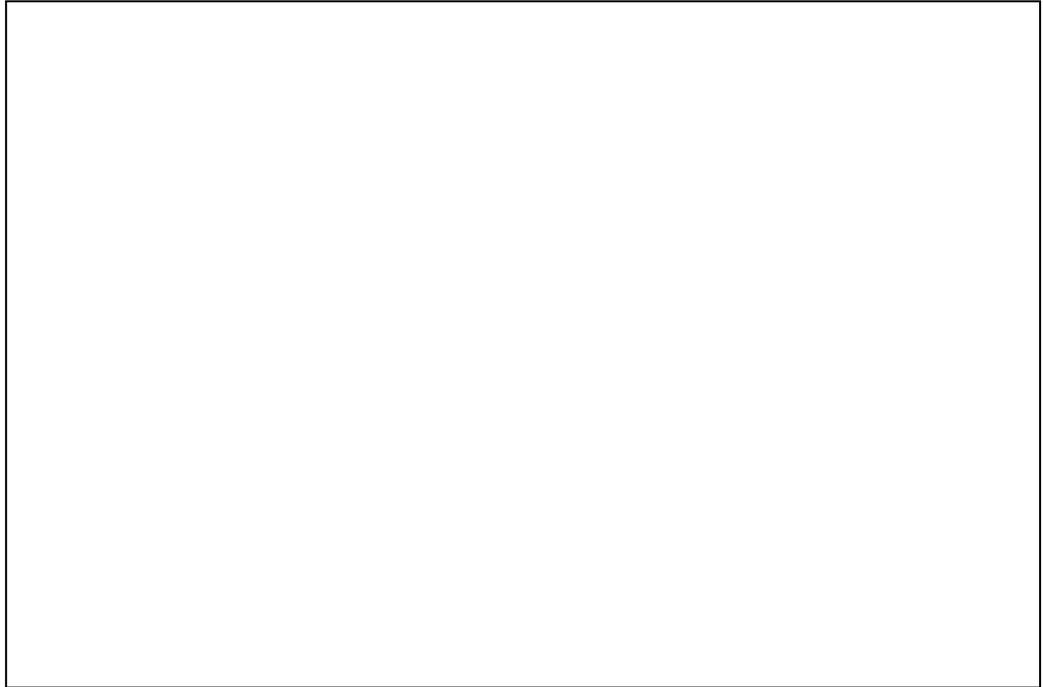


Figure 33 : Tracé de la purification par chromatographie d'affinité ConA- Sepharose 4B de la 1^{ère} fraction (F.1) sortie gel Sephadex G-200. Colonne d'affinité : 1 x 15 cm ; Éluant : Tris 10 mM, pH 7,2 contenant 0,5 M NaCl, 1 mM MnCl₂ et 1 mM CaCl₂ ; Débit : 12 ml/h ; Fractions collectées: 2 ml.

4.2.3. Électrophorèse SDS-PAGE et estimation des masses moléculaires

L'électrophorèse SDS-PAGE est effectuée dans le but de mettre en évidence la complexité de la composition protéique de *F. hepatica*, dénombrer approximativement l'ensemble des fractions antigéniques séparées et estimer leurs masses moléculaires apparentes.

L'analyse électrophorétique réalisée sur les différents extraits antigéniques bruts, en présence des marqueurs de poids moléculaires standards, a permis d'avoir comme résultat des profils relativement similaires (**Fig. 34**). En effet, par une simple comparaison de ces profils, on remarque une grande similitude entre la migration électrophorétique de l'extrait somatique et celle du produit excrété-sécrété, en particulier au niveau d'une large gamme de protéines de PM situés entre 10 et 110 kDa. En outre, des homologues partielles peuvent être constatées entre le profil de l'extrait tégumentaire et celui de l'extrait somatique dans des zones de migration électrophorétique de protéines de faibles PM (de 40 à 75 kDa) et de protéines de PM élevés (de 130 à 180 kDa). L'existence d'une telle communauté antigénique entre les

différents types de produits parasitaires a déjà été rapporté par de nombreux auteurs (**Ruiz-Navarrete *et al.*, 1993**; **De Almeida *et al.*, 2007**; **Elsagheir *et al.*, 2015**), qui ont noté par le biais de leurs travaux portant sur l'identification et la caractérisation des antigènes totaux de *F. hepatica*, que certains composants peptidiques qui existent dans le produits antigéniques excrétés-sécrétés sont aussi présents dans l'extrait somatique brut.

L'analyse électrophorétique de l'extrait somatique brut (**Fig. 34 B**) permet de distinguer plus de 25 bandes peptidiques, alors qu'au moins 12 bandes peuvent apparaître au niveau du profil de migration du produit excrété-sécrété (**Fig. 34 C**). Les composants antigéniques de l'extrait somatique les plus abondants sont des groupes de peptides de PM compris entre 10 à 29 et 35 à 90 kDa, ainsi que divers peptides de PM supérieurs, de l'ordre d'environ 130, 150, 160, 170, 190 et 200 kDa, qui sont nettement visualisés.

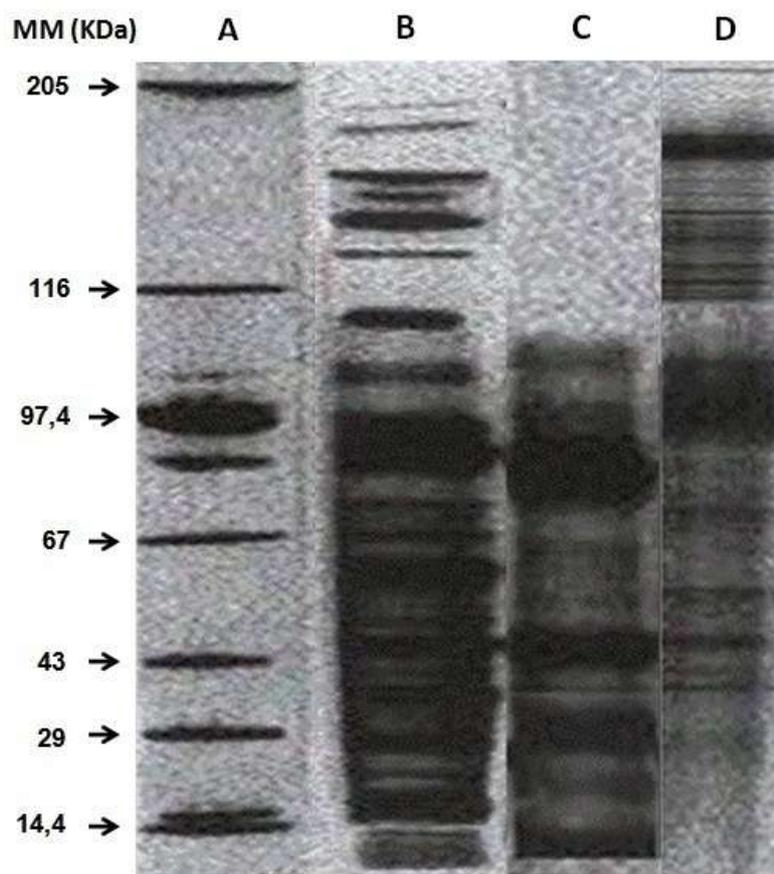


Figure 34 : Profils d'analyse électrophorétique des différents extraits antigéniques bruts de *F. hepatica* sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE à 12% : l'extrait somatique (**B**), le produit excrété-sécrété (**C**) et l'extrait tégumentaire (**D**), en présence de marqueurs de poids moléculaires standards (**A**). Le gel est coloré au nitrate d'argent.

Le cliché d'électrophorèse (**Fig. 35**) présente les profils des différentes fractions séparées par chromatographie sur gel Sephadex G-200 (F.1, F.2, F.3, F.4 et F.5) et celui de la fraction purifiée (F.p) sur gel d'affinité ConA- Sepharose 4B. La migration électrophorétique de la F.1 montre, en plus de quelques polypeptides de faible PM de l'ordre de 25 à 45 kDa ainsi que deux bandes peptidiques de haut PM avoisinant 200 kDa, deux groupes de bandes majeures de PM moyens qui sont communs avec ceux de l'extrait somatique brut. La F.3 contient principalement trois composants antigéniques de PM différents d'environ 42, 73 et 80 kDa, alors que la majorité des bandes apparaît au niveau des pistes de migration des F.2 et F.4. Ces deux fractions ayant une composition peptidique presque similaire sur une gamme de PM différente, ont en fait plusieurs antigènes en commun dans l'intervalle de PM situés entre 45 à 70 kDa. L'apparition de bandes mineures au niveau de la piste de migration de la F.5, d'aspect invisible est probablement due à l'existence de faible quantité de protéines, qui pourrait être à l'origine de l'absence d'activité antigénique de cette fraction, par le test d'immunodiffusion.

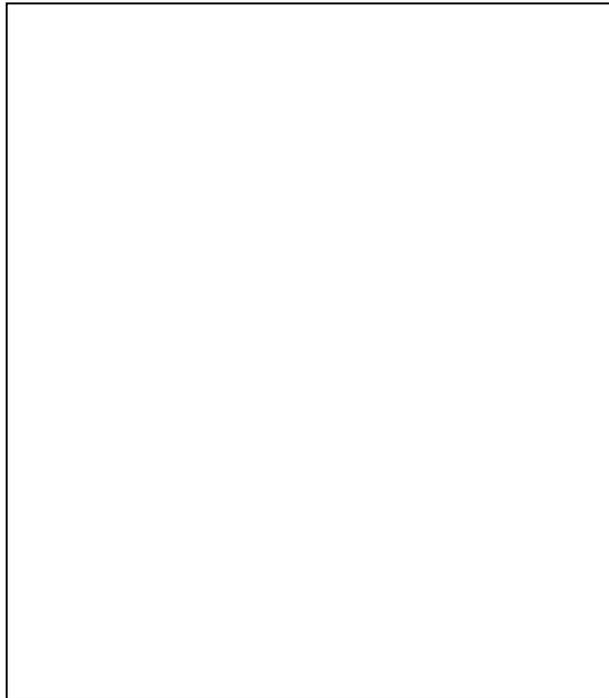


Figure 35 : Profils d'analyses électrophorétiques sur SDS-PAGE à 12% des différentes fractions antigéniques sortie gel Sephadex G-200 (F.1, F.2, F.3, F.4, F.5) ainsi que la fraction purifiée (F.p) sortie gel d'affinité ConA-Sepharose 4B. Le gel polyacrylamide est coloré au nitrate d'argent.

L'examen du profil électrophorétique relatif à la F.1 montre l'élimination de plusieurs fractions peptidiques par rapport à l'échantillon de départ (l'extrait somatique brut). Cela signifie nettement une séparation partielle suite au fractionnement de ce produit par chromatographie de gel filtration. Puis, on constate, après purification de la F.1 par affinité, l'apparition d'une bande unique, ce qui prouve que cette molécule est purifiée à homogénéité avec un degré de pureté satisfaisant.

En se basant sur la mobilité électrophorétique relative des marqueurs à poids moléculaires connus, la masse moléculaire de la fraction purifiée (F.p) est estimée à environ 40 kDa. Cette molécule antigénique purifiée suite à la combinaison de deux méthodes chromatographiques, s'approche de la fraction 43 kDa spécifique du genre *Fasciola*, isolée à partir de l'homogénat total de douves adultes de *F. hepatica*, par **Shaker et al. (1994)** en utilisant une colonne d'affinité de gel Sepharose-4B sur lequel sont couplées des δ - globulines anti- *Schistosoma mansoni*. **Ruiz-Navarrete et al. (1993)**, en analysant les divers constituants antigéniques de *F. hepatica* adulte par Western blot en présence de sérums de moutons expérimentalement infestés, ont constaté que plusieurs fractions identifiées, de PM différents de l'ordre de 20, 30, 35 et 72 kDa, sont spécifiquement reconnus par les sérums de bovins dès la 2^{ème} semaine d'infestation. Ils ont par ailleurs remarqué que la fraction 35 kDa est toujours fortement reconnue pendant 6 à 8 SPI.

Une étude plus récente, menée par **De Almeida et al. (2007)**, portant sur l'identification des antigènes spécifiques par Western blot en présence de sérums provenant de patients atteints de fasciolose associée à d'autres parasitoses, a révélé dans l'homogénat de *F. hepatica* 16 bandes reconnus par les sérums humains, de PM compris entre 8 et 110 kDa, parmi lesquelles des fractions de 8, 9, 10, 38, 45 et 57 kDa sont spécifiques de *Fasciola*.

D'autre part, des études similaires réalisées auparavant (**Santiago et Hillyer, 1988; Qureshi et al., 1995; Hammami et al., 1997**) ont rapporté que l'ensemble des fractions peptidiques ayant des masses moléculaires entre 30 et 38 kDa sont détectables dès la 2^{ème} SPI par les sérums immuns de plusieurs espèces, en particulier d'ovins et de bovins. A la lumière de ces données, il est possible que la molécule qu'on a pu isoler et purifier à partir de l'extrait somatique brut de *F. hepatica* puisse correspondre à la fraction 38 kDa de cette catégorie d'antigènes précocement détectés dans les sérums de nombreuses espèces animales comme une fraction immuno-réactive dominante.

4.3. Étude sérologique de l'activité immunologique des fractions isolées

4.3.1. Détection de l'immuno-réactivité par immunodiffusion

L'étude sérologique par la technique de double diffusion d'Ouchterlony est effectuée pour but de révéler l'immuno-réactivité des différentes fractions séparées par chromatographie, ce qui permettra d'identifier, au préalable, parmi ces fractions testées celles qui ont un pouvoir antigénique permettant une meilleure application dans la détection d'anticorps spécifiques au cours du diagnostic de la distomatose due à *F. hepatica*.

L'immunodiffusion a permis en effet de déceler des réactions d'immuno-réactivités positives au niveau de la majorité des fractions issues du gel filtration de l'extrait somatique brut ainsi qu'au niveau de la fraction purifiée (**Fig. 36**) ; toutes les fractions antigéniques déposées dans les puits périphériques sur la couche de gélose ont produit des arcs de précipitation nettement visibles avec l'antisérum du lapin déposé, quant à lui, dans le puits central, à l'exception de la fraction n° 5 (F.5) qui s'est révélé négative par ce test (**Fig. 36 A**). En outre, la fraction non-liée ou purifiée (F.p), contrairement à la fraction liée, a montré une réaction d'immuno-réactivité positive vis-à-vis de l'immun-sérum, se traduisant par une ligne de précipitation colorée (**Fig. 36 B**). En revanche, aucune réaction de précipitation positive n'est observée lorsque les mêmes fractions sont testées en présence du sérum normal (**Fig. 36 C**). La fraction non-liée est donc dotée d'un pouvoir antigénique en raison de sa nature purement protéinique, alors que la fraction liée riche en glucides en est dépourvue. Cela prouve que les composés glycosylés, en particulier les composés regroupant dans leurs structures des résidus D- glucose et/ou D- mannose, sont dénués de toute activité immuno-réactive, et se manifestent souvent par une très faible sensibilité par rapport aux protéines qui peuvent seuls jouer un rôle essentiel sur le plan antigénique.

Le diagnostic biologique de la fasciolose est parfois établi par les examens parasitologiques des selles permettant de visualiser les œufs caractéristiques du parasite, mais repose essentiellement, surtout à la phase d'invasion de la maladie, sur les techniques sérologiques à la fois plus fiables et plus précises : les méthodes quantitatives (immunofluorescence et hémagglutination) et les réactions qualitatives, immuno-électrophorèse et co-électrosynérèse (**Jemli *et al.*, 1987; Charlier *et al.*, 2008**). Les faibles sensibilité et spécificité des techniques quantitatives sont dues aux réactions croisées avec les composants antigéniques d'autres trématodes voire d'autres helminthes

(Meissonnier et Mage, 2007; Kajugu *et al.*, 2015). Par contre, la spécificité des méthodes qualitatives est meilleure car basée sur la reconnaissance d'antigènes spécifiques ; c'est ainsi que l'immunodiffusion double, bien qu'il soit une méthode qualitative, a été utilisée avec succès pour l'identification d'un antigène immuno-réactif, spécifique du genre *Fasciola*, après avoir été isolé à partir du tégument par traitement chimique à l'aide du Nonidet P-40 (Hillyer, 1980). Elle a également été appliquée pour la mise en évidence des réactions d'identité partielle entre deux antigènes spécifiques de *F. hepatica* (Fas1 et Fas2) ayant montré des activités protéolytiques identiques de type cystéine, mais avec des spécificités de clivage différentes (Cordova *et al.*, 1997), ainsi que pour la différenciation entre diverses espèces de *Fasciola* (Allam *et al.*, 2002). En plus, ce test a constitué un outil simple et utile pour la détection d'anticorps spécifiques dans les sérums de plusieurs espèces animales atteintes de fasciolose (Jemli *et al.*, 1987; Linh *et al.*, 2003; Adedokun *et al.*, 2008), en particulier dans des zones à forte fréquence d'infestation, où il y'a peu de moyens de diagnostic.

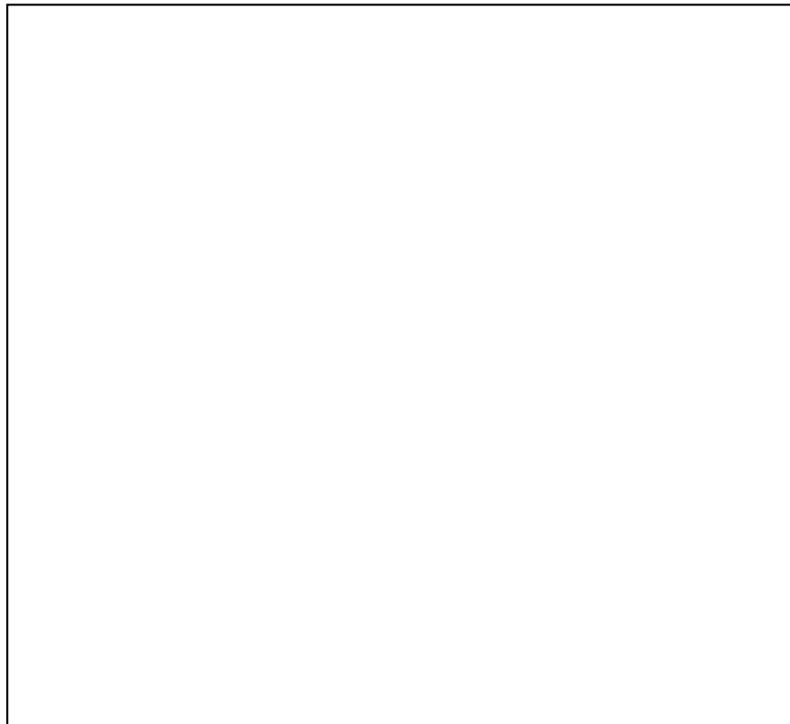


Figure 36 : Test d'immunodiffusion révélant des réactions de précipitation positives. **(A)** : entre l'anti-sérum (puits central) et les fractions F.1 (puits 1), F.2 (puits 2), F.3 (puits 3), F.4 (puits 4) et F.5 (puits 5). **(B)** : entre l'anti-sérum (puits central) et la fraction non- liée sur ConA-Sepharose 4B ou fraction purifiée (puits 1), la fraction liée (puits 2). **(C)** : témoins négatifs.

4.3.2. Étude immunodiagnostic par le test ELISA

4.3.2.1. Objectif de l'enquête sérologique

Cette étude portant sur l'examen sérologique de sérums correspondant à 80 bovins sacrifiés à l'abattoir, et prélevés à des temps variables sur une période d'une année, a pour objectif de vérifier la spécificité immunologique de la molécule purifiée (F.p) utilisée comme réactif antigénique par le test ELISA, et d'évaluer son potentiel diagnostique pour la recherche d'anticorps sériques chez les animaux infestés naturellement par *F. hepatica*, ce qui permettra d'estimer la prévalence réelle des animaux séropositifs dans cette zone d'étude qui fait partie des régions du littoral Nord-est algérien connues par leur haute prévalence fasciolienne, où la maladie sévit avec des taux d'infestation importante dans les cheptels bovins, estimés à l'abattoir de Jijel à 27,2% entre 1994 et 1996 (**Mekroud et al. 2004**) et à 26,7% entre 1999 et 2001 (**Mekroud et al. 2006**), et atteint des niveaux alarmants dans les régions de skikda et El-Tarf avec des prévalences respectives d'environ 43% (**Al-Atrakji, 2004**) et 52% (**Boucheikhchoukh et al. 2012**).

Afin de mieux apprécier les performances immunodiagnostic de notre antigène purifié, un autre test ELISA utilisant le PES des douves adultes de *F. hepatica*, a été effectué en parallèle avec le 1^{er} test dans les mêmes conditions de travail. Cela est justifié par le fait que l'antigène du PES a été largement utilisé à l'état brut, sans aucune étape de préparation ou purification biochimique, pour développer plusieurs tests de dépistage sérologique de la fasciolose (**Carnevale et al., 2001a; Simsek et al., 2006; El Ridi et al., 2007; Elsibaei et al., 2013**), en particulier par le test ELISA dont la sensibilité s'est révélée plus significative que celle de la méthode de mise en évidence des œufs du parasite dans les matières fécales.

4.3.2.2. Expression des résultats et détermination du seuil de positivité

L'ensemble des sérums collectés sont analysés en duplicata, à l'aide de deux cycles Elisa. Pour chaque cycle, un réactif antigénique différent a été utilisé : un test ELISA avec comme antigène la fraction F.p (ELISA_{FP}) et une variante de celle-ci utilisant l'antigène excrété-sécrété (ELISA_{PES}). Dans les deux cas, le résultat sérologique est exprimé, pour chaque sérum, sous forme d'une lecture densitométrique fournie automatiquement par l'appareil (Lecteur ELISA). Dans les **tableaux B** et **C** de l'annexe III sont présentées les valeurs de densités optiques D.O correspondants aux 80 sérums testés en double essais par ELISA_(FP) et par ELISA_(PES) par ordre respectif, ainsi que celles fournies

pour les sérums témoins (positifs et négatifs) déposés dans la 2^{ème} rangée de chaque plaque d'ELISA.

Les moyennes des densités optiques obtenues dans les puits témoins et dans chaque deux puits tests (échantillons testés en double dans les rangées 3 à 12 de chaque plaque de microtitration) sont calculées respectivement. La moyenne obtenue dans les puits témoins est retranchée automatiquement par l'appareil de celle obtenue dans les puits tests. Ceci permettra de tenir compte de l'intervention des réactions non spécifiques pour une partie de la valeur de D.O obtenue dans les puits tests. Une valeur relative (R) de chaque sérum à tester (X) est alors exprimée en pourcentage et corrigé par rapport aux sérums de référence, selon la formule suivante (**Boulard et Regnault, 1989; Bent Mohamed *et al.*, 2003**) :

$$(R) = \%AC_{(X)} = \frac{\text{DO sérum à tester} - \text{DO témoin négatif}}{\text{DO témoin positif} - \text{DO témoin négatif}} \times 100$$

Ensuite, les résultats sont validés par rapport à un seuil de positivité de la technique qui correspond, selon des études antérieures, à la moyenne des densités optiques (D.O) des sérums témoins négatifs plus trois fois l'écart type des D.O de ces sérums (**Jemli *et al.*, 1987; Bent Mohamed *et al.*, 2003; Salimi-Bejestani *et al.*, 2005**), soit une valeur de 0,22 pour notre cas. Puisque cette valeur correspond à 30% de la moyenne des D.O. des sérums témoins positifs, le seuil de positivité est alors fixé à 0,30 et les résultats sérologiques sont par conséquent définis suivant trois intervalles :



4.3.2.3. Validation du test ELISA

L'analyse statistique par le test non paramétrique de Wilcoxon nous a permis de comparer les valeurs des D.O_{moy} obtenus par l'ELISA_(FP) et ceux obtenus par l'ELISA_(PES). Il en résulte un p-value = 0,01342 (p<0,05). Ceci implique qu'il existe une différence significative entre les deux types d'analyses, qui pourrait être due au pouvoir immunodiagnostic très élevé de l'un des deux antigènes, dont l'effet se répercutera évidemment sur la performance du test ELISA.

Par ailleurs, l'appréciation de la fiabilité des résultats obtenus par un test de diagnostic dans un effectif d'animaux dépend d'une variable qualitative binaire qui sert de référence pour confirmer un résultat positif ou négatif dégagé par ce test, par exemple la présence ou l'absence de parasites dans le foie à l'inspection post mortem, d'œufs de parasites dans les fèces à l'examen coproscopique (Meissonnier et Mage, 2007).

D'autre part, d'après McKenna et Dohoo (2006), l'évaluation d'un test caractérisé par sa sensibilité et sa spécificité, n'est possible que si on dispose d'un test standard ("gold standard" des anglo-saxons) ou d'une association de tests qui permettent de certifier et d'optimiser son utilisation.

Dans les **tableaux D** et **E** de l'annexe III, sont reproduits les résultats des analyses sérologiques obtenus sur la totalité des sérums examinés par ELISA, de façon à pouvoir présenter les valeurs des D.O moyennes ($DO_{moy.}$) et les taux relatifs d'anticorps sériques (%Ac) déterminés pour chaque échantillon ainsi que le statut de l'animal testé, établi en fonction du résultat de la sérologie effectuée par les deux tests ELISA au même seuil de positivité. Ensuite, l'interprétation des résultats de sérodiagnostic est établie, cas par cas, par rapport à ceux définis préalablement par la méthode d'inspection des foies de bovins à l'abattoir, qui est seule apte à confirmer le vrai statut de l'animal diagnostiqué, soit positif ou négatif. Cela permet de distinguer quatre populations de sérums ou d'animaux :

- Animaux négatifs, présumés sains : sérum (-) par sérologie et (-) à l'autopsie ;
- Animaux positifs, présumés atteints : sérum (+) par sérologie et (+) à l'autopsie ;
- Animaux considérés comme de faux négatifs : sérum (-) par sérologie et (+) à l'autopsie ;
- Animaux considérés comme de faux positifs : sérum (+) par sérologie et (-) à l'autopsie.

Le **tableau 6** ci-dessous, donne les résultats obtenus par les deux tests Elisa ($ELISA_{(FP)}$ et $ELISA_{(PES)}$), en ce qui concerne le nombre d'animaux diagnostiqués, leur pourcentage et la moyenne de leurs taux d'anticorps. Dans ce même tableau, sont également présentés les résultats issus de la recherche directe de douves adultes dans les canaux biliaires d'animaux abattus à l'abattoir, pris dans ce cas comme référence.

Tableau 6 : Récapitulatif des résultats d'analyses sérologiques effectuées sur les 80 sérums de bovins par les tests ELISA_(FP) et ELISA_(PES), ainsi que les résultats d'autopsie post mortem des foies de ces animaux, exprimés en fonction du type de diagnostic biologique.

<i>Sérum testé</i>	<i>Présence ou non de parasites</i>		<i>Elisa (FP)^a</i>			<i>Elisa (PES)^b</i>		
	<i>Nb*</i>	<i>(%)</i>	<i>Nb*</i>	<i>(%)</i>	<i>Moy.[†] des taux d'Acs[§] (%) ±E.S.^f</i>	<i>Nb*</i>	<i>(%)</i>	<i>Moy.[†] des taux d'Acs[§] (%) ±E.S.^f</i>
- <i>Positif</i>	33	41,25	27	33,75	63,1 ± 2,8	20	25	56,7 ± 3,0
- <i>Douteux</i>	–	–	9	11,25	24,8 ± 2,4	10	12,5	27,6 ± 2,1
- <i>Négatif</i>	47	58,75	44	55	10,1 ± 1,0	50	62,5	11,1 ± 1,3
Total	80	100%	80	100%	–	80	100%	–

- **Elisa_(FP)^b**: Elisa utilisant comme antigène la fraction purifiée
- **Elisa_(PES)^a**: Elisa utilisant comme antigène les produits excrétés-sécrétés
- **Moy.[†]**: Moyenne ; **Acs[§]**: Anticorps ; **Nb***: Nombre ; **E.S.^f**: Erreur Standard.
- La prévalence de l'infestation par *F. hepatica* peut être déterminée pour chaque type d'ELISA, à l'aide de la formule suivante :

$$\text{La prévalence fasciolienne} = \frac{\text{Nombre d'animaux positifs}}{\text{Nombre total d'animaux examinés}} \times 100.$$

4.3.2.4. Évaluation du pouvoir diagnostique de l'antigène purifié

Le résultat d'un test sérologique de l'infestation par *F. hepatica* dans un troupeau d'animaux dépend étroitement de deux critères fondamentaux : la sensibilité et la spécificité.

La sensibilité est la capacité du test à identifier correctement les individus qui ont la maladie. C'est donc la possibilité d'obtenir un résultat positif, lorsqu'un animal est réellement infesté, par contre la spécificité est la capacité à identifier correctement les individus qui n'ont pas la maladie. C'est donc la possibilité d'obtenir un résultat négatif, lorsqu'un animal est réellement exempt de l'infestation (**Bezzaoucha, 1996; Meissonnier et Mage, 2007**). La précision qui est aussi considérée comme un paramètre important pour exprimer

la performance globale du test de diagnostic, décrit quant à elle le degré avec lequel le test de diagnostic reflète l'état réel de ce qui est mesuré (**Awad et al., 2009**).

En se basant sur les résultats des analyses sérologiques obtenus pour les 80 sérums testés et du diagnostic biologique correspondant, établi selon quatre situations : animaux vrais positifs (**VP**) ou faux positifs (**FP**), faux négatifs (**FN**) ou vrais négatifs (**VN**) dont le nombre de chacune d'elle est indiqué dans le **tableau 7**, nous avons déterminé pour les deux tests Elisa, les taux de sensibilité (**Se**) et de spécificité (**Sp**) ainsi que la précision (**Pr**) selon la méthode de **Smith (1995)**, selon les équations suivantes :

Tableau 7 : Résultats sérologiques exprimés en nombre et pourcentage d'animaux dépistés par ELISA_(FP) et ELISA_(PES), en fonction de leur statut diagnostique.

	<i>Vrais positifs</i>		<i>Faux positifs</i>		<i>Vrais négatifs</i>		<i>Faux négatifs</i>	
	Nb.	(%)	Nb.	(%)	Nb.	(%)	Nb.	(%)
Elisa_(FP)	24	30	3	3,75	42	52,5	2	2,5
Elisa_(PES)	18	22,5	2	2,5	43	53,75	7	8,75

- **Nb** : Nombre d'animaux diagnostiqués
- **%** : Pourcentage d'animaux diagnostiqués

A la lecture des résultats mentionnés dans le **tableau 8**, on remarque aisément que le test ELISA donne une meilleure sensibilité lorsqu'il utilise comme antigène la fraction purifiée (F.p) isolée à partir de l'extrait brut de *F. hepatica* au moyen des techniques analytiques précédemment citées. En effet, le taux de sensibilité obtenu par l'ELISA_(FP), de l'ordre de 92,3%, dépasse largement celui obtenu pour l'ELISA_(PES) estimé à seulement 72%. Ceci signifie qu'avec l'antigène somatique purifié, la technique ELISA aurait pu identifier parmi l'effectif d'animaux examinés plus de cas positifs que si elle avait utilisé l'antigène PES.

Tableau 8 : Résultats, exprimés en pourcentage, des trois paramètres sérologiques (sensibilité, spécificité et précision) déterminés pour l'ELISA_(FP) et l'ELISA_(PES).

	<i>Sensibilité (Se)</i>	<i>Spécificité (Sp)</i>	<i>Précision (Pr)</i>
<i>Elisa</i> _(FP)	92,3 %	93,3 %	93 %
<i>Elisa</i> _(PES)	72 %	95,5 %	87 %

L'examen du **tableau 7** présenté précédemment, montre qu'effectivement l'ELISA_(FP) a détecté 24 animaux vrais positifs, soit 30% de l'effectif total, alors que l'ELISA_(PES) n'a détecté que 18 animaux vrais positifs, soit un taux de 22,5%. Cette sensibilité plus significative au profit de l'ELISA_(FP) ne pourrait évidemment être interprétée que par l'effet des différentes étapes de purification que l'antigène somatique utilisé par ce test, a minutieusement subie. Les résultats de ce tableau révèlent cependant que l'ELISA_(FP), bien qu'elle soit dotée d'une grande performance qui s'est traduite par un taux de précision très élevé par rapport à l'ELISA_(PES) (94% contre 87% respectivement), elle s'est montrée légèrement moins spécifique (93,3% de spécificité pour l'ELISA_(FP) contre 95,5% pour l'ELISA_(PES)). Donc, l'ELISA_(FP) n'a révélé en effet qu'un nombre inférieur d'animaux vrais négatifs par comparaison avec l'autre variante d'ELISA (soit 42 animaux avec l'ELISA_(FP) contre 43 animaux avec l'ELISA_(PES)) (voir **tableau 7**).

La supériorité du taux de spécificité que l'on a enregistrée dans le cas de l'ELISA_(PES) explique, en grande partie, l'importance qu'a déjà été attribuée aux produits excrétés-sécrétés, depuis de nombreuses années, pour un usage commun et permanent à travers différentes régions du monde pour l'immunodiagnostic de la distomatose à *F. hepatica*, bien qu'ils aient été utilisés bruts sans aucun processus de purification.

Les résultats fournis par la littérature concernant les pourcentages de la sensibilité et la spécificité des méthodes sérologiques appliquées au diagnostic de la fasciolose, sont disparates et varient en fonction de plusieurs paramètres (l'espèce animale étudiée, l'effectif d'échantillon, le type du test, la nature et la source d'antigènes, etc...). Toutefois, nos propres résultats sont assez proches de ceux rapportés par plusieurs auteurs.

A titre d'exemple, **Cornelissen et al. (1992)** ont noté une spécificité pour le test ELISA de l'ordre de 98% et 95% en utilisant respectivement des antigènes somatiques et excrétés-sécrétés bruts lors d'une étude sérologique pour la détection de la fasciolose chez les moutons.

Une autre étude menée par **Shafiei et al. (2015)** portant sur l'évaluation d'un antigène somatique purifié, de 27 kDa, par ELISA en utilisant des sérums de patients atteints de fasciolose humaine, a enregistré un taux de sensibilité de 100% et un taux de spécificité de 93,6%.

Chez l'espèce *Gigantica*, au cours d'une étude menée dans le but de comparer les antigènes somatiques et la cystéine protéase par le test IgG-ELISA pour l'immuno-diagnostic de 100 individus suspectés de fasciolose humaine à *F. gicantica*, **Rokni et al. (2003)** ont signalé une sensibilité de 100% pour les deux antigènes, alors que la spécificité du test est estimée à 96,9 et 98,4% pour les antigènes somatiques et la cystéine protéase, respectivement. En outre, **Awad et al. (2009)** en appliquant un test ELISA indirect pour l'immunodiagnostic de la fasciolose à *F. gigantica* chez plusieurs espèces animales en utilisant des antigènes somatiques et d'excrétion-sécrétion, ont remarqué que ce dernier a donné les meilleurs résultats de sérodiagnostic chez les bovins, avec des pourcentages de sensibilité, de spécificité et d'exactitude de 93,3%, 96,7% et 95%, respectivement. En revanche, les taux de sensibilité, de spécificité et d'exactitude de l'ELISA utilisant les antigènes somatiques étaient respectivement de 96,7%, 80% et 88,3%.

4.3.2.5. Correspondance des résultats de diagnostic

Le tableau de contingence suivant (**Tableau 9**) donne, par référence aux résultats d'inspection des foies d'animaux abattus, la correspondance entre les résultats d'analyses sérologiques obtenus par le test Elisa_(FP) et ceux obtenus par le test Elisa_(PES). Les données du tableau permettent de constater une concordance très significative entre les résultats des deux tests de l'ordre de 80%, répartis comme suivant :

- 20 animaux positifs par les deux tests, soit 25% de l'effectif total ;
- 3 animaux douteux par les deux tests, soit 3,75% de l'effectif total ;
- 41 animaux négatifs par les deux tests, soit 51,25% de l'effectif total.

Par contre, 20% des résultats sont en discordance entre les deux tests, et correspondent aux cas suivant :

- 4 animaux positifs par l'ELISA_(Fp) et douteux par l'ELISA_(PES), soit 5% de l'effectif total ;
- 3 animaux positifs par l'ELISA_(Fp) et négatifs par l'ELISA_(PES), soit 3,75% de l'effectif total ;
- 6 animaux négatifs par l'ELISA_(PES) et douteux par l'ELISA_(Fp), soit 7,5% de l'effectif total ;
- 3 animaux négatifs par l'ELISA_(Fp) et douteux par l'ELISA_(PES), soit 3,75% de l'effectif total.

Tableau 9 : Comparaison des résultats sérologiques, exprimés en nombre et pourcentage, des 80 sérums testés par ELISA_(Fp) et ELISA_(PES).

		Elisa_(Fp)		
		<i>Sérum (+)</i>	<i>Sérum douteux</i>	<i>Sérum (-)</i>
Elisa_(PES)	<i>Sérum (+)</i>	20 (25%)	–	–
	<i>Sérum douteux</i>	4 (5%)	3 (3,75%)	3 (3,75%)
	<i>Sérum (-)</i>	3 (3,75%)	6 (7,5%)	41 (51,25%)

La comparaison des résultats de la méthode de recherche directe des douves dans les foies des bovins avec ceux des tests sérologiques ELISA_(Fp) et ELISA_(PES) est présentée dans le **tableau 10**. A la lecture du tableau, on note que les résultats de la méthode de recherche des douves, utilisée ici comme référence, sont plus concordants avec ceux du test ELISA_(Fp) qu'avec les résultats du test ELISA_(PES).

Le taux de correspondance entre les résultats de l'ELISA_(Fp) et ceux de la recherche des douves est de l'ordre de 82,5% et comprend des animaux positifs et négatifs dans les proportions suivantes :

- 24 animaux positifs par l'ELISA_(Fp) et par la méthode de recherche des douves, ce qui représente 30% de l'effectif total ;

- 42 animaux négatifs par l'ELISA_(Fp) et par la méthode de recherche des douves, ce qui représente 52,5% de l'effectif total.

En revanche, les résultats de l'ELISA_(PES) et ceux de la méthode de recherche des douves sont en correspondance à un taux de 76,25% comprenant des animaux positifs et négatifs dans les proportions suivantes :

- 18 animaux positifs par l'ELISA_(PES) et par la méthode de recherche des douves, soit 22,5% de l'effectif total ;
- 43 animaux négatifs par l'ELISA_(PES) et par la méthode de recherche des douves, soit 53,75% de l'effectif total.

Tableau 10 : Comparaison des résultats de la recherche des douves adultes dans les foies des 80 bovins abattus avec les résultats d'analyses sérologiques de leurs sérums par le test ELISA_(Fp) et le test ELISA_(PES).

		Sérologie par ELISA _(Fp)		Sérologie par ELISA _(PES)	
		Positifs (+)	Négatifs (-)	Positifs (+)	Négatifs (-)
Recherche des douves adultes	Positifs (+)	24 (30%)	2 (2,5%)	18 (22,5%)	7 (8,75%)
	Négatifs (-)	3 (3,75%)	42 (52,5%)	2 (2,5%)	43 (53,75%)

A partir de ce tableau, la prévalence de la fasciolose bovine est estimée à 30% par ELISA_(Fp) et à 22,5% par ELISA_(PES). Il s'agit de la prévalence réelle déterminée pour chaque type d'antigène utilisé en ELISA et ce, en tenant compte des résultats sérologiques validés par référence à ceux de la recherche des douves à la dissection des foies de bovins abattus, que l'on considère réels à 100%.

Par une simple comparaison de ces deux résultats sérologiques obtenus à l'issue de cette étude, on peut dire que l'ELISA_(Fp) apparaît plus performante que l'ELISA_(PES). Cela signifie clairement que l'emploi de la molécule purifiée (F.p) comme antigène dans ce test d'immunodiagnostic a augmenté considérablement la sensibilité de la technique

ELISA et permis, par voie de conséquence, de trancher sur le statut d'un grand nombre d'animaux examinés, en particulier les cas douteux qui n'ont pas été diagnostiqués par l'ELISA utilisant comme antigène le produit excrété-sécrété (l'ELISA_(PES)).

Bien que la maladie due à *F. hepatica* soit très répandue au sein du cheptel bovin, dans différentes localités du Nord-est du pays, les statistiques et les informations provenant des abattoirs sont généralement moins précises et mal documentées à ce sujet. Néanmoins, nos résultats concernant les taux de prévalence obtenus par dépistage sérologique de cette parasitose à l'aide du test ELISA_(FP), se situent dans la fourchette des pourcentages fournis par **Ferhati et al. (2014)** à propos de la prévalence de la fasciolose bovine lors d'une enquête épidémiologique réalisée dans le même abattoir (abattoir de Seybouse) durant cinq années successives (2008, 2009, 2010, 2011 et 2012) et aboutit à des taux de prévalences de la fasciolose bovine de 29,79%, 33,51%, 20,04%, 27,08% et 21,92%, respectivement.

DEUXIÈME PARTIE : PROTOCOLE DE PURIFICATION ET DE CARACTÉRISATION D'UNE PROTÉASE DE TYPE CYSTÉINE ("CYSTEINE- LIKE")

1. Matériel et méthodes

1.1. Source de l'enzyme

L'enzyme brute a été obtenue selon la méthode décrite par **Cancela *et al.* (2008)** avec quelques modifications. Des douves adultes, non endommagées, prélevées fraîchement sur des foies de bovins saisis à l'abattoir, ont été maintenues à 37 °C pendant 6 h, dans un milieu de culture tamponné RPMI 1640, pH 7,3 (composition : annexe II), additionné de 30 mM HEPES, 2% glucose, 25 mg/l gentamycine et 5 mM d'inhibiteurs de protéases (EDTA, PMSF, Iodoacétamide).

Après filtration et centrifugation pendant 1 h à 15 000 t/min, le surnageant a été concentré par ultrafiltration sur une membrane perméable pour des molécules de masses inférieures à 10 KDa (PBGC membrane, Millipore 8400) et stocké à -20°C jusqu'à utilisation. La concentration en protéines de cette solution a été déterminée par la méthode de **Bradford (1976)** décrite auparavant.

1.2. Sérums d'animaux infestés

L'antisérum utilisé dans l'analyse par immunoblot provient de deux moutons âgés de 12 mois, infestés expérimentalement par les formes infestantes de *F. hepatica*, les métacercaires. Celles-ci ont été produites par infestation de limnées entretenues au laboratoire de l'INRA de Nouzilly (France) et nous ont été octroyées sous forme de gélules dans le cadre d'un projet de recherche sur le dépistage sérologique de la fasciolose ovine, menée au département vétérinaire d'El-Tarf sur trois années successives (2011-2014). L'infestation a été effectuée, après vermifugation, par intubation des animaux avec une sonde œsophagienne permettant de placer directement, dans le rumen, les gélules contenant environ 50 métacercaires déposées sur un film plastique.

Le pouvoir infestant des métacercaires a ensuite été évalué par coproscopie qui consiste à rechercher les œufs de *F. hepatica* dans les matières fécales des animaux à partir de la 10^{ème} SPI, par la méthode de sédimentation-flottation (**Soulé *et al.*, 1989**; **Chryssafidis *et al.*, 2015**). Les prélèvements sanguins ont été pratiqués à la veine jugulaire sur tubes secs avant et après l'infestation. Le sang a été décanté, centrifugé et congelé à -20 °C jusqu'à analyse.

2. Étapes de purification de l'enzyme

2.1. Précipitation fractionnée à l'acétone

Le surnageant de culture de *F. hepatica* a été précipité à l'acétone avec une agitation continue dans un bain de glace. Les fractions 0-20%, 0-40%, 40-60% et 60-80% ont été collectées par centrifugation à 12 000 t/min pendant 30 min, à 4 °C, puis resuspendues dans un minimum de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8. Les activités spécifiques dans la fraction 40-60% ont été très importantes par comparaison à celles des autres fractions. Aucune activité n'a été détectée dans le surnageant final.

2.2. Chromatographie de gel filtration

La fraction 40-60% (468,7 U/mg de protéine) a été déposée sur une colonne de Sephadex G-100 (2,6 x 90 cm) (Sigma-Aldrich) préalablement équilibrée avec le tampon Tris-HCl, 25 mM pH 8 contenant 0,01% NaN₃. L'élution a été effectuée avec le même tampon avec un débit de 25 ml/h. Des fractions de 2 ml ont été collectées et analysées par mesure de l'absorbance à 280 nm et de l'activité protéolytique en utilisant le substrat peptidique, fluorogène Z-Phe-Arg-AMC comme décrit ci-dessous. Les fractions du pic 2 ayant des activités protéolytiques significatives ont été regroupées, concentrées par ultrafiltration jusqu'au volume final de 10 ml en utilisant une membrane 10 kDa MW cut-off (membrane PBGC, Millipore 8400) et stockées à -20 °C.

2.3. Chromatographie d'échange ionique

Après filtration sur gel, le pool des fractions actives du pic P₂ (3564,8 UT) est déposé sur une colonne de DEAE- cellulose (3 cm x 25 cm) préalablement équilibrée avec le tampon Glycine-NaOH, 25 mM pH 9,0 contenant 0,01% NaN₃. Des fractions de 2 ml ont été collectées avec un débit de 32 ml/h. L'absorbance à 280 nm ainsi que l'activité protéolytique ont été mesurées. Les protéines non adsorbées sur le gel sont éluées par le tampon d'équilibrage, alors que les protéines adsorbées ont été éluées par un gradient NaCl (0 - 0,5 M) dans le même tampon. Les fractions actives ont été combinées, appliquées à une cellule d'ultrafiltration en utilisant une membrane perméable pour des molécules de masses inférieures à 10 kDa, puis conservées à -20 °C jusqu'à utilisation.

2.4. Electrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes

L'analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide a été effectuée dans des conditions dénaturantes, en utilisant un gel de concentration de 5% (p/v) et un gel de séparation de 12% (p/v) d'acrylamide selon la méthode de **Laemmli (1970)** décrite précédemment. Après migration, les fractions protéiques séparées ont été détectées suite à une coloration au bleu brillant de Coomassie R-250. Les masses moléculaires ont été déterminées par un kit d'étalonnage de protéines standards de faible poids moléculaires (14000 - 66000 Da) (Sigma).

2.5. Electrophorèse SDS-PAGE en conditions non dénaturantes (zymographie)

Le zymogramme a été réalisé selon la méthode de **Garcia-Carreno *et al.*, (1993)**. Après avoir subi une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12% sans traitement thermique. Les échantillons ayant migré dans le gel sont immergés dans 100 ml tampon Tris-HCl, 100 mM pH 8,5 contenant 2,5% Triton X-100 pendant 30 min sous agitation douce pour éliminer le SDS. Ensuite, le gel a été incubé en présence de 50 ml d'une solution de caséine 1% dans du Tris-HCl, 100 mM pH 8,5 pendant 30 min, à 37°C. Finalement, le gel a été coloré au bleu de Coomassie pendant 1 h, puis décoloré avec une solution d'acide acétique à 5%.

3. Mise en évidence de l'activité protéolytique de l'enzyme purifiée

3.1. Effet caséinolytique

3.1.1. Réactifs utilisés

- La caséine comme substrat naturel de l'enzyme ;
- Des solutions tamponnées préparées à différents pH (tampon sodium acétate à pH 5; tampon sodium phosphate à pH 7,5 et tampon Tris-HCl, 0,5 M à pH 9 (composition : Annexe II).

3.1.2. Méthode

La caséine a été dissoute dans chaque tampon, à raison de 1%, de façon à préparer trois milieux d'incubation à des pH variables. Les solutions de caséine ont été alors coulées dans des boîtes de pétri de petit format et déposées au froid pour assurer une bonne gélification. Ensuite, on creuse au milieu de chaque boîte un puits dans lequel un petit volume (10 µl) de l'enzyme pure a été déposé. Après incubation dans l'étuve, à 37 °C pendant 24 h, la réaction positive se traduit par la formation d'anneau (halot) au milieu de la boîte de pétri.

3.2. Dosage de l'activité protéolytique

3.2.1. Dosage de l'activité caséinolytique

L'activité protéolytique a été mesurée en déterminant la concentration des peptides solubles dans l'acide trichloroacétique à la concentration finale de 6% (w/v) selon la méthode décrite par **Dominguez et Cejudo (1996)** en utilisant la caséine comme substrat. Pour cela, 0,5 ml d'une solution de caséine 1% (w/v) dans le tampon Tris-HCl 100 mM pH 8,5 a été mélangé avec 0,5 ml de la solution enzymatique préalablement diluée dans le même tampon, puis incubé 15 min à 60°C. Un blanc a été préparé de la même manière sauf que 0,5 ml de Tris-HCl a été utilisé à la place de l'enzyme. La réaction a été arrêtée par addition de 0,5 ml de TCA à 20% (w/v) (le TCA précipite le substrat non hydrolysé). Le mélange réactionnel a été centrifugé à 12 000 t/min pendant 15 min puis l'absorbance des acides aminés libérés par l'action protéolytique a été mesurée à 280 nm. Une unité d'activité protéolytique a été définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 µg de tyrosine/ml/min dans les conditions expérimentales utilisées. Une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant des solutions de tyrosine (0 - 100 µg/µl). Nous en avons déduit que 100 µg/µl tyrosine correspond à une D.O₂₈₀ de 0,0055. Cela permettra de calculer l'activité enzymatique comme suivant :

$$\text{Activité (UI)} = \frac{\text{DO} \times \text{d} \times \text{D}}{\text{T} \times 0,0055}$$

Avec :

- **D** : dilution de l'enzyme;
- **d** : dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel;
- **T** : temps de la réaction en min.

3.2.2. Dosage au substrat fluorogénique

L'activité enzymatique a également été mesurée en utilisant la méthode fluorométrique en présence du substrat synthétique, fluorogène, Z-Phe-Arg 7-amido-4-méthylcoumarine-HCl (Z-Phe-Arg-AMC) (Sigma) telle qu'elle a été citée par certains auteurs (**Dowd et al., 2000**; **Obayachi et al., 2015**). Le dosage a été effectué avec 10 µM de substrat dans 1 ml de tampon Tris-HCl 100 mM, pH 7,0 contenant 0,5 mM dithiothréitol et 50 µl de la solution enzymatique. Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 30 min avant que la réaction soit arrêtée par addition de 200 µl d'acide acétique 1,7 M. La libération du groupe fluorescent 7-amido-4-méthylcoumarine (AMC) a été suivie par un spectrophotomètre de fluorescence à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 370 et 440 nm, respectivement. Une unité d'activité enzymatique a été définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la libération de 1 µM d'AMC/min, à 37 °C.

4. Caractérisation de l'enzyme purifiée

4.1. Effet de la T° sur l'activité et la stabilité enzymatique

Les réactions d'hydrolyse de la caséine ont été réalisées en maintenant le pH à 7 et en faisant varier la T° de 20 à 70 °C. Pour l'étude de la stabilité thermique, la préparation enzymatique a été pré-incubée dans du tampon Tris-HCl 100 mM, pH 7 pendant 3 h, à différentes températures variant de 30 à 60 °C. Des prélèvements ont été effectués au cours du temps et les activités protéolytiques résiduelles ont été ensuite mesurées dans les conditions optimales de l'action enzymatique.

4.2. Effet du pH sur l'activité et la stabilité enzymatique

Les réactions d'hydrolyse de la caséine ont été réalisées à des pH allant de 5 à 12 en maintenant la T° à 40 °C. La stabilité vis-à-vis du pH a été déterminée après pré-incubation de 5 µg d'enzyme pendant 1 h à 40 °C, dans différents tampons : acétate de sodium, 50 mM (pH 5 - 6) ; Phosphate de sodium, 50 mM (pH 6 - 7,5) ; Tris-HCl, 50 mM (pH 7,5 - 9) et glycine-NaOH (pH 9 - 12). Par la suite, les activités protéolytiques résiduelles ont été déterminées comme mentionné ci-dessus dans la section relative au dosage de l'activité protéolytique. L'enzyme non pré-incubée a été considérée comme témoin pour le calcul des activités résiduelles.

4.3. Effet des inhibiteurs

L'activité protéolytique a été évaluée en présence de différents inhibiteurs d'enzymes : EDTA (5 mM), PMSF (5 mM), β- Mercaptoéthanol (20 mM), Iodoacétamide (10 mM), E-64 (5 mM), Benzamidine (5 mM) et Pepstatine (10 mM). Environ 5 µg d'enzyme ont été préincubés à 40 °C, pendant 30 min avec chaque inhibiteur à la concentration indiquée avant incubation avec 1% caséine dans du Tris-HCl, 100 mM pH 7, et les activités enzymatiques résiduelles ont alors été estimées. L'activité sans inhibiteur a été considérée comme témoin (100% d'activité).

4.4. Spécificité du substrat

L'activité catalytique spécifique de l'enzyme purifiée a été étudiée à différents pH en présence de divers substrats protéiniques naturels (caséine, hémoglobine, albumine, gélatine et fibrine) et du substrat synthétique Z-Phe-Arg-AMC, en utilisant les tampons suivants : le tampon acétate de sodium pour le pH 5,5 ; le tampon phosphate (100 mM) pour le pH 7 et le tampon Tris-HCl (100 mM) pour le pH 8,5. Tous les essais ont été effectués en triplicata, à la T° ambiante par incubation de la préparation enzymatique, aux différents pH, avec chacun des

substrats selon les deux méthodes de dosage détaillées dans la partie précédente : la méthode de **Dominguez et Cejudo (1996)** pour les substrats naturels et la méthode d'**Obayachi et al. (2015)** pour le substrat synthétique Z-Phe-Arg-AMC. Ensuite, l'activité enzymatique relative de chaque substrat a été exprimée par rapport à l'activité protéolytique spécifique du substrat synthétique que l'on a considérée ici comme témoin (100% d'activité).

4.5. Détermination de la séquence N-terminal

Le séquençage de l'extrémité N- terminale de la protéase purifiée a été réalisé par l'USCR-sequencer de protéines de la Faculté des Sciences de Sfax (Tunisie) en utilisant la méthode de dégradation d'Edman, à l'aide d'un séquenceur automatique d'acides aminés Type ABI Procise 494 (Applied Biosystems). Le principe de cette méthode repose sur le couplage, en présence de tampon N-méthyl pipéridine, de la fonction amine libre du peptide à séquencer avec le PITC pour former le PTC-peptide. Ce composé subit un clivage acide pour libérer de l'ATZ-Aa, dérivé instable du 1^{er} résidu d'Aa dans la chaîne peptidique. L'ATZ-Aa a enfin été converti en un dérivé d'Aa stable, le PTH-Aa qui peut donc être analysé et identifié grâce à un étalon de PTH-Aa soit par chromatographie en phase gazeuse (**Hewick et al., 1981**), soit par HPLC (**Speicher et al., 2001**).

La méthodologie consiste à transférer la protéase purifiée à partir du gel de polyacrylamide SDS-PAGE vers une membrane PVDF, dans un tampon de transfert Tris-borate (50 mM Tris, 50 mM borate, pH 8.3). Après une brève coloration avec le bleu de Coomassie R-250, la bande colorée correspondant à la protéase est découpée, séchée, placée dans un Eppendorf puis stockée au congélateur avant d'être déposée dans une cartouche de type "Pro-Blott" pour subir plusieurs cycles de séquençage.

A la suite de chaque cycle de dégradation, le PTH-Aa produit a été injecté avec la phase mobile sur une colonne de type Applied PTH C18, de 2,1 mm de diamètre et de 22 cm de long. Ensuite, les différents PTH-Aa ont été élués à différents temps par un gradient d'acétonitrile/isopropanol et les données du chromatogramme restitué ont été exploitées par le logiciel d'analyses des données fourni par Applied Biosystems pour l'identification des acides aminés libérés lors des cycles de séquençage.

4.6. Détermination des paramètres cinétiques

L'étude cinétique de l'activité enzymatique a été effectuée à la T° ambiante en utilisant des concentrations croissantes, allant de 10 à 100 mM de différents substrats naturels (hémoglobine, caséine et albumine) et du substrat fluorogénique (Z-Phe-Arg-AMC) dilués dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 7 jusqu'à un volume final de 1ml. L'activité enzymatique correspondant à chaque concentration de substrat a été déterminée en suivant la procédure de dosage décrite pour chaque type de substrat dans les sections précédentes. Les constantes cinétiques K_M et V_{max} ont été calculés à partir de la représentation graphique de Lineweaver-Burk, établie en reportant les inverses des vitesses initiales ($1/V_i$) en fonction des inverses des concentrations de substrat ($1/[S]$), alors que la valeur de K_{cat} a été calculée à partir de l'équation suivante : $K_{cat} = V_{max}/[E]$ où $[E]$ est la concentration enzymatique active maintenue constante au cours de toutes les expériences.

4.7. Analyse par Western blot

Environ 100 µg de protéase pure ont été séparés par SDS-PAGE à 12% en utilisant le système tampon de **Laemmli (1970)**. Le transfert des protéines a été effectué après migration sur gel d'acrylamide sur une membrane de nitrocellulose d'une porosité de 45 µm (Amersham Hybond-P) dans le tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20%, pH 8,5) selon le système de buvardage semi-sec décrit précédemment par **Towbin et al. (1992)**. Les protéines transférées à l'aide d'une cuve de transfert (Tram Blot Cell, BioRad) placée à 4°C pendant 3 h, sous une tension de 50 V, ont subi une coloration au bleu de Coomassie afin de visualiser les bandes correspondantes aux différents marqueurs standards et les distinguer de celle de la fraction purifiée. La partie de la membrane contenant les protéines standards a alors été découpée, tandis que le reste de la membrane a été bloqué pendant une nuit à 4 °C avec 1% BSA (v/v) dans du PBS additionné de 0,1% Tween 20 (PBSt). Ensuite, la membrane de nitrocellulose a été incubée avec le pool d'immunsérums à la dilution 1/100 dans du PBS, recueillis sur des moutons infestés par 50 métacercaires de *F. hepatica*. Après deux lavages de 5 min avec du PBSt, la membrane est mise en présence d'anticorps du cheval anti- IgG de moutons couplés à la peroxydase (Sigma) à une dilution de 1/1000 dans 1% BSA pendant 1 h, à la T° ambiante. Finalement, les spots ont été révélés par incubation de la membrane avec le substrat chromogène TMB (Sigma Aldrich), à l'obscurité pendant 30 min.

5. Résultats et discussion

5.1. Purification de l'activité enzymatique

Dans cette deuxième partie pratique, une activité protéolytique est isolée à partir des PES*Fh* puis purifiée jusqu'au niveau apparent d'homogénéité par un procédé impliquant les trois étapes analytiques décrites précédemment. Dans la première étape, l'homogénat initial d'excrétions-sécrétions soumis à une précipitation fractionnée par l'acétone à des taux de saturation croissants, a permis de séparer quatre fractions différentes dont la fraction d'acétone à 40-60% renferme seule la majeure partie de l'activité spécifique (468,7 U/mg de protéine). A cette phase de précipitation, une fraction active est obtenue avec un facteur d'enrichissement enzymatique de 2,7 et un rendement en activité protéolytique d'environ 68% (**Tableau 11**).

Au cours d'une étude précédente, **Simpkin et al. (1980)** ont partiellement purifié l'homogénat initial des PES*Fh* par précipitation à l'éthanol, et ont trouvé que 60% de l'activité enzymatique précipite dans un intervalle de concentration d'éthanol situé entre 60 et 75% avec augmentation de 4 fois le taux de purification de l'enzyme.

Par ailleurs, l'étude menée par **Jaswal et Kocher (2006)**, portant sur la purification d'une protéase alcaline après fractionnement de l'extrait enzymatique brut de *Bacillus circulans* par précipitation au SA, a révélé la plus grande partie de l'activité protéolytique dans la fraction correspondant à la saturation 60-75% de sel, dont le facteur de purification a atteint 2,4.

Plus récemment, une adénosine désaminase, de 29 kDa, est purifiée jusqu'à homogénéité à partir du PES*Fg* par **Ali (2008)** en utilisant une précipitation à l'acétone suivie de deux étapes chromatographiques : une chromatographie d'échange ionique sur CM-cellulose et une chromatographie d'exclusion-diffusion sur Sephacryl S-200. Au cours de cette purification, l'étape de précipitation à l'acétone, a permis de multiplier d'un facteur de 3,4 l'activité enzymatique et d'avoir un rendement de 88,9%. Ce résultat est presque proche du nôtre, puisque nous avons obtenu au niveau de la fraction d'acétone à 40-60%, par le même procédé, un rendement en activité enzymatique de 68,4% avec augmentation du degré de purification d'un facteur de 2,7.

Tableau 11 : Bilan de précipitation fractionnée à l'acétone du surnageant de culture des douves adultes de *F. hepatica*.

	<i>Activité totale (UT)</i>	<i>Protéines (mg)</i>	<i>activité spécifique (U/mg protéines)</i>	<i>Rendement en activité protéolytique (%)</i>
Surnageant brut	8423,7	48,9	172,3	100
- Fraction (0 - 20%)	362,3	8,2	44,2	4,3
- Fraction (20 - 40%)	640,1	7,5	85,3	7,6
- Fraction (40 - 60%)	5765,6	12,3	468,7	68,4
- Fraction (60 - 80%)	165,5	6,1	27,1	1,9
Surnageant final	0	8,7	0	0

Dans la seconde étape de purification, la fraction d'acétone à 40-60% ayant l'activité spécifique la plus élevée est fractionnée par filtration à travers une colonne de gel Sephadex G-100. Le profil d'élution de cette fraction (**Fig. 37**) montre un grand pic protéique élué dans le volume mort de la colonne. Le pool de ce premier pic (P₁) possédant une faible activité protéolytique, de l'ordre de 528,6 U/mg, n'a pas pu se lier au gel de DEAE-cellulose et est donc exclu dans le solvant d'élution. Deux petits pics, dont les activités enzymatiques se révèlent plus significatives que celle du P₁, sont ensuite élués de la colonne. Le pool de ces deux pics (P₂) a montré, par analyse électrophorétique SDS-PAGE en conditions non dénaturantes, en présence du substrat caséine (zymogramme), l'existence d'au moins trois protéases y compris l'enzyme à purifier (**Fig. 38**).

Un dernier pic avec une activité protéolytique très faible est ensuite exclu dans les dernières fractions de l'éluât. Le nombre de pics résolus par fractionnement du PESFh, correspond à celui précédemment rapporté par **Zimmerman et Clark (1986)** lors de la séparation du même produit sur gel Sephacryl S-200 en quatre pics dont les activités antigéniques spécifiques sont distinctes.

Lorsque les fractions du pool P₂ sont passées à travers la colonne DEAE-cellulose, l'enzyme désirée est séparée des autres molécules qui ne peuvent pas se lier au gel et sont exclues avec l'éluant. Cependant, les fractions liées correspondant à la fraction purifiée (F.p) sont éluées successivement à l'aide d'un gradient de NaCl (0 - 0,5 M).

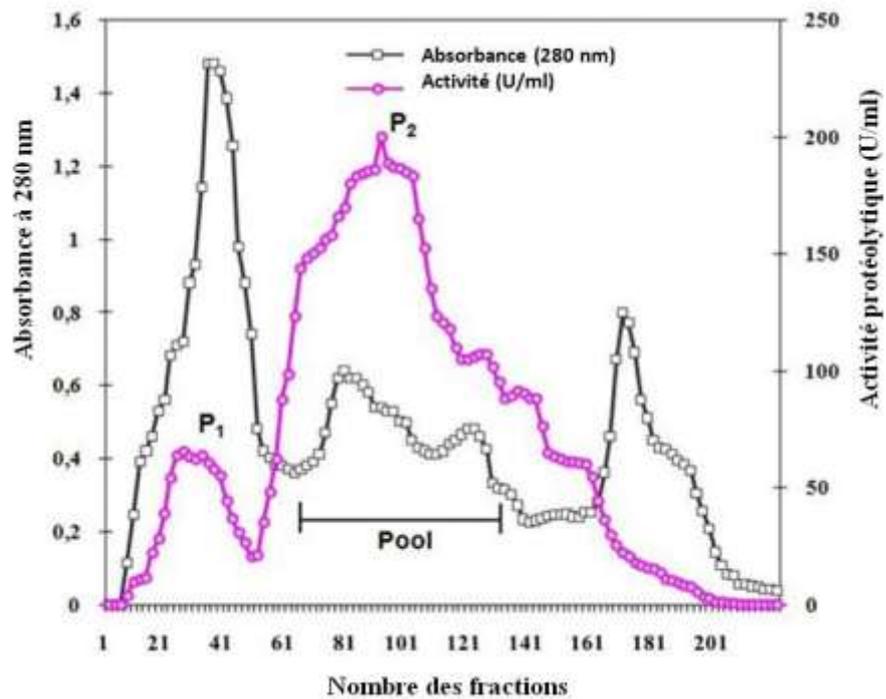


Figure 37 : Profil d'élution de la fraction d'acétone à 40-60% sur une colonne de gel filtration Sephadex G-100.

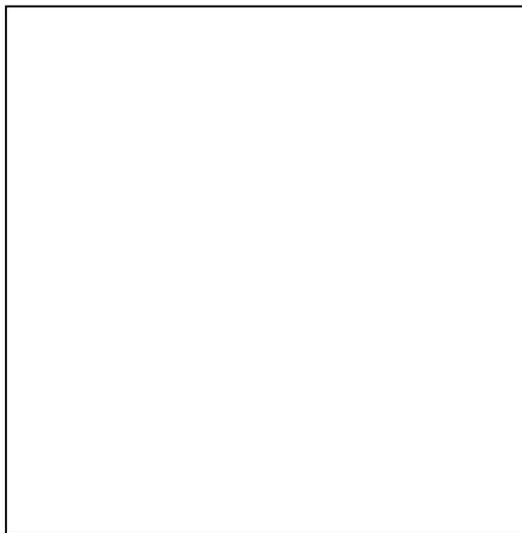


Figure 38 : Résultats de zymographie en gel de polyacrylamide à 12 % contenant la caséine à 1%, en présence de SDS (caséine-PAGE) des PES*Fh* (a), du pool P₂ sortie Sephadex G- 100 (b) et de la fraction correspondant à la protéase purifiée (c).

Le profil d'élution illustré par la **figure 39** fait apparaître au niveau de la fraction purifiée un seul pic d'activité spécifique (1893,9 U/mg). Suite à cette étape, l'enzyme est purifiée 11 fois avec un rendement de 31,5%. Ensuite, Le pool enzymatique du pic élué par le gradient NaCl est concentré à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration perméable pour des molécules de masses inférieures à 10 kDa. Cette étape a permis d'augmenter significativement l'activité spécifique de la protéase purifiée jusqu'à 2268,8 U/mg, et d'améliorer le rendement de purification d'un taux de 18,8%. A ce stade, le facteur de purification final a atteint 13 fois (**Tableau 12**).

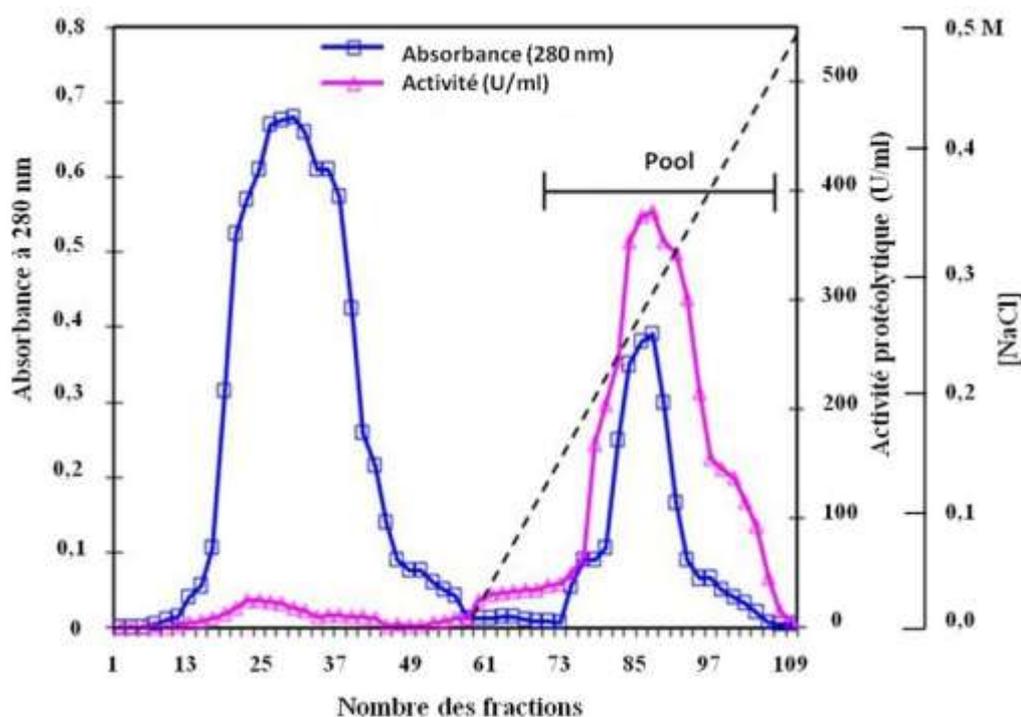


Figure 39 : Profil d'élution du pool P₂ sortie Sephadex G-100 sur une colonne échangeuse d'anions DEAE-cellulose.

L'analyse électrophorétique de la F.p sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes, a révélé une seule bande protéique homogène caractérisée par une masse moléculaire d'environ 22 kDa (**Fig. 40**, piste 3). En plus, la coloration au bleu de Coomassie, effectuée sur le zymogramme pour but de vérifier la pureté de la protéase analysée et visualiser d'éventuelles activités protéolytiques au sein de la caséine-PAGE, a permis également de révéler une seule bande, d'aspect clair au fond noir du gel, indiquant clairement l'activité caséinolytique de cette protéase (voir **Fig. 38**, piste c).

Tableau 12 : Bilan des différentes étapes de purification de l'enzyme brute libérée dans le milieu d'incubation des douves adultes de *F. hepatica*.

<i>Étapes de purification</i>	<i>Activité totale (UT)</i>	<i>Protéines (mg)</i>	<i>Activité spécifique (U/mg protéine)</i>	<i>Rendement (%)</i>	<i>Facteur de purification</i>
Surnageant brut	8423,7	48,9	172,3	100	1
Précipitation à l'acétone - Fraction (40-60%)	5765,6	12,3	468,7	68,4	2,7
Gel filtration G-100 - Fractions P ₁	1850	3,5	528,6	21,9	3,1
- Fractions P ₂	3564,8	2,8	1273,1	42,3	7,4
DEAE-cellulose - Protéase purifiée	2651,5	1,4	1893,9	31,5	11
Ultrafiltration	1588,2	0,7	2268,8	18,8	13,1

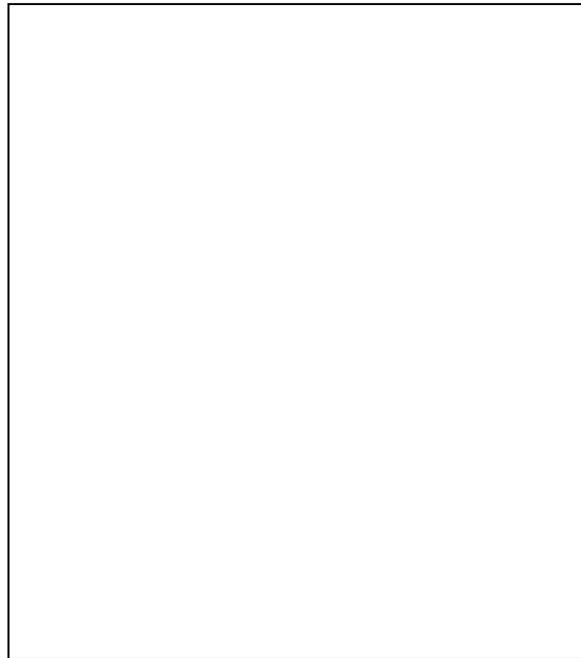


Figure 40 : Profil électrophorétique SDS-PAGE dans des conditions réductrices de la protéase purifiée. Marqueurs protéiques de poids moléculaires standards (**piste 1**), extrait enzymatique brut du PESFh (**piste 2**) et la protéase purifiée (**piste 3**).

Des analyses protéomiques ont montré que plus de 80% des protéines libérées par les formes adultes de *F. hepatica* in situ, dans les voies biliaires, et en culture dans le milieu d'incubation, sont des cathepsines L de type cystéine protéases (**Morphew et al., 2007**). En outre, des travaux antérieurs ont rapporté que le stade adulte du trématode *F. hepatica* produit au moins cinq activités de cathepsine L qui sont principalement des cystéines protéases (**Heussler et Dobbelaere, 1994; Trap et Boireau, 2000**), et que les milieux dans lesquels sont maintenus des vers adultes contiennent essentiellement quatre cystéines protéases de poids moléculaires différents (66, 58, 50 et 25-26 kDa) (**McGinty et al., 1993**).

Bien que notre protéase de PM 22 kDa soit relativement proche de la cystéine protéase de 25-26 kDa indiquée précédemment, elle a une petite taille moléculaire par rapport aux autres fractions de cystéines protéases citées. Elle est également de taille plus inférieure à celle de l'enzyme émolase qui a été identifiée dans les produits d'excrétions-sécrétions de *F. hepatica* comme une protéine de PM 47 kDa, ayant la propriété de se lier au plasminogène humain et joue un rôle important dans la fibrinolyse et les processus de dégradation de la matrice extracellulaire de l'hôte (**Bernal et al., 2004**).

Cependant, il semble qu'il y'ait peu de différence entre notre protéase purifiée de 22 kDa et la cathepsine CL1, de 27 kDa, isolée à partir du milieu de culture de *F. hepatica* adulte, puis caractérisée comme une cystéine protéase majeure après avoir été purifiée par un procédé impliquant une filtration sur gel Sephacryl S-200 et une chromatographie QAE-Sephadex (**Cordova et al., 2001**). Cette convergence en termes de masses moléculaires de ces deux enzymes, suggère que la protéase purifiée fonctionne comme étant une isoforme de la cathepsine CL1 ou que les deux protéases ne sont que des variantes dérivant d'un même polypeptide parent de PM plus élevée.

5.2. Caractérisation de l'activité enzymatique

5.2.1. Effet de la T° et du pH sur l'activité et la stabilité enzymatique

L'influence de la température sur l'activité et la stabilité de la protéase est déterminée à des T° variables. Le profil d'activité (**Fig. 41a**) montre que la protéase est plus active à des T° situées entre 35 et 45 °C avec une activité optimale autour de 40 °C. Les activités relatives à 35 et 40 °C sont d'environ 90% et 93%, respectivement. L'enzyme est complètement stable dans un intervalle de 30 à 40 °C (**Fig. 41b**) et maintient plus de 50% de son activité initiale après 1 h d'incubation à 50 °C, mais il perd son activité après 1 h d'incubation à 60 °C. D'autre part, l'enzyme s'est révélée active dans une large gamme de pH variant de 5 à 8 avec une activité hydrolytique optimale à pH 5,5 (**Fig. 42a**) et est très stable sur une large gamme

de pH allant de 5 à 10 comme indiqué par le profil de stabilité enzymatique à pH différents (Fig. 42b), en maintenant 100% de son activité initiale entre pH 7 et 8,5 après 1 h d'incubation à 40 °C. Au cours de cette étude, l'activité et la stabilité de la protéase purifiée ne sont pas évaluées dans des conditions acides, à pH < 5, en raison de la faible activité catalytique de cette enzyme vis-à-vis de la plupart des substrats naturels.

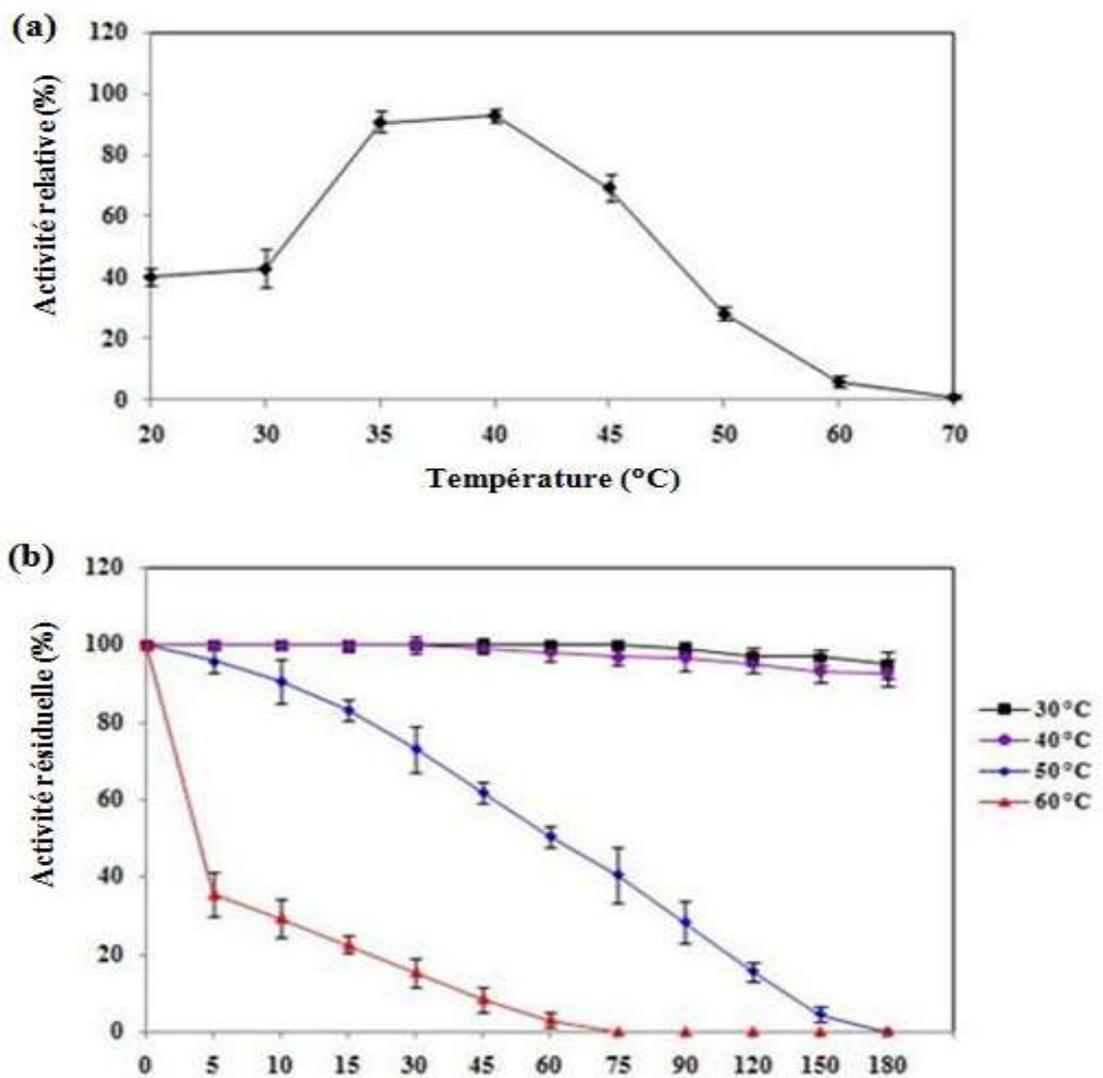


Figure 41 : Effet de la T° sur l'activité (a) et la stabilité (b) de la protéase purifiée.

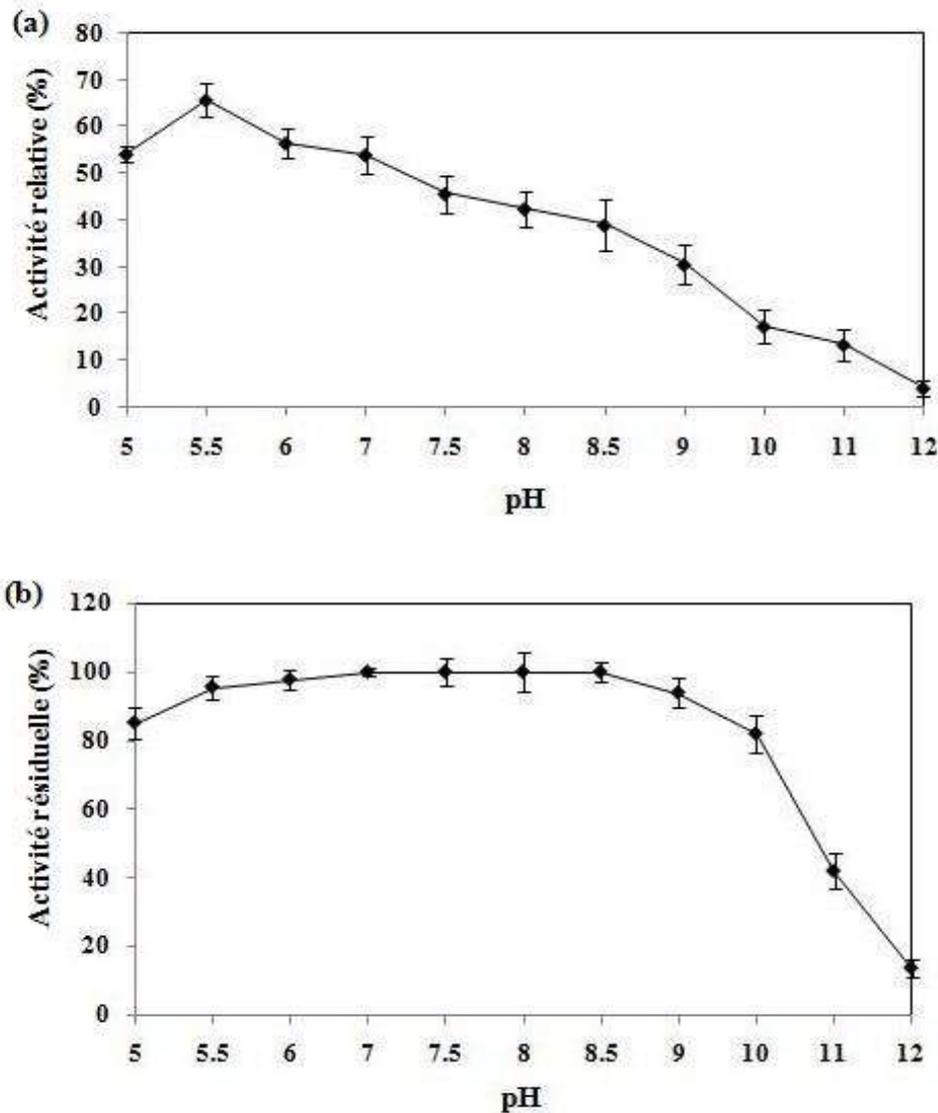


Figure 42 : Effet du pH sur l'activité (a) et la stabilité (b) de la protéase purifiée.

Une étude menée par **Cordova *et al.* (2001)**, a démontré que les formes juvéniles et adultes de *F. hepatica* sécrètent de multiples cystéines protéases qui peuvent être divisées en deux groupes en fonction de leur activité à divers pH : le groupe 1 est plus actif entre pH 3 et 4,5 tandis que le groupe 2 est plus actif dans des pH allant de 4,5 à 8. En se basant sur ces résultats, notre protéase dont l'activité protéolytique est significative entre pH 5 et 8 doit correspondre à l'une des cystéines protéases du second groupe.

D'après des études précédentes portées par **Lowther *et al.* (2009)** et **Corvo *et al.* (2009)**, un certain nombre de cystéines protéases produits *in vitro*, dans des milieux de culture de *F. hepatica* juvéniles ou adultes, ont révélé une meilleure stabilité dans des pH alcalins.

Ce résultat soutient fortement la capacité de cette protéase purifiée à s'adapter à la fois aux conditions neutres et basiques en manifestant une activité et stabilité hautement significatives dans une gamme de pH compris entre 5 et 8, bien que cela ne soit pas en accord avec le comportement des cathepsines lysosomales B et L qui, selon **Lowther et al. (2009)**, ne sont actives qu'à pH 4,5 et nettement instables à pH neutre.

5.2.2. Effet des inhibiteurs

L'effet de divers inhibiteurs sur l'activité protéolytique est étudié pour but de confirmer la nature de l'enzyme purifiée. Les résultats donnés par le **tableau 13** montrent une forte inhibition de l'activité protéolytique en présence d'inhibiteurs spécifiques des protéases à cystéine, à savoir 5 mM d'E-64 ou 10 mM d'iodoacétamide, évaluée par ordre respectif à 100% et 93%.

Le produit E-64 est un inhibiteur de protéases bien connu, capable d'inhiber complètement et spécifiquement l'activité des protéases à cystéine. Il a, de ce fait, servi d'indicateur potentiel pour la détermination in vivo de l'activité catalytique des protéases de *F. hepatica*. En effet, **Alcalá-Canto et al. (2005)** ont noté que l'administration intrapéritonéale de l'inhibiteur E-64 réduit significativement l'activité protéolytique des protéases de *F. hepatica* jusqu'à 85% dans le tissu hépatique des souris expérimentalement infestés.

Contrairement à l'effet inhibiteur des deux produits précédents, aucune inhibition significative n'est obtenue avec le PMSF, un inhibiteur puissant des protéases à sérine lorsqu'il est utilisé à la concentration maximale recommandée (5 mM), ni d'ailleurs avec l'agent chélateur EDTA qui n'a pratiquement aucun effet sur l'activité protéolytique de cet enzyme. Ces données indiquent clairement que notre protéase purifiée appartient à la classe des cystéines protéases, et il ne s'agit pas d'une métallo-enzyme.

Une faible inhibition par la benzamidine et la pestatine (inhibiteurs des protéases à trypsine et aspartique, respectivement) est également constaté sur l'activité enzymatique, tandis que l'agent réducteur β -mercaptoéthanol (inhibiteur des protéases à groupement thiol) a montré une faible inhibition de l'ordre de 7%, à la concentration de 20 mM. Ce résultat suggère que cette protéase ne pourrait pas exister sous la forme d'une structure polymérique, constituée de plusieurs chaînes polypeptidiques dépendantes les unes des autres, et reliées entre elles grâce à des liaisons disulfures.

Tableau 13 : Effet de quelques inhibiteurs de protéases et de l'agent réducteur β -Mercaptoéthanol sur l'activité protéolytique de l'enzyme purifiée.

<i>Inhibiteur</i>	<i>Concentration (mM)</i>	<i>Groupe inhibé</i>	<i>Activité résiduelle (%)</i>
<i>Témoin</i>	-	-	100
EDTA	5	Metallo	98 \pm 1.1
PMSF	5	Serine	96 \pm 0.8
Iodoacétamide	10	Cystéine	7 \pm 0.5
E-64	5	Cystéine	0
Benzamidine	5	Trypsine	87 \pm 0.7
Pepstatin	10	Aspartique	90 \pm 0.6
<i>Agent réducteur</i>	<i>Concentration (mM)</i>	<i>Groupe réduit</i>	<i>Activité résiduelle (%)</i>
β -Mercaptoethanol	20	Thiol	93 \pm 1.3

N.B : L'activité enzymatique mesurée en l'absence d'inhibiteur est maintenue à 100% d'activité. Toutes les mesures sont effectuées en triplicata.

5.2.3. Effet de la spécificité du substrat

L'activité de la protéase purifiée sur divers substrats protéiniques est étudiée à différents pH en utilisant le tampon acétate de sodium à pH 5,5, le tampon phosphate à pH 7 et le tampon Tris-HCl à pH 8,5 comme indiqué dans le **tableau 14**. L'activité catalytique maximale est obtenue en présence du substrat fluorogénique Z-Phe-Arg-AMC, à pH 7. Ce résultat est conforme à certaines des conclusions précédentes rapportant que les cystéines protéases ont une forte affinité pour le substrat synthétique Z-Phe-Arg-AMC que pour les substrats naturels (Cordova *et al.*, 2001; Dowd *et al.*, 1994). Les résultats mentionnés dans ce tableau, montrent des niveaux d'activité catalytique à pH 5,5 et pH 8,5 relativement modérés pour la protéase purifiée en présence des substrats d'albumine, de gélatine et de fibrine par comparaison à l'hémoglobine et la caséine pour lesquelles l'enzyme atteint, à pH 5,5, un maximum d'activité estimée à environ 86% et 83%, respectivement.

La diversité du substrat est un critère important qui sert à évaluer la capacité d'une protéase à hydrolyser un grand nombre de substrats protéiniques. En effet, selon des études biochimiques et phylogénétiques, les protéases de *F. hepatica* appartenant à la famille des cathepsin L, présentent des spécificités de substrat chevauchantes mais distinctes en raison de

la divergence qu'existe dans la composition et la configuration spatiale des sites actifs des différentes protéases (**Stack et al., 2011**).

En outre, le rôle principal de la cathepsine CL1 chez les parasites hématophages est de digérer les macromolécules et les tissus de l'hôte en produits assimilables, par clivage des liaisons peptidiques au niveau des résidus hydrophobes N-terminaux qui sont les plus communs dans l'hémoglobine (Hb) et ce, pour fournir les acides aminés dont ces parasites ont besoin pour la production massive des œufs (**Dalton et al., 2004**). Cela est en concordance avec nos résultats en ce qui concerne plus particulièrement la capacité de la protéase purifiée à catalyser de nombreux substrats naturels dans un intervalle de pH allant de 5,5 à 8,5 y compris l'Hb, la principale source de nutriments pour *F. hepatica*.

Tableau 14 : Effet de la spécificité du substrat sur l'activité protéolytique de l'enzyme purifiée, à différents pH.

Substrat	Activité relative (%)		
	pH 5,5	pH 7	pH 8,5
Z-Phe-Arg-AMC	-	100%	-
Caséine	82,8 ± 3,4	64,1 ± 3,9	39,1 ± 5,6
Hémoglobine	85,6 ± 5,1	-	67,8 ± 3,8
Albumine	18,5 ± 2,7	-	282 ± 3,5
Gélatine	18,4 ± 2,9	-	13,3 ± 2,8
Fibrine	33,8 ± 4,2	-	40,2 ± 3,7

N.B : - Pour chaque substrat, les mesures sont réalisées à pH 5,5 et pH 8,5 sauf pour la caséine dont le test est effectué à pH 5,5, pH 8,5 et pH 7.
 - L'activité pour le substrat Z-Phe-Arg-AMC est effectuée seulement à pH 7
 - Tous les essais sont effectués en triplicata.

Cependant, l'activité protéolytique manifestée par cette protéase vis-à-vis de l'Hb, à cet intervalle de pH, semble incompatible avec celle de la protéase CL1. En effet, dans une étude similaire, **Lowther et al. (2009)** ont rapporté que cette cathepsine (CL1) est incapable de digérer l'Hb à pH ≥ 5 et qu'une digestion efficace de ce substrat ne serait possible par cette enzyme que dans un milieu acide (pH $\leq 4,5$). Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une

similarité fonctionnelle pour ces deux protéases malgré qu'il existe des contrastes apparents au niveau des activités catalytiques et certains paramètres cinétiques, en particulier dans des conditions de pH acide, suggérant une action catalytique sous forme d'isoenzymes pour les cathepsines L, et laisse donc supposer que notre protéase purifiée fonctionne comme étant une variante spécifique de la CL1. En effet, selon ces mêmes auteurs, la protéase FhCL1 clive son substrat en plusieurs sites pour générer uniquement de petits peptides, à faible pH ($\text{pH} \leq 4,5$), et non des acides aminés libres. Et comme cette enzyme ne peut assurer seule un processus complet de dégradation protéique, une action catalytique supplémentaire devrait être impliquée par l'intermédiaire d'autres isoformes de protéases plus appropriées, afin de permettre un ajustement précis du clivage peptidique tout dépend du milieu dans lequel elles fonctionnent.

5.2.4. Séquençage des acides aminés N- terminaux

Le séquençage des acides aminés N-terminaux est effectué pour objectif de vérifier si la protéase purifiée fait partie ou non de la famille des cathepsines L, et estimer son degré de similarité avec des protéases homologues chez l'espèce *F. hepatica* et celles d'autres espèces. La séquence N-terminale des 15 premiers résidus d'acides aminés de cette protéase est déterminée comme étant V-P-D-K-I-D-P-R-E-A-G-S-V-T-C (**Fig. 43**).

L'analyse de cette séquence à l'aide du programme NCBI-BLASTp (**Altschul et al., 1997**), a permis de confirmer l'appartenance de cette protéase à la famille des cathepsines L, car aucune séquence N-terminale appartenant aux cathepsines B ou autres, identique à celle de la protéase purifiée, n'a pu être trouvée dans cette base de données.

L'alignement de cette séquence a montré de très forts taux d'identité avec les 15 premiers résidus N-terminaux de la protéase FhCL1 de 27 kDa (**Cordova et al., 1997**) et les 13 premiers résidus N-terminaux de la FhCL2 de 29,5 kDa (**Smith et al., 1993**) estimés à 86% et 73%, respectivement. De plus, la séquence N- terminale de la protéase est à 60% identique à la cathepsine mature *FhNEJ* CL3, de 32 kDa, isolée par **Harmsen et al. (2004)** et à 53% identique à la protéase CL de 30 kDa isolée à partir de *PESFh* adulte, par **Hawthorne et al. (2000)**.

Il existe également des homologies de séquence estimées à 53% avec les séquences des 15 résidus N-terminaux des cathepsins L provenant du foies de l'homme (**Mason et al., 1986**) et du poulet (**Wada et Tanabe, 1986**), à 60% avec la séquence de la protéase du foie de bovin

(Turk *et al.*, 1985) et à 47% avec celle du foie de rat (Towatari et Katunuma, 1988). Les 7 résidus N-terminaux (1, 2, 5, 6, 8, 12 et 13) sont conservés dans toutes les séquences des cathepsines L de l'espèce *F. hepatica*, tandis que les résidus PDRV sont présents dans les cathepsines de toutes les espèces alignées.

Source de cathepsines L	Résidus (1–15)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Cystéine- like protéase (22 kDa)	V	P	D	K	I	D	P	R	E	A	G	S	V	T	C
<i>F. hepatica</i> CL1 (Q 09093)	V	P	D	K	I	D	P	R	E	S	G	Y	V	T	G
<i>F. hepatica</i> CL2 (P 80342)	V	P	D	K	I	D	R	R	E	S	G	Y	V	*	*
<i>F. hepatica</i> CL3 (P 80532)	V	P	A	S	I	D	W	R	Q	Y	G	Y	V	T	E
30-kDa <i>Fh</i> CL	V	P	E	S	I	D	W	R	D	Y	Y	Y	V	T	E
Bovine liver CL	L	P	D	S	V	D	W	R	E	K	G	Y	V	T	P
Human liver CL	A	P	R	S	V	D	W	R	E	K	G	Y	V	T	P
Chicken liver CL	A	P	R	S	V	D	W	R	E	K	G	Y	V	T	P
Rat liver CL	I	P	K	T	V	D	W	R	E	K	G	C	V	T	P

Figure 43 : Alignement de la séquence N-terminal des 15 acides aminés de la protéase purifiée (cystéine-"like"protéase) avec les séquences N-terminales publiées de différents cathepsines Lysosomales de *F. hepatica* et celles isolées des foies d'autres espèces animales.

- **N.B** : Les motifs identiques sont ombrés. Les astérisques indiquent des motifs qui n'ont pas pu être séquencés. Les chiffres entre parenthèses indiquent les numéros d'accession à la protéine dans le serveur NCBI.

5.2.5. Étude cinétique

Les constantes cinétiques K_M et V_{max} de l'enzyme purifiée sont déterminées en utilisant plusieurs concentrations croissantes du substrat fluorogénique Z-Phe-Arg-AMC et de trois autres substrats naturels (l'hémoglobine, la caséine et l'albumine) et ce après l'exploitation des données présentées successivement pour ces substrats dans les **tableaux IX, X, XI et XII** de l'annexe I.

Les valeurs K_M , V_{max} , K_{cat} et K_{cat}/K_M sont calculées pour chaque substrat à partir de la courbe de Lineweaver-Burk basée sur la représentation graphique des inverses des vitesses ($1/V_i$) en fonction des inverses des substrats ($1/[S]$) (**Fig. IV** et **Fig. V** : Annexe I).

D'après les résultats regroupés dans le **tableau 15** ci-dessous, il ressort que la protéase purifiée possède une plus grande affinité pour le substrat Z-Phe-Arg-AMC à pH 7. Cela s'est traduit par une très faible valeur de K_M avec un rapport maximum de K_{cat}/K_M ($5,4 \times 10^{-3} \text{ M}$ et $1,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivement). Ce résultat montre clairement que cette protéase a une préférence catalytique pour le peptide synthétique Z-Phe-Arg-AMC plus élevée que pour les divers substrats naturels étudiés. Cela s'explique par l'utilisation courante du substrat synthétique dans de nombreux travaux pour l'identification et la caractérisation des protéases de type cathepsine L.

En utilisant le substrat Z-Phe-Arg-AMC, le K_M de la protéase purifiée semble plus proche de celui déterminé pour FhCL2 (de 4 mM) et est presque trois fois inférieur à celui déterminé pour FhCL1 (de 14,7 mM) (**Dowd *et al.*, 1994**). En outre, la protéase possède une affinité pour l'Hb plus supérieure que son affinité pour la caséine et deux fois plus grande que son affinité pour l'albumine. L'obtention d'affinité préférentielle optimale pour l'Hb, le principal composant du sang, riche en acides aminés, suggère l'implication de cette protéase dans la digestion de tel substrat et divers constituants protéiques du tissu hépatique de l'hôte et ce, pour répondre aux besoins des parasites en nutriments et acides aminés nécessaires pour leur métabolisme protéique.

Tableau 15 : Valeurs des constantes cinétiques déterminées pour la protéase pure en présence de différents substrats.

Substrat	V_{max} (mM. min ⁻¹)	K_M (mM)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/k_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Z-Phe-Arg-AMC	80	5,4	7,6	1407,4
Hémoglobine	0,1	55,5	1,0	6,2
Caséine	0,08	83,3	0,8	61,5
Albumine	0,04	125	0,26	0,3

N.B : - K_M : constante de Michaelis ; K_{cat} : constante catalytique ou turn-over ; K_{cat}/K_M : l'efficacité catalytique.

- La valeur de K_{cat} est calculée à partir de l'équation suivante : $K_{cat} = V_{max}/[E]$, où $[E]$ est la concentration de l'enzyme active, et V_{max} est la vitesse maximale.

5.3. Étude de l'immuno-réactivité par Western blot

Ce test est appliqué afin d'évaluer la capacité de l'enzyme purifiée à réagir avec les anticorps spécifiques anti- *F. hepatica* éventuellement présents dans les sérums de moutons infestés expérimentalement. Les profils d'immuno-empreinte, illustrés par la **figure 44** montrent que les anticorps polyclonaux du sérum reconnaissent spécifiquement une seule bande correspondant à la protéase transférée électriquement, à des temps variables d'une infestation expérimentale par *F. hepatica*.

La réaction positive est d'abord observée lorsque la bande correspondant à la fraction protéique immuno-réactive, de PM 22 kDa, réagit avec l'immunsérum des moutons obtenu après la 2^{ème} semaine de l'infestation (**Fig. 44**, piste 2) et augmente significativement après 7 semaines de l'infestation. A ce stade, la bande développée apparaît comme une grande tache, indiquant des taux d'anticorps plus élevés dans les sérums d'animaux infestés (**Fig. 44**, piste 3). Cependant, cette bande n'apparaît pas en présence de l'immunsérum des moutons obtenu à la 1^{ère} semaine de l'infestation (**Fig. 44**, piste 1).

Les méthodes de diagnostic sérologique tels que le test ELISA et le Western blot, peuvent dépister des anticorps sériques contre des antigènes spécifiques de *Fasciola* sp, en utilisant des extraits bruts de douves adultes, des produits excrétés-sécrétés ou des protéines recombinantes pures. D'autre part, ces tests ont la capacité d'analyser un grand nombre de sérums en une seule manipulation et détecter la présence des parasites dès la 2^{ème} semaine post-infestation (**Ruiz-Navarrete et al., 1993; Mezo et al., 2003; Gonzales Santana et al., 2013**).

Les résultats obtenus au cours de cette étude par la technique d'immuno-empreinte (Western blot), sont très encourageants et parfaitement en accord avec ceux rapportés par **Morphew et al. (2007)** qui ont constaté au moyen de ce test, que les protéases de type cathepsine L sont les constituants protéiques majeurs des produits excrétés-sécrétés de *F. hepatica*, libérés spontanément in vitro, reconnus par le pool de sérums provenant d'animaux parasités après la 2^{ème} semaine d'une infestation expérimentale par *F. hepatica*.

En plus, nos résultats semblent plus significatifs que ceux dégagés précédemment par **Gaudier et al., 2012** qui ont noté que les anticorps dirigés contre la protéine recombinante *FhTP16,5* sont détectables, par Western blot, dans les sérums des lapins après 3 à 12 semaines d'une infestation expérimentale par des métacercaires de *F. hepatica*, et dans les sérums des humains atteints naturellement d'une fasciolose chronique.

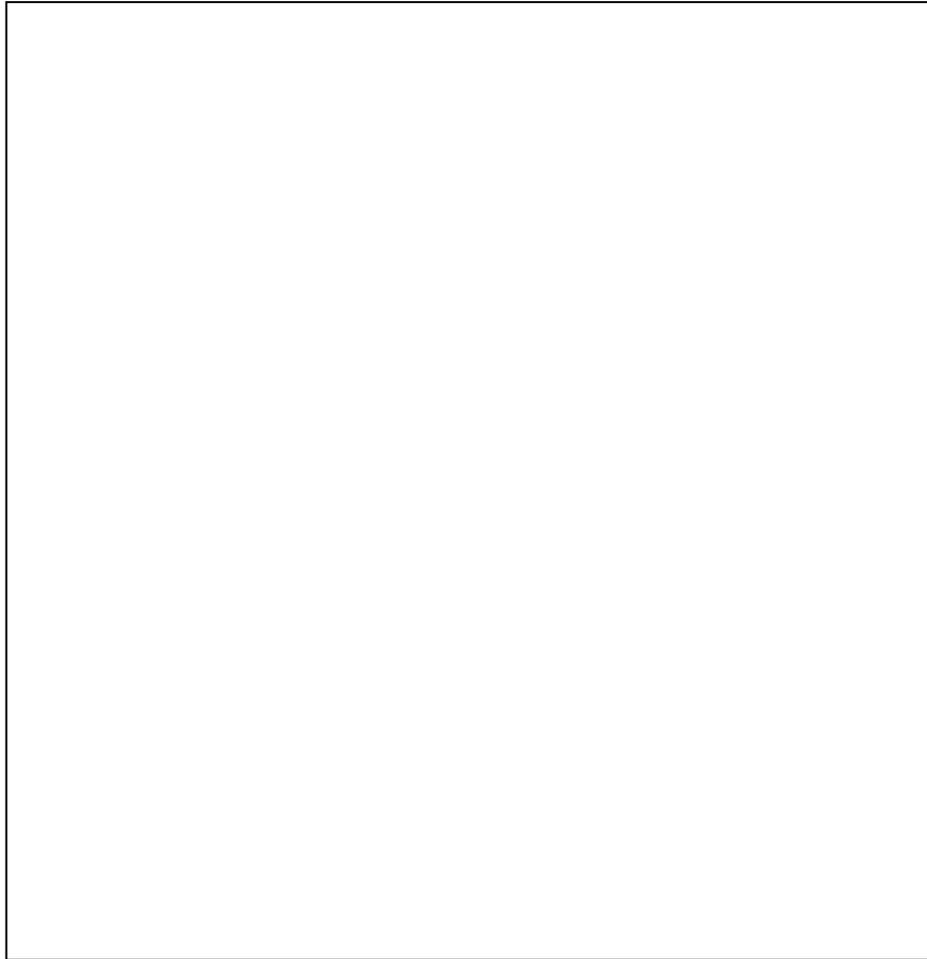


Figure 44 : Test d'immunoblot de la protéase purifiée avec du sérum dilué au 1/100^{ème}, provenant de moutons infestés expérimentalement avec des métacercaires de *F. hepatica*, à la 1^{ère} SPI (piste 1), la 2^{ème} SPI (piste 2) et la 7^{ème} SPI (piste 3). Les marqueurs protéiques standards sont indiqués à gauche. La flèche à droite indique la position de la protéase immunoréactive, de PM 22 kDa.

Conclusions et perspectives

Fasciola hepatica, agent étiologique de la fasciolose animale et humaine, dispose d'une structure moléculaire et antigénique extrêmement complexe et diversifiée, offrant de ce fait de multiples possibilités d'investigations analytiques d'ordre biochimique et immunologique. Pour ces raisons, il semble que l'identification et l'isolement des antigènes parasitaires, plus particulièrement ceux relatifs au genre *Fasciola*, est d'une grande importance pour permettre une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires dus au trématode *F. hepatica* et rendre le diagnostic sérologique de la maladie due à ce parasite encore plus fiable. Cela justifie l'emploi au cours de ce présent travail d'une panoplie de procédés et techniques allant des plus simples aux plus compliqués et ce, dans le souci d'approfondir nos connaissances de base acquises jusqu'à présent sur la complexité antigénique de *F. hepatica* et sa composition moléculaire en mosaïque, et faire ainsi l'initiation nécessaire à l'élaboration de produits antigéniques d'origine parasitaires plus purs et définis, par la mise au point de méthodes fiables et plus performantes sur le plan de la mise en évidence de la réponse immunitaire et la caractérisation biochimique des molécules purifiées.

Les douves immatures et adultes de *F. hepatica* expriment au contact du système immunitaire de l'hôte une multitude de substances très complexes et diversifiées, qui jouent un rôle majeur dans la virulence parasitaire et interviennent à différents niveaux de l'interaction hôte-parasite en permettant la protection et/ou l'échappement du parasite de l'effet de la réponse immunitaire humorale et cellulaire de l'animal hôte.

Les protéases constituent, quant à elles, une famille de molécules importantes libérées dans les produits excrétés-sécrétés du parasite. Elles ont un pouvoir antigénique et jouent un rôle prépondérant dans de nombreux processus vitaux, en particulier l'alimentation et la migration des parasites au sein des tissus de l'hôte. Certaines de ces protéases, notamment des cystéines protéases semblent être de bons candidats pour l'immunodiagnostic, et apparaissent comme des cibles potentielles majeures en thérapie et vaccination antiparasitaire.

Les extraits somatiques ou de surface de *F. hepatica*, souvent très peu exploités dans le domaine d'immuno-parasitologie, peuvent servir de source sûre et abondante pour la préparation d'échantillons à l'état brut. En plus, leur composition hétérogène permettra la récupération et la production en quantités satisfaisantes de substances antigéniques, à haut pouvoir immuno-réactif, pouvant être appliquées avec plus de fiabilité et de reproductibilité au cours du diagnostic sérologique de la fasciolose à *F. hepatica*, par différentes techniques.

D'autre part, l'obtention de plusieurs fractions antigéniques par fractionnement des différents extraits bruts sur gel Sephadex G-200 témoigne de la complexité structurale du parasite et indique qu'elle dispose d'une mosaïque antigénique, enrichie de molécules actives dont la plupart sont des glycoprotéines assurant une composition rigide et variable du glycocalyx et confèrent aux parasites le pouvoir de détourner et/ou de bloquer la défense immunitaire de l'hôte.

Le protocole de travail que nous avons adopté au cours de cette étude pour la préparation des antigènes de *F. hepatica*, a permis d'avoir de bons résultats. En effet, l'extraction des différentes formes antigéniques dans des conditions de travail optimisées a conduit à l'obtention, en quantités satisfaisantes, d'échantillons bruts dotés d'une composition chimique hétérogène renfermant des protéines, des carbohydrates et des lipides à l'état natif. En outre, la stabilité des différentes préparations antigéniques, leur réactivité immunologique ainsi que leur mobilité électrophorétique militent en faveur de l'utilité et la reproductibilité de ces méthodes chromatographiques mises au point au cours de ce travail pour la purification des antigènes de *F. hepatica*.

En effet, la chromatographie d'exclusion-diffusion sur gel s'est révélée comme une technique de base pour la séparation du matériel antigénique très complexe car elle a permis, au moyen d'une simple procédure, l'obtention d'un bon nombre de fractions antigéniques dont la plupart est dotée d'un pouvoir immuno-réactive hautement significatif. Cependant, cette méthode ne peut seule aboutir à la purification d'une molécule jusqu'au degré de pureté maximale. Une chromatographie d'affinité mettant en jeu le principe d'interaction entre une lectine (la Concanavaleine A) présente dans le gel et les résidus gluco-conjugués de la fraction antigénique à purifier, était donc nécessaire pour purifier cette fraction jusqu'au degré d'homogénéité.

À l'issue de cette étude, visant la mise au point de techniques analytiques pour l'extraction et la préparation d'antigènes fascioliens bruts, nous avons pu purifier, au moyen de deux méthodes chromatographiques, un antigène somatique hautement actif possédant toutes les qualités requises pour qu'il soit adapté à la recherche et la quantification des anticorps anti- *F. hepatica* par le test ELISA. Par ailleurs, les résultats issus de l'étude sérologique, effectuée sur les 80 sérums de bovins abattus à l'abattoir, montrent que le diagnostic ELISA utilisant la molécule purifiée à partir de l'homogénat total de *F. hepatica*, à travers une colonne d'affinité ConA-sepharose 4B, permet de déceler la présence d'anticorps

anti- *F. hepatica* dans les sérums d'animaux testés, avec plus d'efficacité et de sensibilité que si on utilise avec la même technique ELISA un antigène métabolique d'excrétion-sécrétion. Cela signifie que notre fraction purifiée (F.p) possède toutes les qualités requises pour qu'elle soit adaptée avec succès pour la recherche d'anticorps sériques, spécifiques de *F. hepatica*, ce qui suggère son emploi comme réactif antigénique afin d'améliorer les conditions pratiques du dépistage sérologique de la distomatose à *F. hepatica* par le test ELISA.

Dans notre deuxième partie pratique, une activité protéolytique produite dans le surnageant du milieu de culture de douves adultes a été purifiée et caractérisée. La purification de la protéase jusqu'au degré d'homogénéité, a été achevée en combinant une précipitation fractionnée à l'acétone (40-60%) avec deux méthodes chromatographiques en phase liquide: une filtration sur gel Sephadex G-100 suivie d'une chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-cellulose. L'enzyme purifiée possède des propriétés souhaitables telles qu'une activité catalytique élevée et une haute stabilité, sur une large gamme de pH et de T°. Ces propriétés en font un bon outil pour diverses applications biotechnologiques, comme par exemple dans les industries de la tannerie et de l'alimentation, les formulations détergentes et médicinales ainsi que les procédés du traitement des déchets. En plus, la capacité de cette molécule à détecter précocement des anticorps spécifiques anti- *F. hepatica* dans les sérums d'animaux testés, dès la 2^{ème} semaine post- infestation, suggère son application comme épitope antigénique par la technique ELISA, afin d'améliorer les performances immunodiagnostic de ce test habituellement utilisé pour la détection sérologique de la fasciolose humaine et animale.

En perspective, il serait intéressant de compléter la première partie de ce travail en envisageant les aspects pratiques suivants :

- La purification et la caractérisation des autres fractions antigéniques issues du gel filtration, à savoir F.2, F.3, F.4 et F.5 afin d'identifier la molécule la plus hautement spécifique qui permettrait une meilleure application technique de l'ELISA fasciolose.
- L'introduction de techniques de séparation plus performantes telles que la HPLC, la FPLC et la LC-MS/MS pour l'élaboration de molécules pures et plus définies, capables d'améliorer la fiabilité des tests sérologiques anti- *F. hepatica*.

- La mise en œuvre d'une enquête sérologique par ELISA_(F,p) à grande échelle, contribuerait à l'établissement de carte épidémiologique de la fasciolose, outil de base indispensable pour le contrôle rationnel de cette maladie et son épidémio-surveillance.

Le second volet pratique de ce travail ouvre des perspectives sur :

- Le clonage et l'expression du gène codant pour la protéase "cysteine- like" dans la bactérie *E. coli* afin d'aboutir à la construction d'une banque d'ADNc pour cette protéine, et permettre ainsi la production de peptides recombinants dans le but d'enrichir la gamme de molécules utilisables dans l'immunodiagnostic de la fasciolose.

- L'adaptation de cette protéase purifiée comme réactif antigénique par le test ELISA et l'évaluation de son potentiel immunodiagnostic dans le dépistage sérologique de la fasciolose par rapport aux autres types d'antigènes discutés précédemment, en l'occurrence la fraction purifiée (F.p) et le produit excrété-sécrété de *F. hepatica*.

Résumé

Cette présente étude décrit dans sa première partie expérimentale l'obtention d'une molécule antigénique isolée à partir de l'homogénat total de douves adultes de *Fasciola hepatica*, puis purifiée en utilisant une chromatographie de gel filtration suivie d'une chromatographie d'affinité spécifique. Parmi les cinq fractions antigéniques obtenues par fractionnement de l'extrait somatique brut sur gel Sephadex G-200, seule la première fraction (F.1) a donné une réaction de précipitation hautement significative vis-à-vis de la lectine concanavaleine A. Elle est alors purifiée à homogénéité à travers une colonne d'affinité ConA-Sepharose 4B puis caractérisée par électrophorèse SDS-PAGE en une bande unique, de PM apparent d'environ 40 kDa. Cette molécule pure, dont l'immuno-réactivité s'est révélée très positive en présence de l'antisérum spécifique du lapin, est donc dotée d'un pouvoir antigénique important. En outre, La sa fiabilité immunodiagnostic est vérifiée par Elisa ; les résultats de ce test utilisant comme antigène la fraction purifiée (ELISA_{F.P}) s'est avéré plus sensible que l'Elisa utilisant les produits excrétés-sécrétés (ELISA_{PES}) (soit une sensibilité de 92,3% pour l'Elisa_(F.P) contre 72% pour l'Elisa_(PES)). Cependant, avec la fraction purifiée, la spécificité du test est légèrement inférieure par rapport à celle correspondant aux produits excrétés-sécrétés (une spécificité de 93,3% pour l'ELISA_(Fp) contre 95,5% pour l'ELISA_(PES)).

Dans le second volet pratique, une activité protéolytique de type cystéine, produite dans le surnageant du milieu de culture de douves adultes, est purifiée et caractérisée par combinaison d'une précipitation à l'acétone et deux méthodes chromatographiques. Grâce à cette purification en trois étapes, l'enzyme est purifiée 11 fois avec une activité spécifique de 1893,9 U/mg et un taux de rendement estimé à 31,5%. L'ultrafiltration a permis d'augmenter le facteur de purification jusqu'à 13,1 avec une activité spécifique global de 2268,8 U/mg. Le PM de l'enzyme purifiée est estimé à 22 kDa par SDS-PAGE, tandis que son activité protéolytique est visualisée par zymographie sur SDS-PAGE non dénaturante, contenant la caséine comme substrat. L'enzyme présente une stabilité relative dans une large gamme de pH et de T° avec des activités optimales à pH 5,5 et 40 °C. L'activité enzymatique est complètement inhibée par les inhibiteurs spécifiques des protéases à cystéine, à savoir 5 mM d'E-64 et 10 mM d'iodoacétamide. L'intérêt pratique de cette molécule purifiée en tant qu'antigène est évalué par Western blot en utilisant des sérums de moutons infestés expérimentalement par des métacercaires de *F. hepatica*. Le pool de sérums reconnaît une seule bande correspondant à cette protéase juste après la 2^{ème} semaine de l'infestation. La détection précoce d'anticorps spécifiques dans les sérums d'animaux infestés, suggère l'application de cette molécule au dépistage immunologique de la fasciolose par cette technique.

Mots clés: *Fasciola hepatica* ; antigènes somatiques ; antigènes excrétés-sécrétés ; protéase type-cystéine ; purification ; caractérisation ; ELISA ; Western blot.

Summary

The present study describes in its first experimental part, the isolation of an antigenic molecule from the total homogenate of *Fasciola hepatica* adult flukes, then purified to homogeneity using gel filtration chromatography followed by a specific affinity chromatography. Among the five antigenic fractions obtained by fractionation of the crude somatic extract on Sephadex G-200 gel, only the first fraction (F.1) gave a highly significant precipitation reaction with the Concanavalin A lectin. It was then purified to homogeneity through a ConA-Sepharose 4B affinity column and characterized by SDS-PAGE electrophoresis as a single-band with apparent MW of about 40 kDa. This pure molecule, whose immunoreactivity was very positive in the presence of rabbit specific antiserum, is therefore endowed with a significant antigenic activity. In addition, the immunodiagnostic reliability of this molecule was verified by Elisa; the assay using the purified fraction as antigen (ELISA_{Pf}) proved more sensitive than the Elisa using the excreted-secreted product (ELISA_{ESP}) (92.3% of sensitivity for Elisa_(Pf) against 72% for Elisa_(ESP)). However, the ELISA specificity using the purified fraction was slightly lower compared to that corresponding to excreted-secreted product (93.3% of specificity for ELISA_(Pf) against 95.5% for ELISA_(ESP)).

In the second practical part, a proteolytic activity cysteine-like produced in the supernatant of adult fluke culture medium was purified and characterized by combination of acetone precipitation and two chromatographic methods. Through this three-step purification, the enzyme was purified 11-fold with a specific activity of 1893.9 U/mg and 31.5% recovery. Ultrafiltration was required to increase the purification fold to 13.1 with an overall specific activity of 2268.8 U/mg. The MW of the purified protease was estimated by SDS-PAGE to be 22 kDa, while the proteolytic activity detection was carried out by zymography on non-denaturing SDS-PAGE containing the casein as substrate. The enzyme has relative stability over a wide range of pH and temperature with optimal activity at pH 5.5 and 40 °C. Its activity was completely inhibited by specific inhibitors of cysteine proteases, namely 5 mM E-64 and 10 mM iodoacetamide. The practical interest of this purified molecule as an antigen was evaluated by Western blot using sera from sheep experimentally infected with metacercariae of *F. hepatica*. The pool of sera recognized a single band corresponding to this protease just after the 2nd week of infestation. The early detection of specific antibodies in the sera of infested animals suggests the application of this molecule to the immunological screening of fasciolosis by this technique.

Key words: *Fasciola hepatica*; somatic antigens; excreted-secreted antigens; cysteine like- protease; purification ; characterization; ELISA; Western blot.

ملخص

تصف هذه الدراسة في جزئها التجريبي الاول عملية الحصول على جزيء مستضد (أنتجين) تم عزله ابتداء من الخليط الكلي المتجانس للديدان الكبدية البالغة *Fasciola hepatica*، ثم تنقيته باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الجزيئي متبوعة بكروماتوغرافيا الألفة النوعية. من بين الجزيئات المستضدية الخمسة التي تم الحصول عليها عن طريق فصل المستخلص الجسدي الخام لهذا الطفيل على هلامة Sephadex G-200، تبين بأن الجزيئة الأولى (F.1) هي الوحيدة التي أظهرت تفاعل ترسيب أكثر أهمية ازاء مادة اللكتين (Lectine concanavaline A). لهذا تمت تنقيتها إلى درجة التجانس عبر عمود التحليل التجاذبي ConA-Sepharose 4B، وتحديد خصائصها بواسطة التحليل الكهربائي SDS-PAGE على أنها جزيئة أحادية، بوزن يقارب 40 kDa، حيث تبين ان هذا الجزيء الذي أبدى تفاعل مناعي جد إيجابي ازاء المستضد المصلي للارانب، يملك قدرة أنتجينية كبيرة. لذلك تم التحقق من قدرة التشخيص المناعي لهذا الأنتجين بواسطة تقنية ELISA، حيث بينت النتائج أن هذا الاختبار باستخدام الجزيء المنقى $ELISA_{(FP)}$ كان أكثر حساسية من الاختبار بواسطة المواد أو الأنتجينات الافرازية $ELISA_{(PES)}$ (92,3%) من الحساسية بالنسبة لـ $ELISA_{(FP)}$ مقابل 72% بالنسبة لـ $ELISA_{(PES)}$. بالرغم من ذلك، فان نوعية هذا الاختبار باستخدام الجزيء المنقى كانت أقل بقليل مقارنة بتلك التي تم الحصول عليها باستعمال الأنتجينات ذات الطبيعة الافرازية (93,3%) من النوعية بالنسبة لـ $ELISA_{(FP)}$ مقابل 95,5% بالنسبة لـ $ELISA_{(PES)}$.

في الجزء العملي الثاني، تم فصل و تنقية جزيئة انزيمية هاضمة للبروتين من فئة سستين أنتجت في وسط زراعي لديدان *F. hepatica* البالغة، باستعمال الترسيب الكحولي مقرونا بنوعين من الكروماتوغرافيا السائلة. تبعا لذلك تمت تنقية الإنزيم بمقدار 11 ضعفاً مع نشاط نوعي قدر ب 1893,9 وحدة/ملغ ومردود 31,5%، كما كان للترشيح الفائق ultrafiltration الأثر الكبير في زيادة معامل التنقية إلى 13,1 مع نشاط نوعي إجمالي بلغ 2268,8 وحدة/ملغ. تم كذلك تقدير الوزن الجزيئي للإنزيم المنقى ب 22 kDa باستعمال الرجحان الكهربائي SDS-PAGE في حين تم الكشف عن نشاط التحلل البروتيني بفضل تقنية zymography على هلامة SDS-PAGE الغير ماسخة في وجود ركيزة الكازيين. يمتلك الإنزيم ثباتاً نسبياً على نطاق واسع من الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة مع نشاط مثالي عند درجة الحموضة 5,5 و 40° مئوية، أما قيم K_M لهذا الإنزيم قدرت ب 5,4، 55,5، 83,3 و 125 mM باستخدام الركيزة الفلوروجينية Z-Phe-Arg-AM، الهيموغلوبين، الكازيين والألبومين على التوالي، كما تم تثبيط نشاط هذا الإنزيم بواسطة المثبطات النوعية لانزيمات السيستيين مثل E-64 (5 mM) و Iodoacetamide (10 mM). اضافة الى ذلك تم معاينة الأهمية التطبيقية لهذا الجزيء المنقى كمستضد بواسطة تقنية Western blot باستخدام أمصال الأغنام المصابة تجريبياً ببرقات metacercariae للطفيل *F. hepatica* حيث أمكن، باستعمال مزيج الأمصال، الكشف عن بقعة واحدة مطابقة لهذا الإنزيم بعد الأسبوع الثاني من الإصابة. ان الكشف المبكر للأجسام المضادة النوعية في مصل الحيوانات المصابة لدليل على امكانية استعمال هذه الجزيئة لأجل الفحص المناعي لداء المتورقات الكبدية fasciolose بواسطة هذه التقنية.

الكلمات المفتاحية: *F. hepatica* ; المستضدات الجسدية ; المستضدات الافرازية ; بروتيناز السستيين ; تنقية ; توصيف ;
Western blot ; ELISA

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abáné J.L., Oleaga A., Ramajo V., Casanueva P., Arellano J.L., Hillyer G.V., Muro A.** (2000). Vaccination of mice against *schistosoma bovis* with a recombinant fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica*, *Vet. Parasitol.*, **91** (1-2): 33–42.
- Abdel-Rahman S.M., O'reilly K.L., Malone J.B.** (1998). Evaluation of a diagnostic monoclonal antibody based capture enzyme linked immunosorbent assay for detection of a 26 to 28 kDa *Fasciola hepatica* coproantigen in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **59** (5): 533–536.
- Abdoel T.H., Smits H.L.** (2007). Rapid latex agglutination test for the serodiagnosis of human brucellosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **57** (2): 123–128.
- Abdul-Fattah M.M., Yousef S.M., Nasr M.E., Fouad M.A., Abdul-Wahab S.E.** (1992). Indirect fluorescent antibody test in diagnosis of acute fasciolitic syndrome. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, **22** (1): 261–264.
- Abrous M., Rondelaud D., Dreyfuss G., Cabaret J.** (1998). Unusual transmission of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, by *Lymnaea glabra* or *Planorbis leucostoma* in France. *J. Parasitol.*, **84** (6): 1257–1259.
- Acosta D., Gone F., Carmona C.** (1998). Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.*, **84** (1): 1–7.
- Acosta D., Cancela M., Piacenza L., Roche L., Carmona C., Tort J.F.** (2008). *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol. Biochem. Parasitol. Mol. Biochem. Parasitol.*, **158** (1): 52–64. Doi :10.1016/j.molbiopara.2007.11.011.
- Adedokun O.A., Ayinmode A.B., Fagbemi B.O.** (2008). A comparative study of three methods for detecting *Fasciola* infections in Nigerian cattle. *Vet. Arhiv.*, **78** (5): 411–416.
- Al-Atrakji O.** (2004). Contribution à l'étude de quelques paramètres biochimiques lors d'infestation fasciolienne. Thèse de Magistère vétérinaire, Université Mentouri Constantine, 153 pages.
- Alcalá-Canto Y., Ibarra-Velarde F., Gracia-Mora J., Sumano-lópez H.** (2005). *Fasciola hepatica* proteolytic activity in liver revealed by in situ zymography. *Parasitol. Res.*, **96** (5): 308–311.
- Aldridge A., O'Neill S.M.** (2016). *Fasciola hepatica* tegumental antigens induce anergic-like T cells via dendritic cells in a mannose receptor-dependent manner. *Eur. J. Immunol.*, **46** (5): 1180–1192. Doi : 10.1002/eji.201545905.
- Ali M.M.** (2008). *Fasciola gigantica*: purification and characterization of adenosine deaminase, *Exp. Parasitol.* **119** (2): 285–290. Doi : 10.1016/j.exppara.2008.03.004.

Allam A.F., El-Agamy E.S., Helmy M.H. (2002). Molecular and immunological characterisation of *Fasciola* species. *Br. J. Biomed. Sci.*, **59** (4): 191–195.

Almazán C, Avila G, Quiroz H, Ibarra F, Ochoa P. (2001). Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. *Vet. Parasitol.*, **97** (2): 101–112.

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.*, **25** (17): 3389–3402.

Alvarez-Sánchez M.A., Mainar-Jaime R.C., Pérez-García J., Rojo-Vásquez F.A. (2006). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Vet. Rec.*, **159** (13): 424–425.

Alzieu J.P., Mage C. (1991). La fasciolose bovine : Pathogénie, épidémiologie, thérapeutique. *Bull. G.T.V.*, **395**: 59-74.

Alzieu J.P., Bosquet G., Chauvin A., Dorchies P. (2005). L'observatoire de la grande douve: premiers résultats hiver 2004-2005. In : *Journées nationales des G.T.V., «de l'urgence au conseil»*. Nantes, 25-27 mai 2005. Yvetot: Imprimerie Nouvelle Normandie, 355–360.

Ambroise-Thomas P., Desgeorges P.T. (1978). Diagnostic immunoenzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une microméthode modifiée. *Bull. Org. Mond. Sant.*, **56**: 609–613.

Ambroise-Thomas P. (1979). L'immunofluorescence: acquisitions et perspectives. *Rev. Inst. Pasteur Lyon*, **12** (1): 87–92.

Apostoloff C. (2001). Influence à posteriori de l'hôte définitive sur le développement rédien de *Fasciola hepatica* Linné et la productivité cercarienne chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Muller. Thèse de Doctorat en Pharmacie n° 303, Limoges, France, 142 pages.

Arias M., Hillyer G.V., Sanchez-Andrade R., Suarez J.L., Pedreira J., Lomba C., Diaz P., Morrondo P., Diez-Banos P., Paz-Silva A. (2006). A 2.9 kDa *Fasciola hepatica*-recombinant protein based ELISA test for the detection of current-ovine fasciolosis trickle infected, *Vet. Parasitol.* **137** (1-2): 67–73.

Armour J., Dargie J.D. (1974). Immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. Successful transfer of immunity by lymphoid cells and by serum. *Exp Parasitol.* **35**: 381–388.

Awad W.S., Ibrahim A.K., Salib F.A. (2009). Using indirect ELISA to assess different antigens for the serodiagnosis of *Fasciola gigantica* infection in cattle, sheep and donkeys. *Res. Vet. Sci.*, **86** (3): 466–471. Doi : 10.1016/j.rvsc.2008.08.009.

Ayaz S., Ullah R., Abdel-Salam N.M., Shams S., Niaz S. (2014). *Fasciola hepatica* in some Buffaloes and Cattle by PCR and Microscopy. *Scientific World Journal*, 2014: 462084. Doi : 10.1155/2014/462084.

- Azab M el-S., el-Zayat E.A.** (1996). Evaluation of purified antigens in haem-agglutination test (IHA) for determination of cross reactivities in diagnosis of fascioliasis and schistosomiasis. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, **26** (3): 677–685.
- Baeza E.** (1992). Suivi de la réponse immunitaire précoce aspécifique chez le rat infesté expérimentalement par *Fasciola hepatica*. Thèse de Doctorat de l'Université de Montpellier II, 264 pages.
- Barnoin J., Paccard P., Fayet J., Brochard M.** (1986). L'enquête écopathologique continue. 3. Mise en évidence de facteurs de risques de l'infertilité en élevage bovin laitier. *Ann. Rech. Vét.*, **17** (3): 291–293
- Barthe D., Rondelaud D.** (1986). Premières études sur la susceptibilité de trois cas de Physidae et de *Bulinus truncatus* Audoin à l'infestation fasciolienne. A propos de quelques observations histopathologiques. *Bull. Soc. Fr. parasitol.*, **4**: 33–35.
- Beaumont A., Cassier P.** (2004). Biologie animale: des protozoaires aux métazoaires épithélioneuriens. 3^{ème} édition. Dunod, Tome 1, 464 pages.
- Beckham S.A., Piedrafita D., Phillips C.I., Samarawickrema N., Law R.H.P., Smooker P.M., Quinsey N.S., Irwin J.A., Greenwood D., Verhelst S.H.L., Bogyo M., Turk B., Coetzer T.H., Wijeyewickrema L.C., Spithill T.W., Pike R.N.** (2009). A major cathepsin B protease from the liver fluke *Fasciola hepatica* has atypical active site features and a potential role in the digestive tract of newly excysted juvenile parasites, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **41** (7): 1601–1612. Doi : 10.1016/j.biocel.2009.02.003.
- Belkaid M., Belazzoug S., Hamrioui B.** (1988). Guide pratique du laboratoire de parasitologie. Tome 2: Diagnostic immunologique. *Collection le Cours de Médecine*, OPU, Alger, 144 pages.
- Bennett C.E., Threagold L.T.** (1975). *Fasciola hepatica*: development of tegument during migration in mouse. *Exp. Parasitol.*, **38** (1): 38–55.
- Benex J.** (1964). Practical serodiagnosis of distomatosis. A slide agglutination method using antigen absorbed on latex particles. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales*, **57**: 495–502.
- Benex J.** (1972). L'immunofluorescence quantitative dans le diagnostic des parasitoses: Problèmes pratiques actuels. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **2** (10): 351–358.
- Bent Mohamed A., Cheikh D., Thiam E., Jacquiet P.** (2003). Diagnostic sérologique de la fasciolose bovine à *Fasciola gigantica* par un test Elisa en Mauritanie. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, **56** (3-4): 135–140.
- Berasain P., Goni F., McGonigle S., Dowd A., Dalton J.P., Frangione B., Carmona C.** (1997). Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *J. Parasitol.*, **83** (1): 1–5.

Bernal D., De la Rubia J.E., Carrasco-Abad A.M., Toledo R., Mas-Coma S., Marcilla A. (2004). Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS Lett.*, **563** (1-3): 203–206.

Bezzaoucha A. (1996). Epidémiologie et biostatistique à l'usage des étudiants en Sciences médicales. *Office des publications universitaires*, 262 pages.

Biguet J., Capron, A., TranVan Ky, P. (1962). Les antigènes de *Fasciola hepatica*. Étude électrophorétique et immunoélectrophorétique. Identification des fractions et comparaison avec les antigènes correspondant à sept autres helminthes. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **37**: 221–231.

Biguet, J., Capron, A., Rose G., TranVanKy, P. (1965). Contribution de l'analyse immunoelectrophorétique à la connaissance des antigènes vermineux. Incidences pratiques sur leur standardisation, leur purification et le diagnostic des helminthiases par immunoelectrophorèses. *Rev. Immunol.*, **29**: 5–17.

Biguet J., Rose G., Capron, A. (1969). Diagnostic de la distomatose à *Fasciola hepatica* par la réaction d'hémagglutination. Comparaison à l'immunoélectrophorèse et à l'hémolyse. *Bull. Soc. Patho. Exo.*, **58**: 866–878.

Boucheikhchoukh M., Righi S., Sedraoui S., Mekroud A., Benakhla A. (2012). Principales helminthoses des bovins: enquête épidémiologique au niveau de deux abattoirs de la région d'El Tarf (Algérie). *Tropicicultura*, 2012, **30** (3): 167–172.

Boray J.C. (1967). Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.*, **7**: 92–210.

Boray J.C. (1978). The potential impact of exotic *Lymnaea* spp. on fascioliasis in Australia. *Vet. Parasitol.*, **4**: 127–141.

Bossaert K., Lonneux J.F., Godeau J.M., Peeters J., Losson B. (1999). Serological and biochemical follow-up in cattle naturally infected with *Fasciola hepatica*, and comparison with a climate model for predicting risks of fasciolosis. *Vet. Res.*, **30** (6): 615–628.

Bossaert K. (2000). Influences de la réponse immunitaire des bovins et de paramètres climatiques sur l'épidémiologie (*Fasciola hepatica* Linnaeus 1758). Thèse de Doctorat, Université de Liège, 142 pages.

Bossaert K., Farnir F., Leclipteux. T., Protz M., Lonneux J.F., Losson B. (2000). Humoral immune response in calves to single dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, **87** (2-3): 103–123.

Bouix-Busson D., Barthe D., Rondelaud D. (1984). Les déplacements du sporocyste de *Fasciola hepatica* L. chez *Lymnaea glabra* Müller. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, **2**: 103–107.

Boulard C., Bouvry M., Argenti G. (1985). Comparaison de la détection de foyers de fasciolose par test ELISA sur lactosérum et sérum et par coproscopie. *Ann. Rech. Vét.*, **16** (4): 363–368.

Boulard C., Regnault A. (1989). L'immunodiagnostic de la fasciolose bovine par la technique ELISA. *Bulletin des GTV*, **1-B-337**: 59–68.

Boulard C., Carreras F., Van Gool F. (1995). Evaluation of nitroxylin and closantel activity using ELISA and egg counts against *Fasciola hepatica* in experimentally and naturally infected cattle. *Vet. Res.*, **26** (4): 249–255.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248–254.

Brophy P.M., Pritchard D.I. (1994). Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. *Exp. Parasitol.*, **79** (1): 89–96.

Burden D.J., Hammet N.C. (1980). *Fasciola hepatica*: attempts to immunize rats and mice with metabolic and somatic antigens derived from juveniles flukes. *Vet. Parasitol.*, **9**: 261–266.

Bourdoiseau G. (1997). Les douves des ruminants. *Num. spéc. Point Vét.*, **28**: 15–19.

Buck A.A., Davis A., Deelder A.M., Enders B., Faure M. (1976). Antigènes parasitaires (Mémorandum). *Bull. Organ. Mond. Santé*, **53**: 39–53.

Bussiéras J., Chermette R. (1995). Abrégé de parasitologie vétérinaire. Fascicule III: Helminthologie vétérinaire. 2^{ème} Édition, service de parasitologie, E.N.V., Maisons-Alfort, 299 pages.

Cabán-Hernández K., Espino A.M. (2013). Differential expression and localization of saposin-like protein 2 of *Fasciola hepatica*. *Acta Trop.*, **128** (3): 591–597. Doi : 10.1016/j.actatropica.2013.08.012.

Cában-Hernández K., Gaudier J.F., Ruiz-Jiménez C., Espino A.M. (2014). Development of Two Antibody Detection Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Serodiagnosis of Human Chronic Fascioliasis. *J. Clin. Microbiol.*, **52** (3): 766–772. Doi : 10.1128/JCM.02875-13.

Campbell N.J., Gregg P., Kelly N.D., Dineen J.K. (1978). Failure to induce homologous immunity to *Fasciola hepatica* in sheep vaccinated with irradiated metacercariae. *Vet. Parasitol.*, **4**: 143–152.

Cancela M., Acosta D., Rinaldi G., Silva E., Durán R., Roche L., Zaha A., Carmona C., Tort J.F. (2008). A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie*, **90** (10): 1461–1475. Doi : 10.1016/j.biochi.2008.04.020.

Capron A., Biguet J., Vernes A., et Afchain D. (1968). Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte- parasite. *Pathologie et Biologie*, **16** (3): 121–138.

Capron A., Vernes A., Frut S. (1970). Diagnostic immunologique de la distomatose à *Fasciola hepatica*. Bilan personnel à partir de 430 observations. Etude comparée de trois techniques diagnostiques (Immunoélectrophorèse, Fixation du complément, Immunofluorescence). *Rev. Patho. Comp.*, **7**: 31–37.

Capron A., Dessaint J.P., Capron M., Ouma J.H., Butterworth A.E. (1987). Immunity to Schistosomes: Progress toward vaccine. *Science*. **238**: 1065–1072.

Carlier Y., Bout D., Capron A. (1979). Application de l'ELISA en parasitologie et mycologie. *Rev. Inst. Pasteur Lyon*, **12**: 25–33.

Carmona C., McGonigle S., Dowd A.J., Smith A.M., Coughlan S., McGowran E., Dalton J.P. (1994). A dipeptidylpeptidase secreted by *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **109** (1): 113–118.

Carnevale S., Rodriguez M.I., Santillan G., Labbé J.H., Cabrera M.G., Bellegarde E.J., Velasquez J.N., Trgovcic J.E., Guarnera E.A. (2001a). Immunodiagnosis of Human Fascioliasis by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) and a Micro-Elisa. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8** (1): 174–177.

Carnevale S., Rodriguez M.I., Guarnera E.A., Carmona C., Tanos T., Angel S.O. (2001b). Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cystein proteinase. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **41** (1-2): 43–49.

Cassier P., Brugerolle G., Combes, C., Raibaut, A. (1998). Le parasitisme un équilibre dynamique. *Edition Masson*, Paris, 366 pages.

Cawdery, M.H., Conway, A. (1971). Production effects of liver fluke: *Fasciola hepatica* on beef cattle. *Vet. Rec.*, **88**: 642–649.

Cawdery M.H., Strickland K.L., Conway A., Crowe P. (1977). Production effects of liver fluke infection on weight gain, feed intake, and food conversion efficiency in beef cattle. *Br. Vet. J.*, **133**: 145–149.

Cecchini G., Kasali O.B. (1989). Comparison of different *Fasciola hepatica* antigens and their use to detect infection in sheep by an enzyme immunoassay. *J. Vet. Med B.* **36** (6): 468–472.

Cervi L.A., Rubinstein H., Masih D.T. (1992). Serological, electrophoretic and biological properties of *Fasciola hepatica* antigens. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **34** (6): 517–525.

Changklungmoa N., Chaithirayanon K., Kueakhai P., Meemon K., Riengrojpitak S., Sobhon P. (2012). Molecular cloning and characterization of leucine aminopeptidase from *Fasciola gigantica*. *Exp; Parasitol.*, **131** (3): 283–291. Doi : 10.1016/j.exppara.2012.04.008.

Chapman C.B., Mitchell G.F. (1982). Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, **11** (2-3): 165–178.

- Charbon J.L., Spahni M., Wicki P. Pfister K.** (1991). Cellular reactions in the small intestine of rats after infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.*, **77** (5): 425–429.
- Charlier J., Duchateau L., Claerebout E., Williams D., Vercruyse J.** (2007). Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank samples and production parameters in dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, **78** (1): 57–66.
- Charlier J., De Meulemeester L., Claerebout E., Williams D., Vercruyse J.** (2008). Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Vet. Parasitol.*, **153** (1-2): 44–51. Doi : 10.1016/j.vetpar.2008.01.035.
- Charlier J., Vercruyse J., Morgan E., Van Dijk J., Williams D.J.** (2014). Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitology*, **141** (3): 326–335. Doi : 10.1017/S0031182013001662.
- Chauvin A., Boulard C.** (1992). Le diagnostic de la fasciolose des ruminants : interprétations et utilisation pratique. *Bull. Group. Tech. Vet.*, **418**: 69–73.
- Chauvin A.**, (1994). Réponse immunitaire locale et générale chez le mouton infesté expérimentalement par *Fasciola hepatica*. Thèse de Doctorat de l'Université de Tours, 154 pages.
- Chauvin A. Bouvet G., Boulard C.** (1995). Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *Int. J. parasitol.*, **25** (10): 1227–1241.
- Chauvin A., Moreau E., Boulard C.** (1997). Diagnosis of bovine fascioliasis using serology of pools of sera. Interpretation in field conditions. *Vet. Res.*, **28** (1): 37–43.
- Chauvin A., Moreau E., Boulard C.** (2001). Responses of *Fasciola hepatica* infected sheep to various infection levels. *Vet Res.*, **32** (1): 87–92.
- Chen M.G., Mott K.E.** (1990). Progress in assessment of morbidity due to *F. hepatica* infection. *Trop. Dis. Bull.* **87**: 1–44.
- Chick B.F., Conerdale O.R., Jackson A.R.B.** (1980). Production effects of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in beef cattle. *Aus. Vet. J.*, **56**: 588–592.
- Clery D., Torgerson P., Mulcahy G.** (1996). Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* **62** (1-2): 71–82.
- Chryssafidis A.L., Fu Y., De Waal T., Mulcahy G.** (2015). Standardisation of egg-viability assays for *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi*: A tool for evaluating new technologies of parasite control. *Vet. Parasitol.*, **10** (1-2): 25–31. Doi : 10.1016/j.vetpar.2015.03.005.

- Coombs R.R., Scott M.L., Cranage M.P.** (1987). Assays using red cell labelled antibodies. *J. Immunol. Methods*, **101** (1): 1–14.
- Cordova M., Herrera P., Nopo L., Bellatin J., Naquira C., Guerra H., Espinoza J.R.** (1997). *Fasciola hepatica* cysteine proteinases: immunodominant antigens in human fascioliasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **57** (6): 660–666.
- Cordova M., Jara J., Del Nery E., Hirata I.Y., Araujo M.S., Carmona A.K., Juliano M.A., Juliano L.** (2001). Characterization of two cysteine proteinases secreted by *Fasciola hepatica* and demonstration of their kininogenase activity. *Mol. Biochem. Parasitol.* **116** (2): 109–115.
- Cornelissen J.B., De Leeuw W.A., Van der Heijden P.J.** (1992). Comparaison of an indirect hemagglutination assay and an ELISA for diagnosing *Fasciola hepatica* in experimentally and naturally infected sheep. *Vet. Quarterly*, **14** (4): 152–156.
- Corvo I., Cancela M., Cappetta M., Pi-Denis N., Tort J.F., Roche L.** (2009). The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile *Fasciola hepatica* prefers proline in the S2 subsite and can cleave collagen, *Mol. Biochem. Parasitol.* **167** (1): 41–47. Doi : 10.1016/j.molbiopara.
- Creaney J., Wijffels G.L., Sexton J.L., Sandeman R.M., Spithill T.W., Parsons J.C.** (1995). *Fasciola hepatica*: localisation of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. *Exp. Parasitol.*, **81** (1): 106–116.
- Crehange J., Metais P.** (1972). Etude comparative de quatre méthodes de dosage des lipides totaux sériques. *Bull. Soc. Pharm. Strasbourg*, **15**: 185–197.
- Da Costa C., Dreyfuss G., Rakotondravao, Rondelaud D.** (1994). Several observations concerning cercarial sheddings of *Fasciola gigantica* from *Lymnaea natalensis*. *Parasite*, **1** (1): 39–44.
- Dalton J.P., Tom, T.D., Strand M.** (1985). *Fasciola hepatica* : comparison of immature and mature immunoreactive glycoprotéines. *Parasite Immunol.*, **7** (6): 643–657.
- Dalton J.P., Joyce P.** (1987). Characterisation of surface glycoproteins and proteins of different developmental stages of *Fasciola hepatica* by surface radio labelling. *J. Parasitol.*, **73**: 1281–1284.
- Dalton J.P., Heffernan M.** (1989). Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **35** (2): 161–166.
- Dalton J.P., McGonigle S., Rolph T.P., Andrews S.J.** (1996). Induction of protective immunity in cattle infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect. Immun.*, **64** (12): 5066–5074.
- Dalton J.P., Neill S.O., Stack C., Collins P., Walshe A., Sekiya M., Doyle S., Mulcahy G., Hoyle D., Khaznadji E., Moiré N., Brennan G., Mousley A., Kreshchenko N., Maule**

A.G., Donnelly S.M. (2003). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int. J. Parasitol.*, **33** (11): 1173–1181.

Dalton J.P., Skelly P., Halton D.W. (2004). Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths. *Canadian Journal of Zoology*, **82** (2): 211–232. Doi: 10.1139/z03-213.

Dargie J. D. (1987). The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematodes infections in cattle and sheep. *Int. J. Parasitol.*, **17** (2): 453–463.

Dauchy F.A., Vincendeau P., Lifermann F. (2006). Eight cases of fascioliasis : clinical and microbiological features. *Med. Mal. Infect.*, **36** (1): 42–46.

Davelois K., Escalante H., Jara C. (2016). Western Blot diagnostic yield for simultaneous antibody-detection in patients with human cysticercosis, hydatidosis, and human fascioliasis. *Rev. Peru Med. Exp. Salud. Publica*, **33** (4): 616–624. Doi : 10.17843/rp mesp.2016.334.2543

Davies C., Rickard M.D., Smyth J.D., Hughes D.L. (1979). Attempts to immunize rats against infection with *Fasciola hepatica* using in vitro culture antigens from newly excysted metacercariae. *Res. in Vet. Sci.*, **26** (2): 259–260.

Davies C., Goose J. (1981). Killing of newly excysted juveniles of *Fasciola hepatica* in sensitized rats. *Parasite Immunol.* **3** (2): 81–96.

Dawes B. (1963). *Fasciola hepatica* L., a tissue feeder. *Nature*, **198**: 1011–1012.

De Almeida M.A., Ferreira M.B., Planchart S, Terashima A., Maco V., Marcos L., Gotuzzo E., Sanchez E., Naquira C., Scorza J.V., Incani R.N. (2007). Preliminary antigenic characterization of an adult worm vomit preparation of *Fasciola hepatica* by infected human sera. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, **49** (1): 31–35.

Delecole J.P. (1981). Le ragondin et la douve. *Bull. Mens. Soc. Vet. Prat. Fr.*, **65**: 391–392.

Dewilde S., Ioanitescu A.I., Kiger L., Gilany K., Marden M.C., Van Doorslaer S., Vercruyse J., Pesce A., Nardini M., Bolognesi M., Moens L. (2008). The hemoglobins of the trematodes *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum epiclitum*: A molecular biological, physico-chemical, kinetic, and vaccination study. *Protein Sci.*, **17** (10): 1653–1662. Doi : 10.1110/ps.036558.108.

Dixit A.K., Dixit P., Sharma R.L. (2008). Immunodiagnostic/protective role of cathepsin L-cysteine proteinases secreted by *Fasciola* species. *Vet. Parasitol.*, **154** (3-4): 177–184. Doi : 10.1016/j.vetpar.2008.03.017.

Dixon K.E. (1965). The structure and histochemistry of the cyst wall of the metacercaria of *F. hepatica*. *Parasitol.*, **55**: 215–226.

Dominguez F., Cejudo F.J. (1996). Characterization of the endoproteases appearing during wheat grain development. *Plant Physiol.* **112** (3): 1211–1217.

Dowd A.J., Smith A.M., Mcgonigle S., Dalton J.P. (1994). Purification and characterization of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *Eur. J. Biochem.* **223** (1): 91–98.

Dowd A.J., Dooley M., Fagain C., Dalton J.P. (2000). Stability studies on the cathepsin L proteinase of the helminth parasite, *Fasciola hepatica*. *Enz. Microb. Technol.*, **27** (8): 599–604.

Doy T.G., Hughes D.L., Harness E. (1980). The selective adherence of rat eosinophils to newly excysted *Fasciola hepatica in vitro*. *Res. Vet. Sci.*, **29** (1): 98–101.

Doy T. G., Hughes D.L. (1982). Evidence for two distinct mechanisms of resistance in the rat to reinfection with *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.*, **12** (4): 357–361.

Doy T. G., Hughes D.L. (1984). Early migration of immature *Fasciola hepatica* and associated liver pathology in cattle. *Res. Vet. Sci.*, **37** (2): 219–222.

Doyle J.J. (1972). Evidence of an acquired resistance in calves to a single experimental infection with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.*, **13** (5): 456–459.

Dubois M., Giles A.K., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.*, **28** (3): 350–356.

Duffus W.P.H., Thorne K., Oliver R. (1980). Killing of juvenile *Fasciola hepatica* by purified bovine eosinophil proteins. *Clin. Exp. Immunol.*, **40** (2): 336–344.

El-Mohtarim R. (2016). L'intérêt diagnostique et thérapeutique de la cholangio-pancreatographie rétrograde endoscopique dans la distomatose biliaire (à propos de 2 cas). *Thèse de Doctorat en Médecine*, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat, 96 pages.

El Ridi R., Salah M., Wagih A., William H., Tallima H., El Shafie M.H., Abdel Khalek T., El Amir A., Abo Ammou F.F., Motawi H. (2007). *Fasciola gigantica* excretory-secretory products for immunodiagnosis and prevention of sheep fasciolosis. *Vet. Parasitol.*, **10** (3-4): 219–228.

Elsagheir A.M., Abd Ellah O.H., Sayad F.G., Monib M.E., Abdel-Kader M.S. (2015). Sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) for differentiation of different Schistosome and Fasciolid species. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, **45** (2): 325–330.

Elsibaei M.M., Ali N.M., Ibrahim A.N., Mohammed B.O. (2013). Evaluation of the diagnostic efficacy of *Fasciola* adult worm vomit for serodiagnosis of human fasciolosis. *Parasitol. Res.*, **112** (5): 1849–1855. Doi : 10.1007/s00436-013-3338-y.

Espinasse C. (2006). Diagnostic sérologique de la fasciolose bovine: Intérêt de la méthode ELISA Pourquier en troupeaux allaitants. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, E.N.V. d'Alfort, France, 138 pages.

Esteban J.G., Flores A., Angels R., Mas-Coma S. (1999). High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **93** (2): 151–156.

Estuningsih E., Spithill T., Raadsma H., Law R., Adiwinata G., Meeusen E., Piedrafita D. (2009). Development and application of a fecal antigen diagnostic sandwich ELISA for estimating prevalence of *Fasciola gigantica* in cattle in central Java, Indonesia. *J. Parasitol.*, **95** (2): 450–455. Doi : 10.1645/GE-1672.1.

Euzéby J. (1971). Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine. Tome II : Maladies dues aux plathelminthes. 2^{ème} Fascicule : Trématodes. *Édition Vigot Frères*, Paris, 796 pages.

Euzéby J. (1984). Les parasitoses humaines d'origine animale: caractères épidémiologiques. *Edition Flammarion*, 324 pages.

Fairweather I. (2011). Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? *Vet. Parasitol.*, **180** (1-2): 133–143. Doi : 10.1016/j.vetpar.2011.05.034. Epub 2011 May 27.

Farahnak A., Golmohamadi T., Molaei Rad M.B. (2010). Carbohydrate detection and lectin isolation from tegumental tissue of *Fasciola hepatica*. *Iranian J. Parasitol.*, **5** (1): 20–24.

Ferhati H.M., Haloui M., Chouba I., Tahraoui A. (2014). Epidemiological survey of fasciolosis among cattle in region of Annaba, Algeria. *Middle-East Journal of Scientific Research*, **22** (6): 924–927. DOI: 10.5829/idosi.mejsr.2014.22.06.9131

Frick W. (1970). Diagnosis of bovine fascioliasis and dictyocauliasis using the latex test and the complement fixation reaction. *Arch. Exp. Veterinarmed*, **24** (5): 1113–1122.

Frings C.S., Frendley T.W., Dunn R.T., Queen C.A. (1972). Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clinical Chemistry*, **18** (7): 673–675.

Furmaga S., Gundlach J.L., Sobieszewski K. (1975). White cell system changes in the course of experimental fasciolosis in sheep. *Acta. Parasitol. Pol.* **23**: 159–175.

Furmaga S., Gundlach J.L., Uchacz M. (1983). Experimental studies on cattle susceptibility to *Fasciola hepatica* (Trematoda) superinfection. *Acta. Parasitol. Pol.* **28**: 305–319.

Gaasenbeek C.P., Moll L., Cornelissen J.B., Vellema P., Borgsteede F.H. (2001). An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet. Parasitol.*, **95** (1): 37–43.

- Gaillet P.** (1983). Contribution à l'étude épidémiologique de la distomatose humaine à *Fasciola hepatica* L. en France métropolitaine depuis 1956. A propos de quelques 10.000 cas. *Thèse de Doctorat en Médecine*, Paris-créteil, n° 32, 151 pages.
- Gajewska A., Smaga-Kozłowska K., Wiśniewski M.** (2005). Pathological changes of liver infection of *Fasciola hepatica*. *Wiad. Parazytol.*, **51** (2): 115–123.
- Garcia H.H., Moro P.L., Schantz P.M.** (2007). Zoonotic helminth infections of humans: echinococcosis, cysticercosis and fascioliasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **20** (5): 489–494.
- Garcia-Campos A., Ravidà A., Nguyen L., Cwiklinski K., Dalton J.P., Hokke C.H., O'Neill S., Mulcahy G.** (2016). Tegument Glycoproteins and Cathepsins of Newly Excysted Juvenile *Fasciola hepatica* Carry Mannosidic and Paucimannosidic *N*-glycans. *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, **10** (5): e0004688. Doi : 10.1371/journal.pntd.0004688.
- Garcia-Carreno F.L., Dimes L.E., Haard N.F.** (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.*, **214** (1): 65–69.
- Gaudier J.F., Caban-Hernandez K., Osuna A., Espino A.M.** (2012). Biochemical characterization and differential expression of a 16.5- kilodalton tegument-associated antigen from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Clin. Vaccine Immunol.* **19** (3): 325–333. Doi : 10.1128/CVI.05501-11.
- George S.D., Vanhoff K., Baker K., Lake L., Rolfe P.F., Seewald W., Emery D.L.** (2017). Application of a coproantigen ELISA as an indicator of efficacy against multiple life stages of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Vet. Parasitol.*, **246**: 60–69. Doi : 10.1016/j.vetpar.
- Ghosh S., Rawat P., Velusamy R., Joseph D., Gupta S.C., Singh B.P.** (2005). 27 kDa *Fasciola gigantica* glycoprotein for the diagnosis of prepatent fasciolosis in cattle. *Vet. Res. Commun.*, **29** (2): 123–135.
- Glauert A.M., Lammas D.A., Duffus W.P.H.** (1985). Ultrastructural observations on the interaction in vitro between bovine eosinophils and juvenile *Fasciola hepatica*. *Parasitol.*, **91** (3): 459–470.
- Golden O., Flynn R.J., Read C., Sekiya M., Donnelly S.M., Stack C., Dalton J.P., Mulcahy G.** (2010). Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine*, **28** (34): 5551–5557. Doi : 10.1016/j.vaccine.2010.06.039.
- Golvan Y.J., Ambroise-Thomas P.** (1984). Les nouvelles techniques en parasitologie et immuno-parasitologie. *Flammarion*, Médecine-Sciences, 298 pages.
- Gonzalez P., Tunon M.J., Lopez P., Diez N., Gonzalez J.** (1991). Hepatic disposition of organic anions in rats infested with *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.*, **73** (4): 396–402.

- Gonzalez L.C., Esteban J.G., Barques M.D., Valero M.A., Ortiz P., Naquira C., Mas-Coma S.** (2011). Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: an altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Trop.*, **120** (1-2): 119–129. Doi : 10.1016/j.actatropica.2011.07.002.
- Gonzales Santana B., Dalton J.P., Vasquez Camargo F., Parkinson M., Ndao M.** (2013). The diagnosis of human fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant cathepsin L protease. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* **7** (9): e2414. Doi : 10.1371/journal.pntd.0002414.
- Gottstein B., Schneeberger M., Boubaker G., Merkle B., Huber C.** (2014). Comparative Assessment of ELISAs Using Recombinant Saposin-Like Protein 2 and recombinant Cathepsin L-1 from *Fasciola hepatica* for the Serodiagnosis of Human Fasciolosis. *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, **8**: e2860.
- Grange R.D., Thompson J.P., Lambert D.G.** (2014). Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *Br. J. Anaesth.*, **112** (2): 213–216. Doi : 10.1093/bja/aet293.
- Haçariz O., Baykal A.T., Akgun M., Kavak P., Sagioglu M.S., Sayers G.P.** (2014). Generating a detailed protein profile of *Fasciola hepatica* during the chronic stage of infection in cattle. *Proteomics*, **14** (12) : 1519–1530. Doi : 10.1002/pmic.201400012.
- Hainque B., Baudin B., Lefebvre P.** (2008). Appareils et méthodes en Biochimie et Biologie moléculaire. Collection de la biologie à la clinique, édition Flammarion Médecine-Science, Paris, 448 pages.
- Hammami H., Ayadi A., Camus D., Dutoit E.** (1997). Intérêt diagnostique de la mise en évidence d'antigènes spécifiques de *Fasciola hepatica* par la technique du western blot. *Parasite*, **4** (3): 291–295.
- Hammami H., Hamed N., Ayadi A.** (2007). Epidemiological studies on *fasciola hepatica* in Gafsa oasis (southwest of Tunisia). *Parasite*, **14**: 261–264.
- Hanna R.E.** (1980a). *Fasciola hepatica*: glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Exp. Parasitol.*, **50** (1):103–114.
- Hanna R.E.** (1980b). *Fasciola hepatica*: an immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and the sheep. *Exp. Parasitol.*, **50** (2): 155–170.
- Hanna R.E. Hughes D.L., Taylor S.M.** (1982). *Fasciola hepatica* : antibody levels in sheep serum before and after treatment with anthelmintic. *Res. Vet. Sci.*, **33** (3): 328–332.
- Hanna R.E., et Hillyer G.V.** (1984). *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*: immunofluorescent antigen localization and cross-reactivity. *Exp. Parasitol.*, **57** (1):1–14.

- Hanna R.E.B., Anderson A., Trudgett A.G.** (1988). *Fasciola hepatica*: Studies on vaccination of rats and mice with surface antigen prepared from fluke homogenate by means of a monoclonal antibody. *Res. in Vet. Sci.*, **44** (2): 237–241.
- Harmsen M.M., Cornelissen J.B., Buijs H.E., Boersma W.J., Jeurissen S.H., VanMilligen F.J.** (2004). Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *Int. J. Parasitol.* **34** (6): 675–682.
- Haroun E.T., Hillyer G.V.** (1986). Resistance to fascioliasis: a review. *Vet. Parasitol.*, **20** (1-3): 63–93.
- Hawthorne S.J., Pagano M., Halton D.W., Walker B.** (2000). Partial Characterization of a Novel Cathepsin L- like Protease from *Fasciola hepatica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **277** (1): 79–82.
- Heussler V.T., Dobbelaere D.A.E.** (1994). Cloning of protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **64** (1): 11–23.
- Hewick R.M., Hunkapiller M.W., Hood L.E., Dreyer W.J.** (1981). A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.*, **256** (15): 7990–7997.
- Hewitt C.R., Brown A. P., Hart B.J., Pritchard D.I.** (1995). A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD 23: Innate protection by anti-proteases. *J. Exp. Med.*, **182** (5): 1537–1544.
- Hillyer G.V.** (1979). *Schistosoma mansoni*: reduced worm burden in mice immunized with isolated *Fasciola hepatica* antigens. *Exp. Parasitol.*, **48** (2): 287–295.
- Hillyer G.V.** (1985). Induction of immunity in mice to *Fasciola hepatica* with a Fasciola/Schistosoma cross-reactive defined immunity antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **34** (6): 1127–1131.
- Hillyer G.V., Haroun E.T., Hernandez A., de Galanes M.S.** (1987). Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **37** (2): 363–369.
- Hillyer G.V.** (1980). Isolation of *Fasciola hepatica* tegument antigens. *J. Clin. Microbiol.*, **12** (5): 695–699.
- Hillyer G.V., Apt W.** (1997). Food borne trematode infections in the Americas. *Parasitol. Today.*, **13**: 87–88.
- Hillyer G.V.** (2005). Fasciola antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J. Helminthol.*, **79** (3): 241–7.
- Hornbeck P.** (2017). Double-immunodiffusion assay for detecting specific antibodies (Ouchterlony). *Curr. Protoc. Immunol.*, **2** (116): 231–234. Doi : 10.1002/cpim.18

- Howell M.J., Board P.G., Boray J.C.** (1988). Glutathione S-transferases in *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.*, **74** (4): 715–718.
- Heussler V.T., Dobbelaere D.A.** (1994). Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* **64** (1): 11–23.
- Howell M.J.** (1979). Vaccination of rats against *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.*, **65** (5): 817–819.
- Huges D.L., Harness E., Doy T.G.** (1981). The different stages of *Fasciola hepatica* capable of inducing immunity and the susceptibility of various stages to immunological attack in the sensitized rat. *Res. in Vet. Sci.*, **30**: 93–98.
- Hughes D.L., Hanna R.E., Doy T.G.** (1982). Antibody response in cattle, sheep and rats to infection with γ -irradiated metacercariae of *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.*, **32**: 354–358.
- Ibarra F., Montenegro N., Vera Y., Boulard C., Quiroz H., Flores J.**, (1998). Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fasciolosis. *Vet. Parasitol.*, **77** (4): 229–236.
- Irving J.A., Spithill T.W., Pike R.N., Whisstock J.C., Smooker P.M.** (2003). The evolution of enzyme specificity in *Fasciola* spp. *J. Mol. Evol.*, **57** (1): 1–15.
- Irwin J.A., Morrissey P.E.W., Ryan J.P., Walshe A., O'Neill S.M., Carrington S.D., Matthews E., Fitzpatrick E., Mulcahy G., Corfield A.P., Dalton J.P.** (2004). Glycosidase activity in the excretory-secretory products of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitol.*, **129** (4): 465–472.
- Japa O., Hodgkinson J.E., Emes R.D., Flynn R.J.** (2015). TGF- β superfamily members from the helminth *Fasciola hepatica* show intrinsic effects on viability and development. *Vet. Res.*, **46**: 29–35. Doi : 10.1186/s13567-015-0167-2
- Jaswal R., Kocher G.** (2006). Partial characterization of a crude alkaline protease from *Bacillus circulans* and its detergent compatibility, *The Internet Journal of Microbiology*, **4**: 1–6.
- Jayaraj R., Piedrafita D., Dynon K., Grams R., Spithill T.W., Smooker P.M.** (2009). Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet. Parasitol.*, **160** (3-4), 230–236. Doi : 10.1016/j.vetpar.2008.10.099.
- Jeandel F.** (1991). Importance économique du parasitisme. *Bull. G.T.V.*, **395**: 17–22.
- Jefferies J.R., Campbell A.M., Van Rossum A.J., Barrett J., Brophy P.M.** (2001). Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory. *Proteomics*, **1** (9): 1128–1132.
- Jemli M.H., Dorchies Ph., Magnaval J.F.** (1987). Application de la technique Elisa au diagnostic immunologique de la fasciolose ovine : comparaison avec l'immunofluorescence indirecte et la double diffusion en gélose. *Rev. Méd. Vét.*, **138** (4): 355–359.

Jemli M.H., Rhimi I., Jdidi A., Mastouri L., Kilani M. (1991). La fasciolose ovine de la région de Sejnane (Nord de la Tunisie). *Rev. Méd. Vét.*, **142**: 229–235.

Josens G., Vray B., De Vos L. (1990). Étude en microscopie électronique à balayage de la grande douve du foie *F. hepatica* Linnaeus, 1758. *Ann. Méd. Vét.*, **1347**: 467–477.

Kajugu P.E., Hanna E., Edgar H.W. McMahon C., Cooper M., Gordon A., Barley J.P., Malone F.E., Brennan G.P., Fairweather I. (2015). *Fasciola hepatica*: Specificity of a coproantigen ELISA test for diagnosis of fasciolosis in faecal samples from cattle and sheep concurrently infected with gastrointestinal nematodes, coccidians and/or rumen flukes (paramphistomes), under field conditions. *Vet. Parasitol.*, **212** (3-4): 181–187. Doi : 10.1016/j.vetpar.2015.07.018.

Kamoun P. (1977). Appareils et méthodes en Biochimie. Flammarion Médecine-Sciences. 2^{ème} édition, Paris, 208 pages.

Kasný M., Mikes L., Hampl V., Dvorák J., Caffrey C.R., Dalton J.P., Horák P. (2009). Chapter 4. Peptidases of trematodes. *Adv. Parasitol.*, 69: 205–297. Doi : 10.1016/S0065-308X(09)69004-7.

Keiser J., Utzinger J. (2005). Emerging foodborne trematodiasis. *Emerg. Infect. Dis.*, **11** (10): 1507–1514.

Kelley J.M., Elliot T.P., Beddoe T., Anderson G., Skuce P., Spithill T.W. (2016). Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends Parasitol.*, **32** (6): 458–469. Doi : 10.1016/j.pt.2016.03.002.

Korach S., Benex J. (1966). A lipoprotéin antigen in *Fasciola hepatica*. II. Immunological and immunochemical properties. *Exp. Parasitol.*, **19** (2): 199–205.

Kozat S., Denizhan V. (2010). Glucose, lipid, and lipoprotein levels in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.*, **96** (3): 657–659. Doi : 10.1645/GE-2104.1.

Kuerpick B., Schnieder T., Strube C. (2013). Evaluation of a recombinant cathepsin L1 ELISA and comparison with the Pourquier and ES ELISA for the detection of antibodies against *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, **193** (1-3): 206–213. Doi : 10.1016/j.vetpar.2012.11.021.

Kuk S., Kaplan M., Ozdarendeli A., Tonbak S., Felek S., Kalkan A. (2005). *Fasciola hepatica* cathepsin L1 from a Turkish isolate is related to Asiatic isolates. *Acta Parasitologica*, **50** (3): 244–248.

LaCourse E.J., Perally S., Morphew R.M., Moxon J.V., Prescott M., Dowling D.J., O'Neill S.M., Kipar A., Hetzel U., Hoey E., et al. (2012). The Sigma Class Glutathione Transferase from the Liver Fluke *Fasciola hepatica*, *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, **6** (5): e1666.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** (5259): 680–685.

Lang B. Z. (1977). Snail and mammalian hosts for *Fasciola hepatica* in Eastern Washington. *J. Parasitol.*, **63** (5): 938–939.

Lang B.Z. (1976). Host-parasite relationship of *Fasciola hepatica* in the white mouse. VII. Effects of antiworm incubate sera on transferred worms. *J. Parasitol.*, **62** (2): 232–236.

Lang B.Z., Hall R.F. (1977). Host-parasite relationship of *Fasciola hepatica* in the white mouse. VIII. Successful vaccination with culture incubates antigen and antigens from sonic disruption of immature worm. *J. Parasitol.*, **63** (6): 1046–1049.

Langley R.J., Hillyer G.V. (1989). Detection of circulating immune complexes by the enzyme-linked immunosorbent assay in sera from cattle infected with *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.*, **75** (5): 690–695.

Leclipteux T., Torgerson P.R., Doherty M.L., McCole D., Protz M., Farnir F., Losson B. (1998). Use of excretory/secretory antigens in a competition test to follow the kinetics of infection by *Fasciola hepatica* in cattle. *Vet. Parasitol.*, **77** (2-3), 103–114.

Lehner R.P., Sewell M.H. (1980). A study of the antigens produced by adult *Fasciola hepatica* maintained in vitro. *Parasite Immunology*, **2**: 99–109.

Lescure G. (1991). Introduction : la présence parasitaire en France, importance économique. *Bull. G.T.V.*, **391**: 11–15.

Levieux D., Levieux A., Venien A. (1992a). An improved passive hemagglutination test for the serological diagnosis of bovine fascioliasis using the specific antigen F2. *Vet. Parasitol.*, **42** (1-2): 53–66.

Levieux D., Levieux A., Mage C., Venien A. (1992b). Early immunodiagnosis of bovine fascioliasis using the specific antigen f2 in a passive hemagglutination test. *Vet. Parasitol.*, **44** (1-2), 77-86.

Levieux D., Levieux A. (1994). Early immunodiagnosis of caprine fasciolosis using the specific f2 antigen in a passive hemagglutination test. *Vet. Parasitol.*, **53** (1-2): 59–66.

Lightowers M.W., Rickard M.D. (1988). Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune response. *Parasitol.*, **96**: 123–166.

Lin A.V. (2015). Indirect ELISA. *Methods Mol. Biol.*, **1318**: 51–59. Doi : 10.1007/978-1-4939-2742-5_5.

Linh B.K., Thuy D.T., My L.N., Sasaki O., Yoshihari S. (2003). Application of agar gel diffusion test to the diagnosis of fasciolosis in cattle and buffaloes in the red river delta of Vietnam. *Japan Agr. Res. Quart.*, **37** (3): 201–205.

- Lowther J., Robinson M.W., Donnelly S.M., Xu W., Stack C.M., Matthews J.M., Dalton J.P.** (2009). The importance of pH in regulating the function of the *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine protease, *Plos. Negl. Trop. Dis.*, **3** (1) e369. Doi : 10.1371/ journal.pntd.0000369.
- Loyacano A.F., Williams J.C., Gurie J., Derosa A.** (2002). Effect of gastrointestinal nematode and liver fluke infections on weight gain and reproductive performance of beef beifers. *Vet. Parasitol.*, **107**: 227–234.
- Madigan M., Martinko J.** (2007). Biologie des micro-organismes. Chapitre 24 : Diagnostic microbiologique et immunologique. *Edition Brock, 11^{ème} édition*, publié par Pearson Education France, Paris, 1047 pages.
- Mage C., Legarto J.** (1986). Étude de l'influence d'un traitement contre la grande douve sur la production laitière. Institut Technique de l'Élevage Bovin, n° **86112**, 13 pages.
- Mage C., Raynal, P., Rondelaud, D., Chasteloux, C.** (1989). Mise en pratique du contrôle de l'infestation par *Fasciola hepatica* chez les bovins limousins. *Bull., G.T.V.*, **6**: 5–10.
- Mage C.** (1990). Conséquences zootechniques de l'infestation naturelle par *Fasciola hepatica* chez des taurillons limousins. *Rev. Méd. Vét.*, **141**: 205–208.
- Maggioli G., Piacenza L., Carambula B., Carmona C.** (2004). Purification, characterization, and immunolocalization of a thioredoxin reductase from adult *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.*, **90** (2): 205–2011.
- Maggioli G., Acosta D., Silveira F., Rossi S., Giacaman S., Basika T., Gayo V., Rosadilla D., Roche L., Tort J., Carmona C.** (2011). The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvant confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine*, **29** (48): 9057–9063. Doi : 10.1016/j.
- Maggioli G, Bottini G, Basika T, Alonzo P, Salinas G, Carmona C.** (2016). Immunization with *Fasciola hepatica* thioredoxin glutathione reductase failed to confer protection against fasciolosis in cattle. *Vet. Parasitol.*, **224**: 13–19. Doi : 10.1016/j. vetpar.2016.05.007.
- Maizels R.M., Bundy D.A.P., Selkirk M.E., Smith D.F., Anderson R.M.** (1993). Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature*, **365**: 797–805.
- Malone J.B.** (1986). Fascioliasis and cestodiasis in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **2**: 261–175.
- Marcos L., Maco V., Samalvides F., Terashima A., Espinosa J.R., Gotuzzo E.** (2006). Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case-control study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **100** (2): 158–166.
- Marouf A.** (2001). Analyse instrumentale à l'usage des biologistes. Edition Dar El Gharb, *2^{ème} édition*, 276 pages.

- Martins-Gomes C., Silva A.M.** (2018). Western Blot methodologies for analysis of in vitro protein expression induced by teratogenic agents. *Meth. Mol. Biol.*, **1797**: 191–203. Doi : 10.1007/978-1-4939-7883-0_9.
- Mas-Coma S., Esteban J.G., Bargues M.D.** (1999). Epidemiology of human fascioliasis : a review and proposed new classification. *Bull. World Health Organ.*, **77** (4): 340–346.
- Mas-Coma S.** (2005). Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J. Helminthol.*, **79** (3): 207–216.
- Mas-Coma S., Bargues M.D., Valero M.A.** (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, **35** (11-12): 1255–1278.
- Mas-Coma S., Valero M.A., Bargues M.D.** (2009). Chapter 2. Fasciola, Lymnaeids and human fascioliasis with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv. Parasitol.*, **69**: 41–146.
- Mason R.W., Walker J.E., Northrop F.D.** (1986). The N-terminal amino acid sequences of the heavy and light chains of human cathepsin L. Relationship to a cDNA clone for a major cysteine proteinase from a mouse macrophage cell line. *Biochem. J.*, **240** (2): 373–377.
- McAllister H.C., Nisbet A.J., Skuce P.J., Knox D.P.** (2011). Using lectins to identify hidden antigens in *Fasciola hepatica*. *J. helminthol.*, **85** (2): 121–127. Doi : 10.1017/S0022149X10000829.
- McGinty A., Moore M., Halton D.W., Walker B.** (1993). Characterization of the cysteine proteinases of the common liver fluke *Fasciola hepatica* using novel active site directed affinity labels. *Parasitology*, **106** (5): 487–493.
- McGonigle S., Dalton J.P.** (1995). Isolation of *Fasciola hepatica* haemoglobin. *Parasitology*, **111** (2): 209–215.
- McKenna S.L., Dohoo I.R.** (2006). Using and interpreting diagnostic tests. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **22** (1): 195–205.
- McManus D.P., Dalton J.P.** (2006). Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology*, **133**, Suppl: S43–61.
- McVeigh P., Maule A.G., Dalton J.P., Robinson M.W.** (2012). *Fasciola hepatica* virulence-associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microbes Infect.*, **14** (4): 301–310. Doi : 10.1016/j.micinf.2011.11.012.
- Meemon K. et Sobhon P.** (2015). Juvenile-specific cathepsin proteases in *Fasciola* spp.: their characteristics and vaccine efficacies. *Parasitol. Res.*, **114** (8): 2807–2813. Doi : 10.1007/s00436-015-4589-6.

- Meissonnier E., Mage C.** (2007). Les méthodes de détection de *Fasciola hepatica* dans les troupeaux bovins en France : *methods of detection of Fasciola hepatica in cattle in France*. *Bull. Acad. Vét. France*, **160** (5): 395–406.
- Mehlhorn H.** (2008). Encyclopedia of parasitology. 3^{ème} édition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 280 pages.
- Mekroud A.** (2004). Contribution à l'étude de la distomatose à *Fasciola hepatica* Linnaeus 1758, dans le Nord Est Algérien. Recherches sur les ruminants et le mollusque hôte. *Thèse de Doctorat d'Etat en Sciences Vétérinaires*, Université Mentouri de Constantine, 299 pages.
- Mekroud A., Benakhla A., Vignoles P., Rondelaud D., Dreyfuss G.** (2004). Preliminary studies on the prevalences of natural fasciolosis in cattle, sheep, and the host snail (*Galba truncatula*) in north-eastern Algeria. *Parasitol. Res.*, **92** (6): 502–505.
- Mekroud A., Titi A., Benakhla A. et Rondelaud D.** (2006). The proportion of liver excised in Algerian abattoirs is not a good indicator of *Fasciola hepatica* infections in local cattle breeds. *J. Helminthol.*, **80** (3), 319–321.
- Merril C., Goldman D., Van Keuren M.** (1982). Simplified silver protein detection and image enhancement methods in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **3**: 17–20.
- Mesghi B., Jalousian F., Fathi S., Jahani Z.** (2018). Design and synthesis of a new peptide derived from *Fasciola gigantica* cathepsin L1 with potential application in serodiagnosis of fascioliasis. *Exp. Parasitol.*, **189**: 76–86. Doi : 10.1016/j.exppara.2018.04.013.
- Metais P., Agneray J., Ferand G., Fruchart J.C.** (1990). Biochimie clinique. I- Biochimie analytique, 2^{ème} édition, Paris, SIMEP, 259 pages.
- Meyer F., Meyer H., Bueding E.** (1970). Lipid metabolism in the parasitic and free living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. *Bioch. Biophys. Acta*, **210** (2):257–66.
- Mezo M, González-Warleta M, Ubeira F.M.** (2003). Optimized serodiagnosis of sheep fascioliasis by Fast-D protein liquid chromatography fractionation of *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens. *J. Parasitol.*, **89** (4): 843–849.
- Mezo M., González-Warleta M., Carro C., Ubeira F.M.** (2004). An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *J. Parasitol.*, **90** (4): 845–852.
- Mishra M., Tiwari S., Gomes A.V.** (2017). Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev. Proteomics*, **14** (11): 1037–1053. Doi : 10.1080/14789450.2017.1388167.
- Milon A., Pellerin J.L., Geral M.F., Perol S., Lautie R.** (1985). Sérologie de la chlamydie ovine par le test E.L.S.A. Utilisation d'un antigène commercial préparé à partir d'une souche de *Chlamydia trachomatis*. *Rev. Méd. Vét.*, **136** (1): 13–24.

- Mokhtarian K., Meamar A.R., Khoshmirsafa M., Razmjou E., Masoori L., Khan mohammadi M., Akhlaghi L., Falak R.** (2018). Comparative assessment of recombinant and native immunogenic forms of *Fasciola hepatica* proteins for serodiagnosis of sheep fasciolosis. *Parasitol. Res.*, **117** (1): 225–232. Doi : 10.1007/s00436-017-5696-3.
- Molloy J.B., Anderson G.R., Fletcher T.I., Landmann J., Knight B.C.** (2005). Evaluation of a commercially available enzyme linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. *Vet. Parasitol.*, **130** (3-4): 207–212.
- Morales A., Espino A.M.** (2012). Evaluation and characterisation of *Fasciola hepatica* tegument protein extract for serodiagnosis of human fascioliasis. *Clin. Vaccine Immunol.*, **19** (11): 1870–1878.
- Moreau E., Chauvin A., Boulard C.** (1997). Interactions hôte-parasite au cours de la fasciolose à *Fasciola hepatica* chez les ruminants. *Num. spéc. Point Vét.*, **28**: 45–50.
- Morphew R.M., Wright H.A., LaCourse E.J., Woods D.J., Brophy P.M.** (2007). Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during in vitro culture ex host. *Mol. Cell. Proteomics* **6** (6): 963–972.
- Morrison C.A., Colin T., Sexton J.L., Bowen F., Wicker J., Friedel T., Spithill T.W.** (1996). Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S- transferase. *Vaccine*, **14** (17-18): 1603–1612.
- Mulcahy G., Dalton J.P.** (2001). Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res. Vet. Sci.*, **70** (1): 83–86.
- Muro A., Ramajo V., Lopez J., Simon F., Hillyer G.V.** (1997). *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet. Parasitol.*, **69** (3-4): 219–229.
- Nansen P.** (1975). Resistance in cattle to *Fasciola hepatica* induced by X ray attenuated larvae: results from a controlled field trial. *Res. in Vet. Sci.*, **19**: 279–283.
- Nozais J.P., Darty A., Danis M.** (1996). *Traité de parasitologie médicale, Édition pradel*, Paris, France, 817 pages.
- Obayashi Y., Lino R., Noji H.** (2015). A single-molecule digital enzyme assay using alkaline phosphatase with a coumarin-based fluorogenic substrate. *Analyst*, **140** (15): 5065–5073. Doi : 10.1039/c5an00714c.
- Oldham G., Hughes D.L.** (1982). *Fasciola hepatica*: immunization of rats by intra-peritoneal injection of adult fluke antigen in Freund's adjuvant. *Exp. Parasitol.*, **54**: 7–11.
- Oldham G.** (1983). Antibodies to *Fasciola hepatica* antigens during experimental infections in cattle measured by ELISA. *Vet. Parasitol.*, **13** (2): 151–158.

- Oldham G.** (1985). Immune responses in rats and cattle to primary infections with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.*, **39** (3): 357–363.
- O’Neill S.M., Parkinson M., Strauss W., Angles R., Dalton J.P.** (1998). Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (Fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified Cathepsin L cysteine proteinase. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58** (4): 417–423.
- Orejarena Avila L.P., Inguilan Benavides E.M., Padilla Sanabria L., Recalde-Reyes D.P., Rodriguez-Salazar C.A., Castaño-Osorio J.C.** (2018). Standardization of a latex agglutination test for coproantigen detection of *Fasciola* sp. in bovine cattle stool. *J. Parasit. Dis.*, **42** (1): 55–61. Doi : 10.1007/s12639-017-0964-9.
- Ortiz P.L., Claxton J.R., Clarkson M.J., McGarry J., Williams D.J.** (2000). Specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, **93** (2): 121–134.
- Overend D.J., Bowen F.L.** (1995). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust. Vet. J.*, **72** (7): 275–276.
- Palmer D.G., Lyon J., Palmer M.A., Forshaw D.** (2014). Evaluation of a coproantigen Elisa to detect *Fasciola hepatica* infection in sheep, cattle and horses. *Aust. Vet. J.*, **92** (9): 357–361. Doi : 10.1111/avj.12224.
- Pandey V. S.** (1983). Observations on *Fasciola hepatica* in donkey from Morocco. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **77** (2): 159–162.
- Parkinson M., O’Neill S.M., Dalton J.P.** (2007). Endemic human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. *Epidemiol. Infect.*, **135** (4): 669–674.
- Pautrizel R., Tribouley J., Duret J.** (1963). Diagnostic sérologique de la fasciolose à l’aide d’une réaction de fixation du complément utilisant un antigène délipidé. *Ann. Inst. Past.*, **104**: 502–506.
- Payment P., Trudel M.** (1989a). Manuel de techniques virologiques, Chapitre 9 : Chromatographie pour l’isolement des virus et des protéines virales. Sillery, Québec: *Presses de l’Université du Québec*, AUPELF, 350 pages.
- Payment P., Trudel M.** (1989b). Manuel de techniques virologiques, Chapitre 10: Electrophorèse de protéines virales en gel de polyacrylamide. Sillery, Québec: *Presses de l’Université du Québec*, AUPELF, 350 pages.
- Peinado Pelaez M., Samparo Silva M., Garcia V.G., Alvelino D.C., Osorio M.R., Lopes A.S., Morales A.G.** (1988). Étude des antigènes et anticorps circulants par des techniques d’immunoélectrodifusion et de micro Elisa. *Bull. Acad. Vet. de France*, **61**: 155–164.
- Pfister K., Turner K., Lewie A., Hall E., Jarette E.E.** (1983). Ig E production in rat fascioliasis. *Parasit. Immunol.*, **5**: 587–593.

- Pfister K.** (1984). Role of IgE in Fascioliasis. *Prev. Vet. Med.*, **2**: 359–370.
- Pfister K.** (1990). Serodiagnosis of fasciolosis in ruminants. *Rev. Sci. Techn.*, **9** (2): 511–518.
- Piacenza L., Radi R., Goni F., Carmona C.** (1998). Cu, Zn superoxide dismutase activities from *Fasciola hepatica*. *Parasitol.*, **117** (6): 555–562.
- Piacenza L., Acosta D., Basmadjian I., Dalton J.P., Carmona C.** (1999). Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect. Immun.*, **67** (4): 1954–1961.
- Piedrafita D., Spithill T.W., Dalton J.P., Brindley P.J., Sandema M.R., Wood P.R., Parsons J.C.** (2000). Juvenile *Fasciola hepatica* are resistant to killing in vitro by free radicals compared with larvae of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.*, **22** (6): 287–295.
- Poitou I., Baeza E., Boulard C.** (1992). Humoral and cellular immune response in rats during a primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, **45** (2-4): 59–71.
- Poitou I., Baeza E., Boulard C.** (1993). Kinetic responses of parasite specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, **49** (2-4): 179–190.
- Pourquier Ph., Caquineau L., Galaup M., Le Moal Y., Martain L., Salingardes F., Turmel R.** (1995). Evaluation de l'infestation naturelle de cheptels bovins par *Fasciola hepatica* d'après le titrage d'anticorps du sang ou du lait avec un reactif ELISA utilisant l'antigène spécifique F2. *Bull. Soc. Vét. Prat. De France*, **79**: 285–291.
- Qureshi T., Wagner G.G., Lynn D.L., Davies D.S., Graig T.M.** (1995). Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis of excretory-secretory proteins of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, **58** (4): 357–363.
- Rajasekariah G.R., Mitchell G.F., Chapman C.B., Montagne P.E.** (1979). *Fasciola hepatica*: Attempts to induce protection against infection in rats and mice by infection in rats and mice by injection of excretory/secretory products of immature worms. *Parasitology*, **97** (3): 393–400.
- Rapsch C., Schweitzer G., Grimm F., Kohler L., Bauer C., Deplazes P., Braun U., Togerson P.R.** (2006). Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *Intern J. Parasitol.*, **36** (10-11): 1153–1158.
- Ravidà A., Cwiklinski K., Aldridge A.M., Clarke P., Thompson R., Gerlach J.Q., Kilcoyne M., Hokke C.H., Dalton J.P., O'Neill S.M.** (2016). *Fasciola hepatica* Surface Tegument: Glycoproteins at the Interface of Parasite and Host. *Mol. Cell. Proteomics*, **15** (10): 3139–3153.

Reddington J.J., Wesleid R., Wescott R.B. (1984). A review of the antigens of *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, **14** (3-4): 209–229.

Regalla J. (1995). La réaction de fixation du complément pour le diagnostic sérologique de la péripneumonie contagieuse bovine : application et interprétation des résultats. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **14** (3), 631–644.

Rivera Marrero C.A., Santiago N., Hillyer G.V. (1988). Evaluation of immunodiagnostic antigens in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. *J. parasitol.*, **74** (2): 646–652.

Robert R., Leynia De La Jarrige P., Chabasse D., Mahaza C., Bizon C., Genthon H. (1980). Contribution au diagnostic immunologique de la fasciolose à *Fasciola hepatica* chez les bovins. Recherche d'antigène fraction II et d'anticorps anti-fraction II. *Rec. Med. Vet.*, **156**: 533–538.

Robinson M.W., Tort J.F., Wong E., Donnelly S.M., Lowther J., Xu, W., Stack C., Padula M., Herbert B., Dalton J.P. (2008a). Proteomic and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of helminth pathogen *Fasciola hepatica* : expansion of a repertoire of virulence-associated factors. *Mol. Cell proteomics*, **7** (6): 1111–1123. Doi :10. 1074/mcp. M700560-MCP200.

Robinson M.W., Dalton J.P., Donnelly S. (2008b). Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair., *Trends Biochem. Sci.*, **33** (12): 601608. Doi :10.1016/j.tibs.

Robinson M.W., Dalton J.P., O'Brien B.A., Donnelly S. (2013). *Fasciola hepatica* : the therapeutic potential of a worm secretome. *Int. J. Parasitol.*, **43** (3-4): 283–291. Doi :10. 1016/j.ijpara.2012.11.004.

Roitt I., Brostoff J., Male D. (1986). Immunologie fondamentale et appliquée. MEDSI, Paris, 186 pages.

Rokni M.B., Massoud J., Hanilo A. (2003). Comparaison of adult somatic and cysteine proteinase antigens of *Fasciola gigantica* in enzyme linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human fasciolosis. *Acta. Trop.*, **88** (1): 69–75.

Romasanta A., Romero J.L., Arias M., Sánchez-Andrade R., López C., Suárez J.L., Diaz P., Diez-Baños P., Morrondo P., Paz-Silva A. (2003). Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. *Immunol. Invest.*, **32** (3): 131–142.

Ross J.G. (1970). The economic incidence of the *Fasciola hepatica* of liver fluke infestation on milk quality. *Vet. Rec.*, **90**: 71–72.

Ruiz G. (2005). Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. Thèse de Doctorat en Chimie appliquée-Chimie de substances naturelles, Univ. Limoges, France, 258 pages.

Ruiz-Navarrete M.A., Arriaga C., Bautista C.R., Morilla A. (1993). *Fasciola hepatica*: characterization of somatic and excretory-secretory antigens of adult flukes recognized by infected sheep. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **35** (3): 301–307.

Sajid M., McKerrow J.H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms (Review). *Mol. Biochem. Parasitol.*, **120** (1): 1–21.

Salimi-Bejestani M.R., McGarry J.W., Felstead S., Ortiz P., Akca A., Williams D.J. (2005). Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Res.Vet. Sci.*, **78** (2): 177–181.

Sandeman R.M., Howell M.J. (1980). An attempt to vaccinate sheep against *Fasciola hepatica* using a juvenile fluke antigen sheep antibody complex. *Res. in Vet. Sci.*, **29**: 255–259.

Santiago N., Hillyer G.V. (1986). Isolation of potential serodiagnostic *Fasciola hepatica* antigens by electro-elution from poly-acrylamide gels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**: 1210–1217.

Santiago N., Hillyer G.V. (1988). Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*, *j. parasitol.*, **74** (5): 810–818.

Sarimehmetoglu O.H. (2002). Application of Western blotting for the immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* in cattle using excretory/secretory antigens. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **26**: 1061–1065.

Schweizer G., Braun U., Deplazes P., Torgerson P.R. (2005). Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Vet. Rec.*, **157** (7): 188–193.

Sedraoui S., Righi S., Mekroud A., Benakhla A. (2006). Approche organisationnelle de la lutte vis-à-vis de deux dominantes parasitoses chez les ovins dans le Nord est algérien: l'oestrose et la fasciolose. *1^{ères} Journées Algéro-Françaises de parasitologie*, SAPP et SFP, Alger, Palais de la culture Moufidi Zakaria, les 15 et 16 Novembre 2006.

Sexton J.L., Milner A.R., Pannacio M., Waddington J., Wijffels G., Chandler D., Thompson C., Wilson L., Spithill T.W., Mitchell G.F. (1990). Glutathion S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J. Immunol.*, **145** (11): 3905–3910.

Shafiei R., Sarkari B., Sadjjadi S.M. (2015). Performance of a 27 kDa *Fasciola hepatica* antigen in the diagnosis of human fascioliasis. *J. Lab. Physicians*, **7** (1): 17–20. Doi : 10.4103/0974-2727.154781.

Shaker Z.A., Demardash Z.A., Mansour W.A., Hassanein H.I., Elmohandes M., Elgindy H.I. (1994). Purification and characterization of a specific *Fasciola* antigen. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, **24** (2): 309–316.

Shriffi Y., Farahnak A., Golestani A., Esharaghian M.R., Faridi A., Molaei Rad M.B. (2014). Triclabendazole effect on protease enzyme activity in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica* in vitro. *Iran J. Parasitol.*, **9** (1): 107–113.

Sibille P., Tliba O., Boulard C. (2004). Early and transient cytotoxic response of peritoneal cells from *Fasciola hepatica*- infected rats. *Vet. Res.*, **35** (5): 573–584.

Sher A., James S.L., Simpson A.J., Lazdins J.K., Meltzer M.S. (1982). Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. III. Loss of susceptibility to macrophage mediated killing during maturation of *S. mansoni* schistosomule from the skin to the lung stage. *J. Immunol.*, **128** (4): 1876–1879.

Silva J.M., McMahon M. (2014). The fastest Western in town: a contemporary twist on the classic Western blot analysis. *J. Vis. Exp.*, **84**: e51149. Doi : 10.3791/51149.

Simpkin K.G., Chapman C.R., Cole G.C. (1980). *Fasciola hepatica*: a proteolytic digestive enzyme, *Exp. Parasitol.*, **49** (2): 281–287.

Simsek S., Koroglu E., Utuk A.E., Altay K. (2006). Use of indirect excretory/secretory enzyme-linked immunosorbent assay (ES-ELISA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in eosinophilic and non-eosinophilic cattle from Eastern Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **30**: 411–415.

Sinclair K.B. (1967). Pathogenesis of *Fasciola* and other liver flukes. *Helminthological Abstracts*, **36**: 115–134.

Sine J.P. (2003). Séparation et analyse des biomolécules: Méthodes physicochimiques (Cours et exercices). Chapitre I: Techniques de précipitation. *Ellipses Édition Marketing*, Paris, 258 pages.

Smith A.M., Dowd A.J., McGonigle S., Keegan P.S., Brennan G., Trudgett A., Dalton J.P. (1993). Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **62** (1): 1–8.

Smith R.S. (1995). Veterinary Clinical Epidemiology: A problem Oriented Approach. *Second edition*, CRC press, 304 pages.

Smits H.L., Van der Hoorn M.A., Goris M.G., Gussenhoven G.C., Yersin C., Sasaki D.M., Terpestra W.J., Hartskeerl R.A. (2000). Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.*, **38** (3): 1272–1275.

Soulé C., Boulard C., Levieux D., Barnouin J., Plateau E. (1989). Fasciolose équine expérimentale: évolution des paramètres sérologiques, enzymatiques et parasitaires. *Ann. Rech. Vét.*, **20**: 295–307.

Soulsby E.J.L. (1982). Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals, *7th edition Baillière Tindall*, London, 809 pages.

Speicher K.D., Gorman N., Speicher D.W. (2001). N- Terminal sequence analysis of proteins and peptides. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, CHAPTER: Unit–11.10. Doi :10.1002/0471140864.ps1110s08.

Spithill T.W., Piedrafita D., Smooker P.M. (1997). Immunological approaches for the control of fasciolosis. *Int. J. Parasitol.*, **27** (10): 1221–1235.

Spithill T.W., Dalton J.P. (1998). Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitol. Today*, **14** (6): 224–228.

Spithill T.W., Smooker P.M., Sexton J. L., Bozas E., Morrison C.A., Creaney J., Parsons J.C. (1999). Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: *Dalton J.P. Fasciolosis CAB International*, wallingford, UK, 377–401.

Stack C., Dalton J.P., Robinson M.W. (2011). The phylogeny, structure and function of trematode cysteine proteases, with particular emphasis on the *Fasciola hepatica* cathepsin L family. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **712**: 116–135. Doi : 10.1007/978-1-4419-8414-2_8.

Stitt A.W., Fairweather I., Trudgett A.G., Johnston C.F., Anderson S.M. (1992a). Localisation of actin in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.*, **78** (2): 96–102.

Stitt A.W., Fairweather I., Trudgett A.G., Johnston C.F. (1992b). *Fasciola hepatica*: localization and partial characterization of tubulin. *Parasitol. Res.*, **78** (2): 103–107.

Sulaiman A.A., Zolnierczyk K., Japa O., Owen J.P., Maddison B.C., Emes R.D., Hodgkinson J.E., Gough K.C., Flynn R.J. (2016). A trematode parasite derived growth factor binds and exerts influences on host immune functions via host cytokine receptor complexes. *PLoS. Pathog.*, **12** (11): e1005991. Doi : 10.1371/journal.ppat.1005991.

Tailliez R., et Korach S. (1970a). Les antigènes de *Fasciola hepatica*. I: Isolement et caractérisation d'un antigène spécifique du genre. *Ann. Inst. Pasteur*, **118**: 61–78.

Tailliez R., et Korach S. (1970b). Les antigènes de *Fasciola hepatica*. II: Étude immunologique et localisation in situ d'un antigène spécifique du genre. *Ann. Inst. Pasteur*. **118**: 330–390.

Tello P., Salinas P., Logueiro S., Obón A., Ojeda M. (1988). Evaluation of an indirect immunofluorescence technic for the serologic diagnosis of human fascioliasis. *Bol. Chil. Parasitol.*, **43** (1-2): 25–27.

Threagold L. T. (1963). The tegument and associated structures of *Fasciola hepatica*. *Quart. J. Microsc. Sci.* **104** (4): 505–517.

Threagold L.T. (1976). *Fasciola hepatica*: Ultrastructure and histochemistry of glycocalyx of tegument. *Exp. Parasitol.*, **39** (1): 119–134.

Tliba O., Sibille P., Boulard C., Chauvin A. (2000). Local hepatic response in rats during primary infection with *Fasciola hepatica*. *Parasite*, **7** (1): 9–18.

- Toet H., Piedrafita D.M., Spithill T.W.** (2014). Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int. J. Parasitol.*, **44** (12): 915–927. Doi :10.1016/j.ijpara.2014.07.011.
- Torgerson P., Claxton J.** (1999). Epidemiology and control. Chapter 4. In: Fasciolosis, by Dalton J.P., *Edition CABI Publishing*, Oxon, UK, 113–149.
- Torres-Rivera A., Landa A.** (2008). Glutathion transferases from parasites: a biochemical view. *Acta Trop.*, **105** (2): 99–112.
- Towatari T., Katunuma N.** (1988). Amino acid sequence of rat liver cathepsin L. *FEBS Lett.*, **236** (1): 57–61.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.** (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Biotechnology*, **24**: 145–149.
- Trap C., Boireau P.** (2000). Les protéases chez les helminthes. *Vet. Res.*, **31** (5): 461–471.
- Tribouley J., Tribouley-Duret J., Irribarren M.J., Pautrizel R.** (1969). Mise en évidence des anticorps spécifiques de *Fasciola hepatica* par hémagglutination passive en utilisant la glutaraldéhyde comme agent de couplage. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.*, **268** (17): 2215–2217.
- Trudgett A., McNair A.T., Hoey E.M., Keegan P.S., Dalton J.P., Rima B.K., Miller A., Ramasamy P.** (2000). The major tegumental antigen of *Fasciola hepatica* contains repeated elements. *Parasitology*, **121** (2): 185–191.
- Turk V., Brzin J., Lenarcic B., Locnikar P., Popovic T., Ritonja A., Babnik J., Bode W., Machleidt W.** (1985). Structure and function of lysosomal cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **180**: 91–103.
- Upadhyay A.K., Kumar M.** (2004). Immunodiagnosics in experimental fasciolosis. *Indian Vet. J.*, **81**: 228–229.
- Vaast J., Blain J.J.** (1988). Diagnostic de la fasciolose bovine, intérêt du dépistage sur laits de mélange. *Rec. Méd. Vét.*, **164**: 997–999.
- Valero M.A., Periago M.V., Pérez-Crespo I., Angels R., Villegas F., Aquirre C., Strauss W., Espinoza J.R., Herrera P., Terashima A., Tamayo H., Engels D., Gabrielli A.F., Mas-Coma S.** (2012). Field evaluation of a coproantigen detection test for fascioliasis diagnosis and surveillance in human hyperendemic areas of Andean countries. *Plos. Negl. Dis.*, **6** (9):e1812. Doi : 10.1371/journal.pntd.0001812.
- Van Milligen F.J., Cornelissen J.B., Bokhout B.A.** (1998). Location of induction and expression of protective immunity against *Fasciola hepatica* at the gut level: A study using an ex vivo infection model with ligated gut segments. *J. Parasitol.*, **84** (4): 771–777.

Varghese A., Raina O.K., Nagar G., Garg R., Banerjee P.S., Maharana B.R., Kollannur J.D. (2012). Development of cathepsin-L cysteine proteinase based Dot-enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Fasciola gigantica* infection in buffaloes. *Vet. Parasitol.*, **183** (3-4): 382–385. Doi : 10.1016/j.vetpar.2011.07.032.

Vaughan J.L., Charles J.A., Boray J.C. (1997). *Fasciola hepatica* infection in farmed emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Aust. Vet. J.*, **75** (11): 811–813.

Viet D., Beck-Candanedo S., Gray D.G. (2008). Synthesis and characterization of blue dextrans. *Carbohydrate Polymers*, **74**: 372–378.

Villa-Mancera A., Reynoso-Palomar A., Utrera-Quintana F., Carreón-Luna L. (2014). Cathepsin L1 mimotopes with adjuvant Quil A induces a Th1/Th2 immune response and confers significant protection against *Fasciola hepatica* infection in goats. *Parasitol. Res.*, **113** (1): 243–250. Doi : 10.1007/s00436-013-3650-6.

Vicente B., López-Abán J., Rojas-Caraballo J., del Olmo E., Fernández-Soto P., Muro A. (2016). Protection against *Schistosoma mansoni* infection using a *Fasciola hepatica*-derived fatty acid binding protein from different delivery systems. *Parasit. Vectors*, **9**: 216. Doi : 10.1186/s13071-016-1500-y.

Wada K., Tanabe T. (1986). N-terminal amino acid sequences of the heavy and light chains of chicken liver cathepsin L. *FEBS Lett.*, **209** (2): 330–334.

Wedrychowicz H., Turner K. (1987). Antibody isotypes involved in local and systemic humoral responses of rats to primary and secondary infection with *Fasciola hepatica*. *Acta. Parasitol. Pol.*, **4**: 369–382.

Wicki P., Schwalbach B., Charbon J.L., Steiner A., Lang M., Loup F., Pfister K. (1991). Réactions cellulaires intestinales du bovin après infection par *Fasciola hepatica*. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **133**: 429–437.

Wijffels G.L., Sexton J.L., Salvator L., Pettitt J.M., Humphris D.C., Panaccio M., Spithill T.W. (1992). Primary sequence heterogeneity and tissue expression of glutathion S-transferase of *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.*, **74** (1): 87–99.

Wilson M.E., Sandor M., Blum A.M., Young B.M., Metwali A., Elliott D., Lynch R.G., Weinstock J.V. (1997). Local suppression of IFN- gamma in *Fasciola hepatica* granulomas correlates with tissue- specific replication of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.*, **156**: 2231–2239.

Wilson R.A., Wright J.M., de Castro-Borges W., Parker-Manuel S.J., Dowle A.A., Ashton P.D., Young N.D., Gasser R.B., Spithill T.W. (2011). Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome. *Int. J. Parasitol.*, **41** (13-14): 1347–1359. Doi :10.1016/j.ijpara.2011.08.003.

Zawistowska-Deniziak A., Wasyl K., Norbury L.J., Wesolowska A., Bień J., Grodzik M., Wiśniewski M., Baska P., Wedrychowicz H. (2013). Characterization and differential expression of cathepsin L3 alleles from *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **190** (1): 27–37. Doi : 10.1016/j.molbiopara.2013.06.001.

Zimmerman G.L., Jen L.W., Cerro J.E. Farnsworth K.L., Wescott R.B. (1982). Diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in sheep by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* **43** (12): 2097–2100.

Zimmerman G.L., Kerkvliet N.I., Brauner J.A., Cerro J.E. (1983). Modulation of host immune response by *Fasciola hepatica*: responses of peripheral lymphocytes to mitogens during liver fluke infections of sheep. *J. Parasit.* **69**: 473–477.

Zimmerman G.L., Clark C.R. (1986). Separation of parasite antigens by molecular exclusion, anion exchange, and chromatofocusing utilizing FPLC protein fractionation systems. *Vet. Parasitol.*, **20** (1-3): 217–228.

REFERENCES DES SITES WEB:

[1].

<https://fineartamerica.com/featured/1-light-micrograph-of-liver-fluke-fasciola-hepatica-sinclair-stammers.html>

(Consulté en Juin 2018).

[2].

http://parasitologie.univ-lorraine.fr/cycles/diaporama.php?nom_fichier=fasciola_hepatica/diaporama3/fasciola_hepatica_3.xml

(Consulté en Juin 2018).

[3]. <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/distomatoses/site/html/1.html#intro>

(Consulté en Juin 2018).

[4].

<http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/obsah/kfr/Complement%20Fixation%20Assay.htm>

(Consulté en Juillet 2018).

[5].

<http://www4.ac-nancy-metz.fr/svt/enseign/svt/ressour/rescien/Immuno/immacmar.htm>

(Consulté en Juillet 2018).

[6].

<https://i2.wp.com/micrognome.priobe.net/wp-content/uploads/2013/08/IHA-cartoon1.jpg>

(Consulté en Juin 2018).

[7].

https://fr.wikipedia.org/wiki/Western_blot (consulté en Janvier 2018).

[8].

<https://www.anticorps-enligne.fr/ressources/17/1224/test-de-western-blot-immunotransfert-electrophorese-de-proteines-sur-gel/>

(Consulté en Janvier 2018).

[9].

<https://www.mybiosource.com/learn/ELISA>

(Consulté en Janvier 2018).

[10].

https://fr.wikipedia.org/wiki/Méthode_de_Bradford

(Consulté en Novembre 2017).

[11].

La chromatographie d'exclusion stérique pour l'analyse de biomolécules :

<https://cn.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3651FR.pdf>

(Consulté en Novembre 2017).

[12].

Les différentes techniques de chromatographie :

<http://www.123bio.net/cours/chromato/exclusion.html>

(Consulté en Novembre 2017).

[13].

Séparation de protéines par colonne de chromatographie :

<https://moodle.umons.ac.be/mod/resource/view.php?id=68246>

(Consulté en Novembre 2017).

[14].

Chromatographie de filtration sur gel :

http://www8.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/siitub/chrfilgel.html

(Consulté en Novembre 2017).

[15].

Électrophorèse. Aspect théorique :

http://www.takween.com/techniques/05_Electrophorese.html

(Consulté en Février 2018).

[16].

L'électrophorèse des protéines et des acides nucléiques :

<http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/TexteTD/8TPmethodologie/5Electrophorese/1Electrophorese.htm>

(Consulté en Février 2018).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les principales espèces de limnées intervenant comme hôtes intermédiaire naturels dans le cycle évolutif de <i>F. hepatica</i> .	13
Tableau 2: Fractions communes de divers helminthes avec <i>F. hepatica</i> .	34
Tableau 3: Récapitulation des différentes techniques ELISA utilisées en diagnostic sérologique de la fasciolose et évaluation de leurs sensibilités (Se) et spécificités (Sp).	52
Tableau 4: Détermination par dosage colorimétrique des concentrations des constituants antigéniques (protéines, sucres et lipides) présents dans les différents extraits de <i>F. hepatica</i> ; à l'état brut ^a et après concentration au sulfate d'ammonium (A.C) ^b .	88
Tableau 5: Résultats obtenus par le dosage colorimétrique des constituants antigéniques présents dans l'extrait somatique brut de <i>F. hepatica</i> et dans les fractions issues du gel filtration de cet extrait sur Sephadex G-200.	95
Tableau 6: Récapitulatif des résultats d'analyses sérologiques effectuées sur les 80 sérums de bovins par les tests ELISA _(FP) et ELISA _(PES) , ainsi que les résultats d'autopsie post mortem des foies de ces animaux, exprimés en fonction du type de diagnostic biologique.	106
Tableau 7: Résultats sérologiques exprimés en nombre et pourcentage d'animaux dépistés par ELISA _(FP) et ELISA _(PES) , en fonction de leur statut diagnostique.	107
Tableau 8: Résultats, exprimés en pourcentage, des trois paramètres sérologiques (sensibilité, spécificité et précision) déterminés pour l'ELISA _(FP) et l'ELISA _(PES) .	108
Tableau 9: Comparaison des résultats sérologiques, exprimés en nombre et pourcentage, des 80 sérums testés par ELISA _(FP) et ELISA _(PES) .	110
Tableau 10: Comparaison des résultats de la recherche des douves adultes dans les foies des 80 bovins abattus avec les résultats d'analyses sérologiques de leurs sérums par le test ELISA _(FP) et le test ELISA _(PES) .	111
Tableau 11: Bilan de précipitation fractionnée à l'acétone du surnageant de culture des douves adultes de <i>F. hepatica</i> .	121
Tableau 12: Bilan des différentes étapes de purification de l'enzyme brute libérée dans le milieu d'incubation des douves adultes de <i>F. hepatica</i> .	124

<u>Tableau 13:</u> Effet de quelques inhibiteurs de protéases et de l'agent réducteur β -Mercaptoéthanol sur l'activité protéolytique de l'enzyme purifiée.	129
<u>Tableau 14:</u> Effet de la spécificité du substrat sur l'activité protéolytique de l'enzyme purifiée, à différents pH.	130
<u>Tableau 15:</u> Valeurs des constantes cinétiques déterminées pour la protéase pure en présence de différents substrats.	133
<u>Tableau I:</u> Quantités en (g) de sulfate d'ammonium cristallisé à ajouter à un litre de solution protéique en fonction du pourcentage de saturation désirée, à 0 °C.	182
<u>Tableau II:</u> Gamme d'étalonnage établie pour le dosage des protéines totales, à partir de concentrations croissantes de BSA.	182
<u>Tableau III:</u> Valeurs densitométriques moyennes (DO_{moy}) obtenues par dosage de la gamme d'étalonnage de BSA par la méthode de Bradford.	183
<u>Tableau IV:</u> Gamme d'étalonnage établie pour le dosage des carbohydrates totaux, à partir de concentrations croissantes de D- Glucose.	184
<u>Tableau V:</u> Valeurs densitométriques moyennes (DO_{moy}) obtenues par dosage de la gamme d'étalonnage du D- glucose par la méthode au phénol-acide sulfurique.	184
<u>Tableau VI:</u> Gamme d'étalonnage établie pour le dosage des lipides totaux, à partir de concentrations croissantes d'acide oléique.	185
<u>Tableau VII:</u> Valeurs densitométriques moyennes (DO_{moy}) obtenues par dosage de la gamme d'étalonnage de l'acide oléique par la méthode au sulpho-phosphanilline.	186
<u>Tableau VIII:</u> Protéines standards de différents poids moléculaires utilisées comme marqueurs de taille en électrophorèse SDS-PAGE.	187
<u>Tableau IX:</u> Valeurs des vitesses initiales en fonction des concentrations croissantes du substrat fluorogène pour la détermination des constantes cinétiques K_M et V_{max} .	190
<u>Tableau X:</u> Valeurs des vitesses initiales en fonction des concentrations croissantes du substrat hémoglobine pour la détermination des constantes cinétiques K_M et V_{max} .	190
<u>Tableau XI:</u> Valeurs des vitesses initiales en fonction des concentrations croissantes du substrat caséine pour la détermination des constantes cinétiques K_M et V_{max} .	191

<u>Tableau XII:</u> Valeurs des vitesses initiales en fonction des concentrations croissantes du substrat albumine pour la détermination des constantes cinétiques K_M et V_{max} .	
<u>Tableau A:</u> Récapitulatif des différentes étapes nécessaires pour la réalisation pratique du test Elisa.	198
<u>Tableau B:</u> Résultats des lectures densitométriques (D.O) fournis par l'automate, obtenus suite à l'examen des 80 sérums de bovins par ELISA utilisant l'antigène purifié ($ELISA_{(Fp)}$).	199
<u>Tableau C:</u> Résultats des lectures densitométriques (D.O) fournis par l'automate, obtenus suite à l'examen des 80 sérums de bovins par ELISA utilisant l'antigène excrété-sécrété ($ELISA_{(PES)}$).	201
<u>Tableau D:</u> Résultats des analyses sérologiques effectuées sur les 80 sérums bovins par le test $ELISA_{(F,p)}$ et les résultats du diagnostic biologique établi pour chaque animal testé.	203
<u>Tableau E:</u> Résultats des analyses sérologiques effectuées sur les 80 sérums bovins par le test $ELISA_{(PES)}$ et les résultats du diagnostic biologique établi pour chaque animal testé.	205

LISTE DES FIGURES

Figure 1: <i>Fasciola hepatica</i> adulte.	6
Figure 2: <i>F. hepatica</i> adulte (moitié antérieure).	6
Figure 3 : Ventouse buccale et ventouse ventrale de <i>Fasciola hepatica</i> .	6
Figure 4: Structure du tégument de <i>F. hepatica</i> .	7
Figure 5: Appareil digestif de <i>F. hepatica</i> adulte.	8
Figure 6: Appareil reproducteur de <i>F. hepatica</i> adulte.	8
Figure 7: Appareil excréteur de <i>F. hepatica</i> .	9
Figure 8: Système nerveux de <i>F. hepatica</i> .	9
Figure 9: Les hôtes définitifs de <i>F. hepatica</i> .	11
Figure 10: Œuf de <i>F. hepatica</i> .	12
Figure 11: Miracidium de <i>F. hepatica</i> .	15
Figure 12: Sporocyste de <i>F. hepatica</i> .	15
Figure 13: Rédie de <i>F. hepatica</i> .	15
Figure 14: Cercaire de <i>F. hepatica</i> .	17
Figure 15: Métacercaires de <i>F. hepatica</i> .	17
Figure 16: Coupe verticale de la paroi de la métacercaire de <i>F. hepatica</i> .	17
Figure 17: Le cycle évolutif de <i>F. hepatica</i> et les différents stades de développement.	19
Figure 18: A. – Courbes densitométriques des protéinogramme, lipoprotéinogramme et glycoprotéinogramme de <i>F. hepatica</i> , B. – Schéma de l'électrophorèse en gel d'amidon de cet antigène révélé à l'amidoschwarz.	28
Figure 19: Analyse immunoélectrophorétique en gélose des antigènes de <i>F. hepatica</i> .	30

Figure 20: Schéma de purification de l'antigène spécifique (fII) de <i>F. hepatica</i> .	33
Figure 21: Analyse immunoélectrophorétique en gélose des antigènes de <i>F. hepatica</i> : fraction E.S non purifiée et de sept autres helminthes par un sérum de lapin anti- <i>F. hepatica</i> .	35
Figure 22: Réaction d'ADCC et mécanismes d'échappement de <i>F. hepatica</i> .	42
Figure 23: Principe de la réaction de fixation du complément.	44
Figure 24: Principe de l'immunofluorescence indirecte.	46
Figure 25: Principe de l'hémagglutination indirecte.	48
Figure 26: Principe général de l'ELISA indirect.	50
Figure 27: Principe général de l'ELISA direct en sandwich.	56
Figure 28: Étapes d'obtention des produits excrétés-sécrétés bruts de <i>Fasciola hepatica</i> (PESFh).	69
Figure 29: Etapes d'obtention des antigènes somatiques bruts de <i>Fasciola hepatica</i> (ASFh).	71
Figure 30: Tracé de la séparation chromatographique de l'extrait somatique brut sur gel Sephadex G-200. Colonne : 1,1 x 65 cm ; Eluant : tampon PBS 0,15 M pH 7,2 ; Débit : 25 ml/h ; Fractions collectées : 2 ml.	91
Figure 31: Tracé de la séparation chromatographique du produit excrété-sécrété, après concentration au SA, sur gel Sephadex G-200. Colonne : 1,1 x 65 cm ; Eluant : tampon PBS 0,15 M pH 7,2 ; Débit : 25 ml/h ; Fractions collectées : 2 ml.	91
Figure 32: Tracé de la séparation chromatographique de l'extrait tégumentaire, après concentration au SA, sur gel Sephadex G-200. Colonne: 1,1 x 65 cm ; Eluant: tampon PBS, 0,15 M pH 7,2 ; Débit: 25 ml/h ; Fractions collectées: 2 ml.	92
Figure 33: Tracé de la purification par chromatographie d'affinité ConA- Sepharose 4B de la 1 ^{ère} fraction (F.1) sortie gel Sephadex G-200. Colonne d'affinité : 1 x 15 cm ; Éluant : Tris 10 mM, pH 7,2 contenant 0,5 M NaCl, 1 mM MnCl ₂ et 1 mM CaCl ₂ ; Débit : 12 ml/h ; Fractions collectées: 2 ml.	97
Figure 34: Profils d'analyse électrophorétique des différents extraits antigéniques bruts de <i>F. hepatica</i> sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE	98

à 12% : l'extrait somatique (B) , le produit excrété-sécrété (C) et l'extrait tégumentaire (D) , en présence de marqueurs de PM standards (A) .	
Figure 35: Profils d'analyses électrophorétiques sur SDS-PAGE à 12% des différentes fractions antigéniques sortie gel Sephadex G-200 (F.1, F.2, F.3, F.4, F.5) ainsi que la fraction purifiée (F.p) sortie gel d'affinité ConA-Sepharose 4B. Le gel polyacrylamide est coloré au nitrate d'argent.	99
Figure 36: Test d'immunodiffusion révélant des réactions de précipitation positives. (A) : entre l'anti-sérum (puits central) et les fractions F.1 (puits 1), F.2 (puits 2), F.3 (puits 3), F.4 (puits 4) et F.5 (puits 5). (B) : entre l'antisérum (puits central) et la fraction non- liée sur ConA-Sepharose 4B ou fraction purifiée (puits 1), la fraction liée (puits 2). (C) : témoins négatifs.	102
Figure 37: Profil d'élution de la fraction d'acétone à 40-60% sur une colonne de gel filtration Sephadex G-100.	122
Figure 38: Résultats de zymographie en gel de polyacrylamide à 12 % contenant la caséine à 1%, en présence de SDS (caséine-PAGE) des PES <i>Fh</i> (a) , du pool P ₂ sortie Sephadex G- 100 (b) et de la fraction correspondant à la protéase purifiée (c) .	122
Figure 39: Profil d'élution du pool P ₂ sortie Sephadex G-100 sur une colonne échangeuse d'anions DEAE-cellulose.	123
Figure 40: Profil électrophorétique SDS-PAGE dans des conditions réductrices de la protéase purifiée. Marqueurs protéiques de poids moléculaires standards (piste 1) , extrait enzymatique brut du PES <i>Fh</i> (piste 2) et la protéase purifiée (piste 3) .	124
Figure 41: Effet de la T° sur l'activité (a) et la stabilité (b) de la protéase purifiée.	126
Figure 42: Effet du pH sur l'activité (a) et la stabilité (b) de la protéase purifiée.	127
Figure 43: Alignement de la séquence N-terminal des 15 acides aminés de la protéase purifiée (cystéine-"like"protéase) avec les séquences N-terminales publiées de différents cathepsines Lysosomales de <i>F. hepatica</i> et celles isolées des foies d'autres espèces animales.	132
Figure 44: Test d'immunoblot de la protéase purifiée avec du sérum dilué au 1/100 ^{ème} , provenant de moutons infestés expérimentalement avec des métacercaires de <i>F. hepatica</i> , à la 1 ^{ère} SPI (piste 1), la 2 ^{ème} SPI (piste 2) et la 7 ^{ème} SPI (piste 3). Les protéines standards sont indiquées à gauche. La flèche	135

à droite indique la position de la protéase immunoréactive, de PM 22 kDa.	
Figure I: Courbe d'étalonnage $DO_{moy.} = f([BSA])$ pour le dosage des protéines totales dans les différents échantillons.	183
Figure II: Courbe d'étalonnage $DO_{moy.} = f([D\text{-glucose}])$ pour le dosage des carbohydrates totaux dans les différents échantillons.	185
Figure III: Courbe d'étalonnage $DO_{moy.} = f([Acide\ oléique])$ pour le dosage des lipides totaux dans les différents échantillons.	186
Figure IV: Représentation de Lineweaver-Burk ($1/V_i$) en fonction de $1/[Z\text{-Phe-Arg-AMC}]$ (a) et $1/[Hémoglobine]$ (b), indiquant les valeurs K_M et V_{max} de la protéase purifiée pour ces deux substrats.	192
Figure V: Représentation de Lineweaver-Burk ($1/V_i$) en fonction de $1/[Caséine]$ (c) et $1/[Albumine]$ (d), indiquant les valeurs K_M et V_{max} de la protéase purifiée pour ces deux substrats.	193
Photo 1: Foie de bovin parasité par des formes adultes de <i>F. hepatica</i> .	66
Photo 2: Lavages en série et sélection des douves adultes et vivantes de <i>F. hepatica</i> avant leur incubation.	66
Photo 3: Incubation des douves adultes et vivantes dans un milieu stérilisé et tamponné pour l'obtention de leur produit excrété-sécrété (PES).	68
Photo I: Immunisation d'un lapin au niveau de la partie dorsale par l'extrait somatique brut de douves adultes de <i>F. hepatica</i> .	188
Photo II: Gamme d'étalonnage du BSA coloré au bleu de Coomassie pour le dosage des protéines totales dans les différents échantillons.	188
Photo III: Gamme d'étalonnage du D-glucose coloré au phénol- acide sulfurique pour le dosage des sucres totaux dans les différents échantillons.	189
Photo IV: Gamme d'étalonnage de l'acide oléique coloré au sulfo-phosphovanilline pour le dosage des lipides totaux dans les différents échantillons.	189

ANNEXE I

Tableau I : Quantités en (g) de sulfate d'ammonium cristallisé à ajouter à un litre de solution protéique en fonction du pourcentage de saturation désirée, à 0 °C [8].

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

Tableau II : Gamme d'étalonnage établie pour le dosage des protéines totales, à partir de concentrations croissantes de BSA.

Tubes	Blanc	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
- Etalon BSA à 1,25 mg/ml <i>Volume prélevé (µl)</i>	0	20	40	60	80	100
- Sol. physiologique (NaCl 9 ‰) <i>Volume de dilution (µl)</i>	100	80	60	40	20	0
- Quantité de BSA/tube <i>(Concentration en µg/100 µl)</i>	0	25	50	75	100	125
- Réactif de Bradford <i>Volume ajouté (ml)</i>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
- Lecture de l'absorbance (D.O.) <i>A 540 nm.</i>	-	-	-	-	-	-

Tableau III : Valeurs densitométriques moyennes (DO_{moy}) obtenues par dosage de la gamme d'étalonnage de BSA par la méthode de Bradford.

Tubes DO	Blanc (00 mg/ml)	T₁ (0,25 mg/ml)	T₂ (0,5 mg/ml)	T₃ (0,75 mg/ml)	T₄ (1 mg/ml)	T₅ (1,25 mg/ml)
1 ^{ère} lecture	00	0,176	0,350	0,425	0,588	0,733
2 ^{ème} lecture	00	0,155	0,286	0,447	0,581	0,787
3 ^{ème} lecture	00	0,166	0,336	0,442	0,608	0,740
DO_(moy.)	00	0,165	0,324	0,438	0,592	0,753

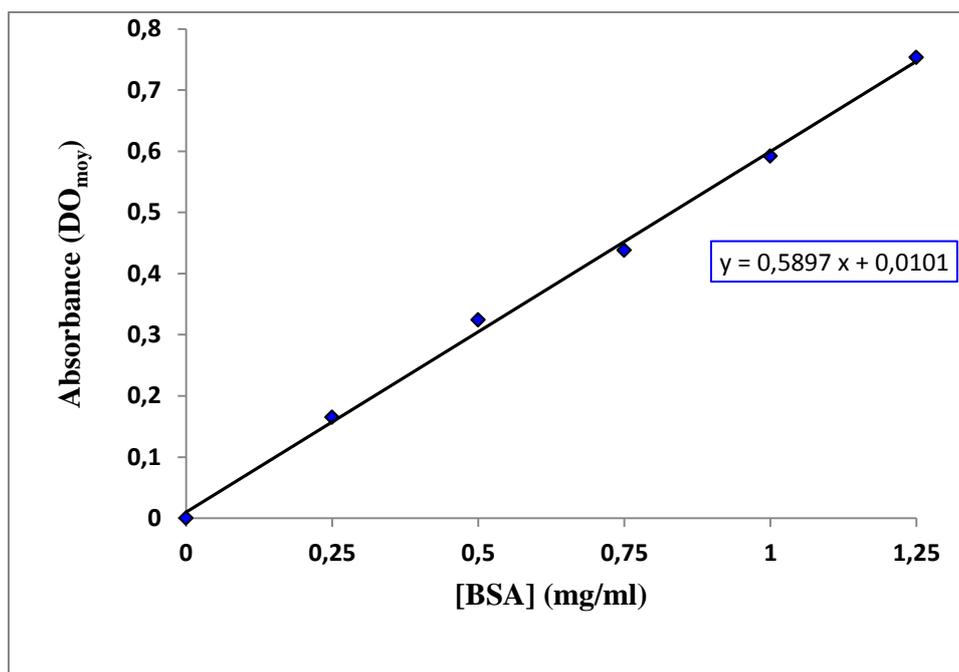


Figure I : Courbe d'étalonnage $DO_{moy} = f([BSA])$ pour le dosage des protéines totales dans les différents échantillons.

Tableau IV : Gamme d'étalonnage établie pour le dosage des carbohydrates totaux, à partir de concentrations croissantes de D- Glucose.

Tubes	Blanc	T₁	T₂	T₃	T₄	T₅
- Etalon D-glucose à 1 mg/ml <i>Volume prélevé (µl)</i>	0	200	400	600	800	1000
- H ₂ O distillée <i>Volume de dilution (µl)</i>	100	80	60	40	20	0
- Qtité de D-glucose/tube <i>(Conc. en mg/ml)</i>	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
- Phénol à 80% <i>Volume ajouté (µl)</i>	50	50	50	50	50	50
- Acide sulfurique à 95% <i>Volume ajouté (ml)</i>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
- Lecture de l'absorbance (D.O.) <i>A 490 nm.</i>	-	-	-	-	-	-

Tableau V : Valeurs densitométriques moyennes (DO_{moy}) obtenues par dosage de la gamme d'étalonnage du D- glucose par la méthode au phénol-acide sulfurique.

Tubes DO	Blanc (00 mg/ml)	T₁ (0,2 mg/ml)	T₂ (0,4 mg/ml)	T₃ (0,6 mg/ml)	T₄ (0,8 mg/ml)	T₅ (1 mg/ml)
1 ^{ère} lecture	00	0,214	0,423	0,675	0,907	1,123
2 ^{ème} lecture	00	0,235	0,431	0,679	0,920	1,116
3 ^{ème} lecture	00	0,238	0,430	0,689	0,918	1,106
DO_(moy)	00	0,229	0,428	0,681	0,915	1,115

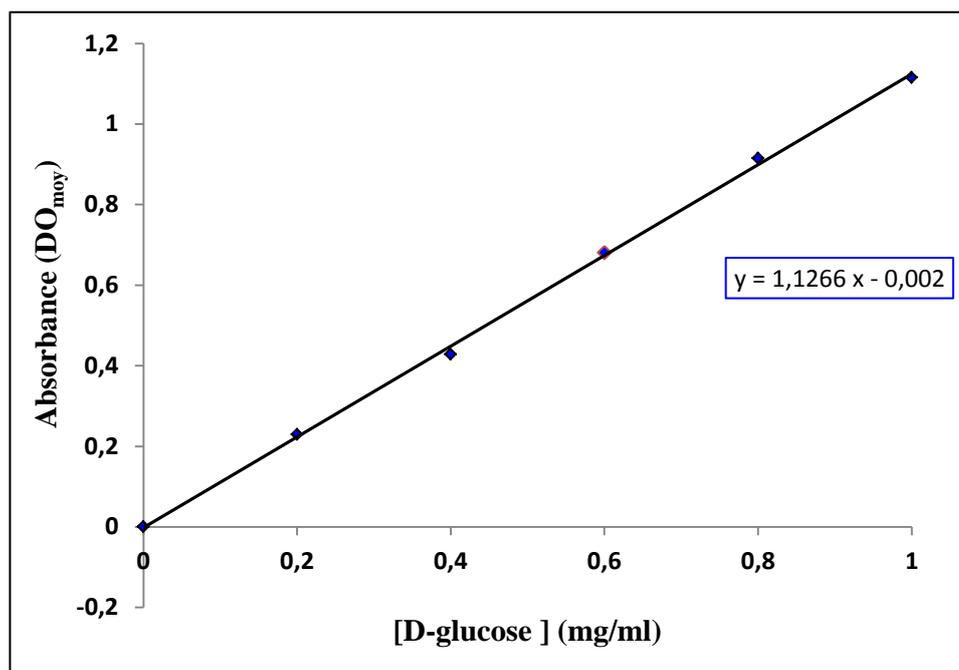


Figure II : Courbe d'étalonnage $DO_{moy} = f([D\text{-glucose}])$ pour le dosage des carbohydrates totaux dans les différents échantillons.

Tableau VI : Gamme d'étalonnage établie pour le dosage des lipides totaux, à partir de concentrations croissantes d'acide oléique.

Tubes	Blanc	T₁	T₂	T₃	T₄	T₅
- Acide phosphorique à 95%	2	2	2	2	2	2
<i>Volume (ml)</i>						
- Acide sulfurique à 80%	2	2	2	2	2	2
<i>Volume (ml)</i>						
- Oléate (1 mg/ml) dans l'Ac. sulfurique (μ l)	0	200	400	600	800	1000
- Acide sulfurique à 80%	1000	800	600	400	200	0
<i>Volume de dilution (μl)</i>						
- Qtité d'Oléate/tube (<i>Conc. en mg/ml</i>)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
- Solution de vanilline à 0,6%	1	1	1	1	1	1
<i>Volume ajouté (ml)</i>						
- Lecture de l'absorbance (D.O.) <i>A 540 nm.</i>	-	-	-	-	-	-

Tableau VII : Valeurs densitométriques moyennes (DO_{moy}) obtenues par dosage de la gamme d'étalonnage de l'acide oléique par la méthode au sulfo-phosphovanilline.

Tubes DO	Blanc (00 mg/ml)	T ₁ (0,2 mg/ml)	T ₂ (0,4 mg/ml)	T ₃ (0,6 mg/ml)	T ₄ (0,8 mg/ml)	T ₅ (1 mg/ml)
1 ^{ère} lecture	00	0,086	0,153	0,233	0,337	0,413
2 ^{ème} lecture	00	0,067	0,161	0,279	0,320	0,435
3 ^{ème} lecture	00	0,084	0,190	0,259	0,318	0,406
DO_(moy.)	00	0,079	0,168	0,257	0,325	0,418

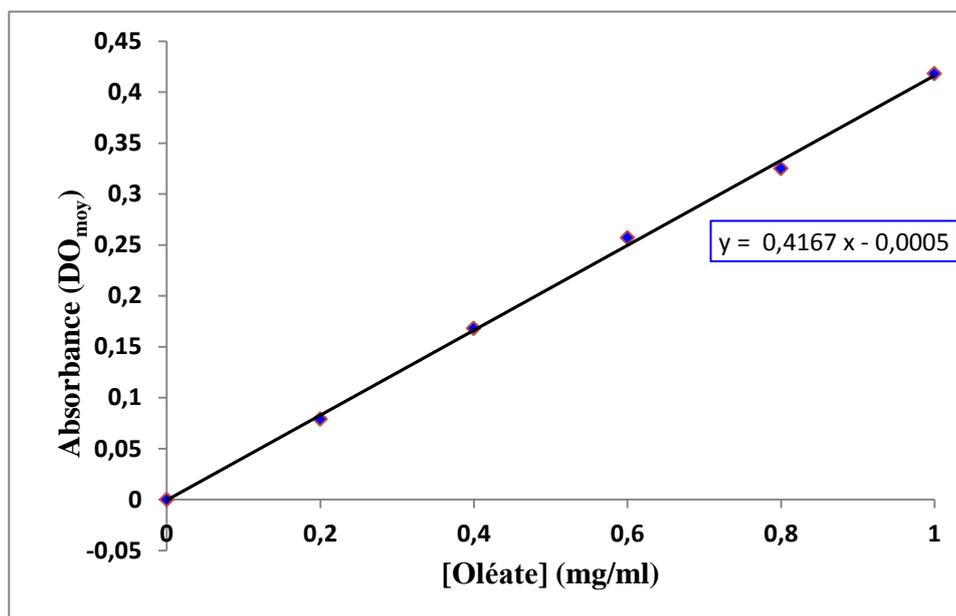


Figure III : Courbe d'étalonnage $DO_{moy} = f([Acide\ oléique])$ pour le dosage des lipides totaux dans les différents échantillons.

Tableau VIII : Protéines standards de différents poids moléculaires utilisées comme marqueurs de taille en électrophorèse SDS-PAGE.

Marqueurs de masses moléculaires (daltons)	
<i>Faibles</i> :	
- Lysozyme	14 400
- Anhydrase carbonic	29 000
- Ovalbumine	42 700
- Albumine sérique bovine	66 200
- Phosphorylase B	97 400
<i>Elevées</i> :	
- Ovalbumine	42 700
- Albumine sérique bovine	66 200
- Phosphorylase B	97 400
- β -galactosidase	116 250
- Myosine	205 000

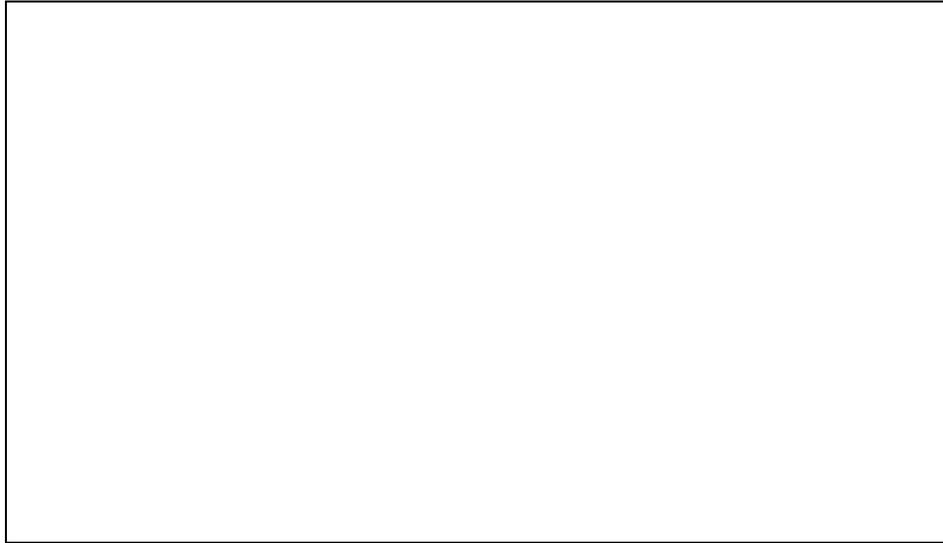


Photo I : Immunisation d'un lapin au niveau de la partie dorsale par l'extrait somatique brut de douves adultes de *F. hepatica*.

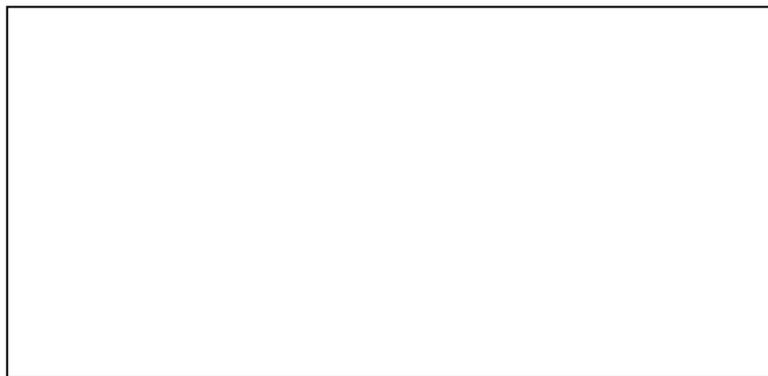


Photo II : Gamme d'étalonnage du BSA coloré au bleu de Coomassie pour le dosage des protéines totales dans les différents échantillons.

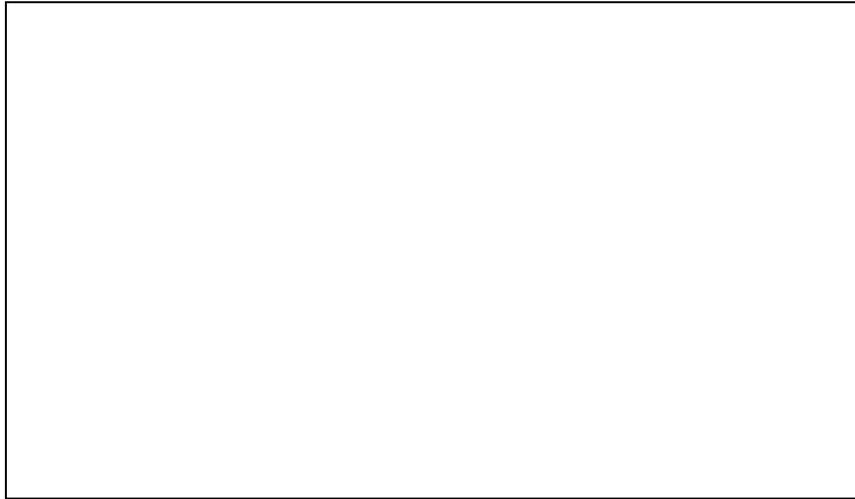


Photo III : Gamme d'étalonnage du D-glucose coloré au phénol- acide sulfurique pour le dosage des sucres totaux dans les différents échantillons.



Photo IV : Gamme d'étalonnage de l'acide oléique coloré au sulfo-phosphovanilline pour le dosage des lipides totaux dans les différents échantillons.

Tableau IX : Valeurs des vitesses initiales en fonction des concentrations croissantes du substrat fluorogène pour la détermination des constantes cinétiques K_M et V_{max} .

<i>SF (Z-Phe-Arg-AMC)</i>			
$[S] \times 10^{-3} \text{ M}$	$1/[S] \times 10^{+3} \text{ M}^{-1}$	$(V_i) \text{ mM. min}^{-1}$	$(1/V_i) \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}$
1	1	12,5	0,08
1,6	0,6	18,8	0,053
2,5	0,4	25	0,04
5	0,2	41,6	0,024
10	0,1	55,5	0,018
20	0,05	66,6	0,015

Tableau X : Valeurs des vitesses initiales en fonction des concentrations croissantes du substrat hémoglobine pour la détermination des constantes cinétiques K_M et V_{max} .

<i>(Hémoglobine)</i>			
$[S] \times 10^{-3} \text{ M}$	$1/[S] \times 10^{+3} \text{ M}^{-1}$	$(V_i) \text{ mM. min}^{-1}$	$(1/V_i) \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}$
20	0,05	0,025	40
25	0,04	0,029	34
33,3	0,03	0,035	29
50	0,02	0,047	21
100	0,01	0,062	16
200	0,005	0,083	12

Tableau XI : Valeurs des vitesses initiales en fonction des concentrations croissantes du substrat caséine pour la détermination des constantes cinétiques K_M et V_{max} .

<i>(Caséine)</i>			
$[S] \times 10^{-3} \text{ M}$	$1/[S] \times 10^{+3} \text{ M}^{-1}$	$(V_i) \text{ mM. min}^{-1}$	$(1/V_i) \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}$
12,5	0,08	0,01	92
16,6	0,06	0,014	71
20	0,05	0,016	60
25	0,04	0,019	51
50	0,02	0,03	33
100	0,01	0,04	24

Tableau XII : Valeurs des vitesses initiales en fonction des concentrations croissantes du substrat albumine pour la détermination des constantes cinétiques K_M et V_{max} .

<i>(Albumine)</i>			
$[S] \times 10^{-3} \text{ M}$	$1/[S] \times 10^{+3} \text{ M}^{-1}$	$(V_i) \text{ mM. min}^{-1}$	$(1/V_i) \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}$
50	0,02	0,011	90
66,6	0,015	0,013	75
100	0,01	0,017	56
200	0,005	0,025	40
400	0,0025	0,03	33
800	0,00125	0,033	30

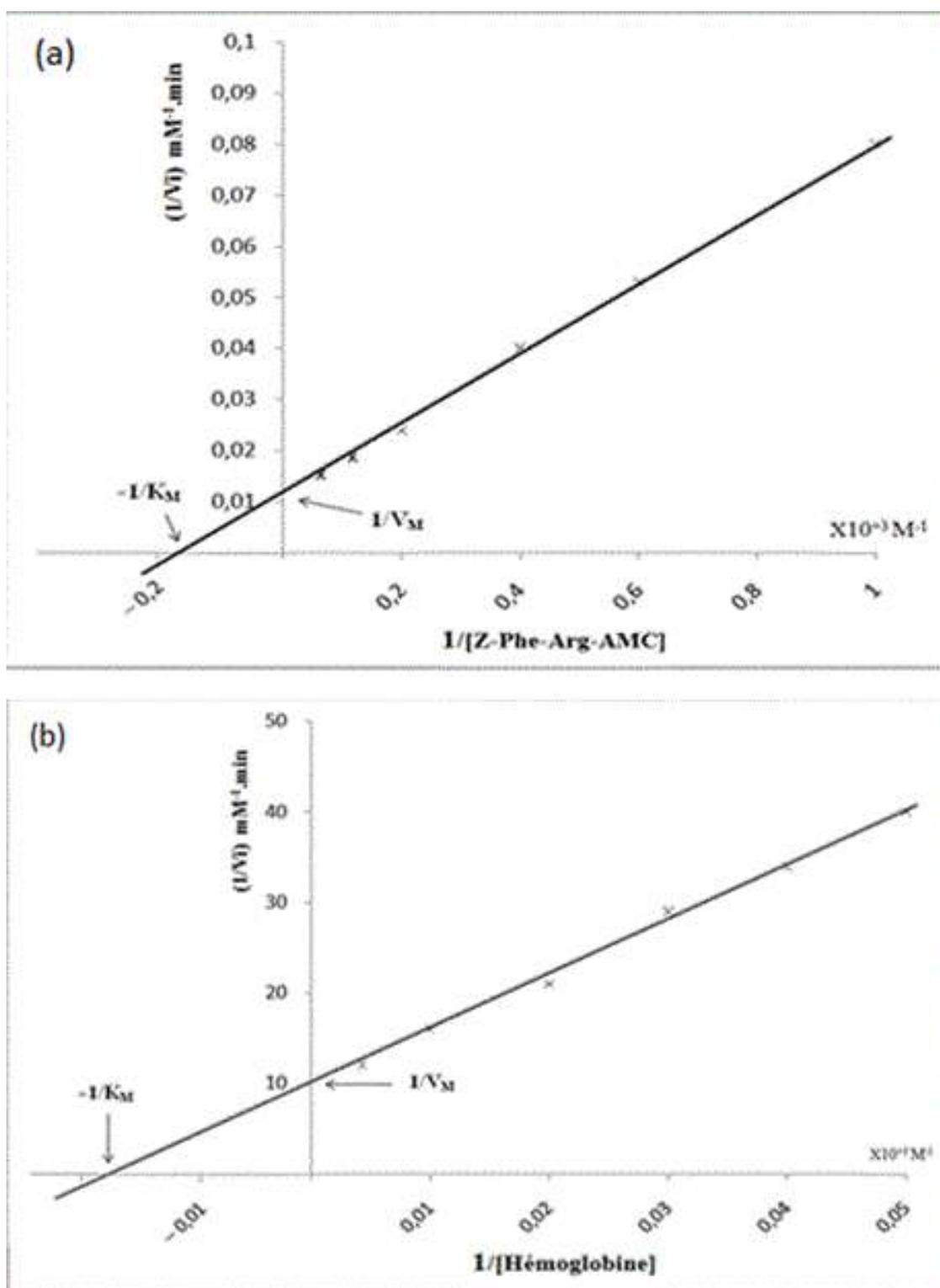


Figure IV : Représentation de Lineweaver-Burk ($1/v_i$) en fonction de $1/[\text{Z-Phe-Arg-AMC}]$ (a) et $1/[\text{Hémoglobine}]$ (b), indiquant les valeurs K_M et V_{\max} de la protéase purifiée pour ces deux substrats.

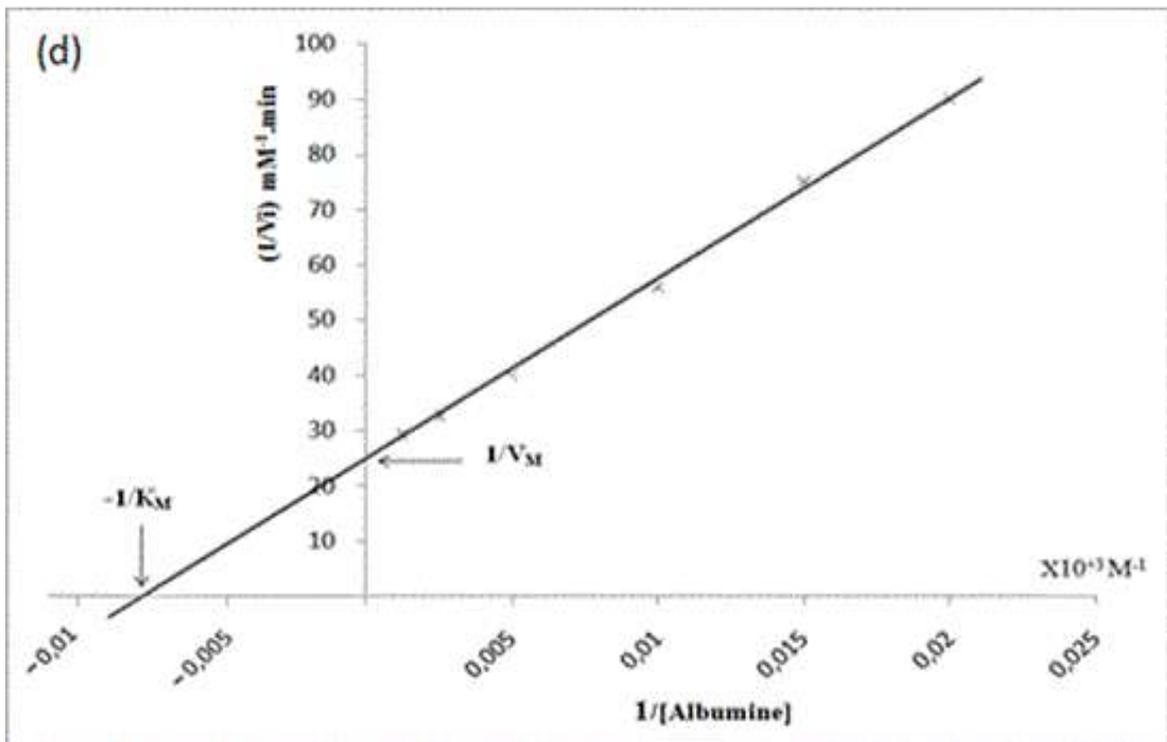
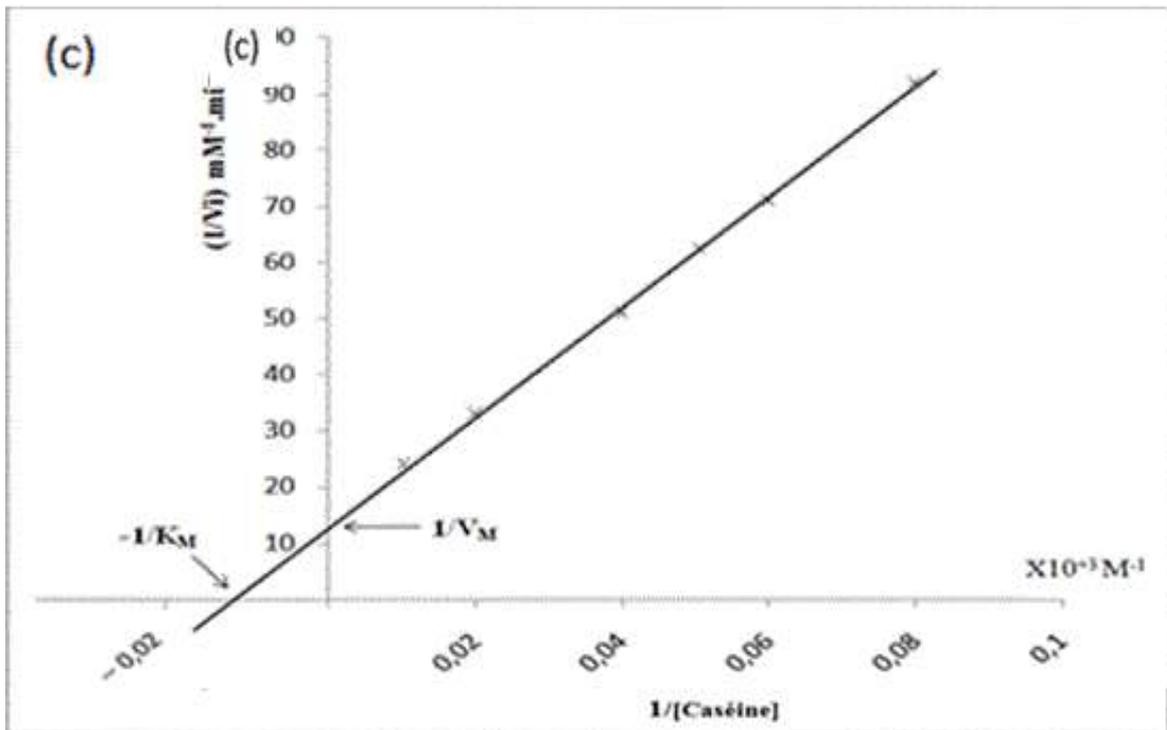


Figure V : Représentation de Lineweaver-Burk ($1/V_i$) en fonction de $1/[Caséine]$ (c) et $1/[Albumine]$ (d), indiquant les valeurs K_M et V_{max} de la protéase purifiée pour ces deux substrats.

ANNEXE II :

- **Tampon véronal, pH 8,2**

- Diéthylmalonylurée 15 g
- H₂O distillée 950 ml

Ajuster avec HCl, 1N jusqu'à pH 8,2, puis compléter avec H₂O distillée jusqu'à 1 litre.

- **Solution d'Amido Schwartz**

Solution 1 :

- Acétate de sodium 0,7 g
- H₂O distillée 45 ml

Solution 2 :

- Amido Schwarz (C₂₂H₂₄N₆Na₂O₉S₂) ... 0,1 g
- Acide acétique 45 ml

Mélanger les deux solutions, puis compléter avec H₂O distillée jusqu'à 1 litre. Filtrer la solution sur papier filtre.

- **Substrat chromogène ABTS**

- ✓ ***Solution mère d'ABTS :***

- ABTS 100 µg
- H₂O dist. 4,5 ml

- ✓ ***Tampon citrate :***

- Acide citrique 21 g
- NaOH 6,5 g
- H₂O₂ 1000 ml

Ajuster à pH 4 avec HCl.

- ✓ ***H₂O₂ modifiée :***

- H₂O₂ 110 volumes..... 25 µl
- Tampon citrate 725 µl

A conserver moins de 3 semaines à +4 °C.

Substrat pour une plaque d'Elisa :

- Solution mère d'ABTS 50 µl
- H₂O₂ modifiée 40 µl
- Tampon citrate 10 ml.

• **Tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M, pH 9,6**

Solution 1 :

- Carbonate de sodium (Na_2CO_3) 10,6 g
- H_2O distillée 1000 ml

Solution 2 :

- Bicarbonate de sodium (NaHCO_3) 8,04 g
- H_2O distillée 1000 ml

Mélanger 295 ml de solution 1 et 705 ml de solution 2, puis ajuster le pH à 9,6.

• **Tampon PBS-Tween 20 (PBSt) 0,15 M, pH 7,2**

- NaCl 8 g
- Na_2HPO_4 1,2 g
- KH_2PO_4 0,2 g
- KCl 0,2 g
- H_2O distillée 1000 ml

À 1 litre de PBS, ajouter :

- Tween 20 1 ml

• **Tampon sodium acétate, pH 5 :**

- Acide acétique 0,28 g
- Acétate de sodium 0,42 g
- H_2O distillée 100 ml

Ajuster le pH avec du NaOH jusqu'à pH 5.

• **Tampon sodium phosphate, pH 7,5 :**

- KH_2PO_4 0,224 g
- NaH_2PO_4 0,258 g
- H_2O 100 ml

Ajuster le pH avec du NaOH jusqu'à pH 7,5.

• **Tampon Tris-HCl 0,5M, pH 9) :**

- Tris 6,05 g
- H_2O 100 ml

Ajuster le pH avec du HCl jusqu'à pH 9.

• **Milieu de culture RPMI 1640 :**

Le milieu RPMI 1640 (GIBCO, Gent) contenant 300 mg/ml de L-glutamine est additionné de 1mM de pyruvate de sodium, 1% d'acides aminés non-essentiels, 30 U/ml de pénicilline, 30 µg/ml de streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal.

• **Solutions d'électrophorèse :**

✓ **Solution A** : Acrylamide/N.N'-méthylène-bis-acrylamide

- Acrylamide 30 g
- Bis-acrylamide 0,8 g
- H₂O bidistillée, autoclavée jusqu'à 100 ml

✓ **Solution B** : Tampon pour le gel de concentration (Tris-Hcl 1 M, pH 6,8)

- Tris-base 1,2 g
- H₂O bidistillée 15 ml
- Hcl concentré Qsp pH 6,8

À compléter avec H₂O bidist. Jusqu'à 20 ml.

✓ **Solution C** : Tampon pour le gel de séparation (Tris-Hcl 1,5 M, pH 8,8)

- Tris-base 7,3 g
- H₂O bidistillée 15 ml
- Hcl concentré Qsp pH 8,8

À compléter avec H₂O bidist. Jusqu'à 20 ml.

✓ **Solution D** : Tampon de migration (Tris 0,025 M, pH 8,8 + Glycine 0,192 M + SDS 0,1%)

- Tris-base 3 g
- Glycine 14,4 g
- SDS..... 1 g

À compléter avec H₂O bidist. Jusqu'à 1000 ml.

✓ **Solution E** : SDS 10%

- SDS..... 10 g

Compléter avec H₂O bidist. Jusqu'à 100 ml.

✓ **Solution F** : Persulfate d'ammonium 1,5%

- Persulfate d'ammonium 1,5 g

Compléter avec H₂O bidist. Jusqu'à 100 ml.

La solution de Persulfate d'ammonium est à utiliser à l'état frais afin d'assurer une polymérisation homogène du gel.

✓ **Solution G** : Bleu de bromophénol 0,1%

- Bleu de bromophénol0,1 g

Compléter avec H₂O bidistillée. Jusqu'à 100 ml.

ANNEXE III

Tableau A : Récapitulatif des différentes étapes nécessaires pour la réalisation pratique du test Elisa.

Étapes	Tampons/solutions	Volume (µl/puits)	Temps	T°
1- Sensibilisation des plaques par l'antigène (2,5µg/ml)	Carbonate-bicarbonate (0,1 M, pH 9,6)	100	- 1 heure - 1 nuit	37 °C +4 °C
Lavage	PBS + Tween 0,1% (PBSt)	–	3 x 5 min	ambiante
2- saturation des plaques	PBSt (0,15 M, pH 7,2) + gélatine à 0,5%	100	30 min	37 °C
3- Réaction avec les anticorps du sérum	PBSt (0,15 M, pH 7,2)	100	1 heure	37 °C
Lavage	PBSt	–	3 x 5 min	ambiante
4- Addition du conjugué anti-IgG marqué à la peroxydase	PBSt	100	30 min	37 °C
Lavage	PBSt	–	3 x 5 min	ambiante
5- Réaction enzymatique avec le substrat H ₂ O ₂ , en présence du chromogène ABTS	Citrate (0,1 M, pH 5,5)	100	30 min	ambiante, à l'obscurité
6- Arrêt de la réaction	Acide sulfurique, 2N	50	5 min	ambiante
7- Lecture des D.O à 405 nm	–	–	–	–

Tableau C : Résultats des lectures densitométriques (D.O) fournis par l'automate, obtenus suite à l'examen des 80 sérums de bovins par ELISA utilisant l'antigène excrété-sécrété (ELISA_(PES)).

Automated Plate Reader

Assay:1254Y 01

Date:07/27/12

Wavelength:405

Time:10:37:50AM

Temp:

COMMENTS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CALL	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CalcOD3	0.069	0.647	0.305	0.221	0.385	0.198	0.218	0.204	0.265	0.388	0.328	0.182
Well	SMP1	SMP9	SMP17	SMP25	SMP33	SMP41	SMP49	SMP57	SMP65	SMP73	SMP81	SMP89
RSLT	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CALL	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CalcOD3	0.076	0.648	0.308	0.220	0.359	0.200	0.256	0.216	0.299	0.428	0.262	0.193
Well	SMP2	SMP10	SMP18	SMP26	SMP34	SMP42	SMP50	SMP58	SMP66	SMP74	SMP82	SMP90
RSLT	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CALL	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CalcOD3	0.083	0.636	0.294	0.211	0.274	0.218	0.566	0.213	0.245	0.182	0.243	0.225
Well	SMP3	SMP11	SMP19	SMP27	SMP35	SMP43	SMP51	SMP59	SMP67	SMP75	SMP83	SMP91
RSLT	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CALL	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CalcOD3	0.061	0.586	0.270	0.185	0.263	0.216	0.576	0.251	0.215	0.204	0.228	0.134
Well	SMP4	SMP12	SMP20	SMP28	SMP36	SMP44	SMP52	SMP60	SMP68	SMP76	SMP84	SMP92
RSLT	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CALL	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CalcOD3	0.064	0.142	0.287	0.344	0.408	0.193	0.225	0.241	0.298	0.457	0.567	0.181
Well	SMP5	SMP13	SMP21	SMP29	SMP37	SMP45	SMP53	SMP61	SMP69	SMP77	SMP85	SMP93
RSLT	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CALL	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CalcOD3	0.065	0.149	0.302	0.325	0.403	0.211	0.184	0.342	0.285	0.508	0.428	0.281
Well	SMP6	SMP14	SMP22	SMP30	SMP38	SMP46	SMP54	SMP62	SMP70	SMP78	SMP86	SMP94
RSLT	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CALL	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CalcOD3	0.067	0.139	0.153	0.115	0.395	0.170	0.248	0.458	0.227	0.151	0.157	0.238
Well	SMP7	SMP15	SMP23	SMP31	SMP39	SMP47	SMP55	SMP63	SMP71	SMP79	SMP87	SMP95
RSLT	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CALL	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CalcOD3	0.065	0.142	0.166	0.178	0.379	0.175	0.323	0.498	0.201	0.131	0.145	0.214
Well	SMP8	SMP16	SMP24	SMP32	SMP40	SMP48	SMP56	SMP64	SMP72	SMP80	SMP88	SMP96
RSLT	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

- Colonne 1 : Les blancs
- Colonne 2 : 4 sérums témoins positifs + 4 sérums témoins négatifs
- Colonnes 3 à 12 : Échantillons ou sérums tests, au nombre de 40

- Chaque échantillon (SMP) est exprimé par deux lectures de DO (par ex., le 1^{er} échantillon testé correspond aux valeurs portant les n° SMP17 et SMP18).

Tableau D : Résultats des analyses sérologiques effectuées sur les 80 sérums bovins par le test ELISA_(F,P) et les résultats du diagnostic biologique établi pour chaque animal testé.

Ordre	N° d'échant. "sample"	Sérologie par ELISA _(F,P)				Diagnostic biologique		
		DO ₁	DO ₂	DO _{Moy.}	% Ac	Sérologie	Auto- psie	Statut
1	SMP [†] 17,18	0,299	0,317	0,308	32,7	+	+	VP
2	SMP [†] 19,20	0,293	0,319	0,306	32,3	+	+	VP
3	SMP [†] 21,22	0,3	0,329	0,3145	33,9	+	+	VP
4	SMP [†] 23,24	0,151	0,153	0,152	0,8	-	-	VN
5	SMP [†] 25,26	0,256	0,284	0,27	24,9	±	+	-
6	SMP [†] 27,28	0,235	0,232	0,2335	17,3	-	-	VN
7	SMP [†] 29,30	0,394	0,332	0,363	43,9	+	+	VP
8	SMP [†] 31,32	0,111	0,157	0,134	0,1	-	-	VN
9	SMP [†] 33,34	0,376	0,430	0,403	52,1	+	+	VP
10	SMP [†] 35,36	0,289	0,300	0,2945	29,8	-	+	FN
11	SMP [†] 37,38	0,404	0,422	0,413	55,2	+	+	VP
12	SMP [†] 39,40	0,501	0,386	0,4435	60,3	+	+	VP
13	SMP [†] 41,42	0,195	0,178	0,1865	7,7	-	-	VN
14	SMP [†] 43,44	0,194	0,210	0,202	11	-	-	VN
15	SMP [†] 45,46	0,217	0,180	0,1985	10,2	-	-	VN
16	SMP [†] 47,48	0,149	0,168	0,1585	2,1	-	-	VN
17	SMP [†] 49,50	0,280	0,241	0,2605	22,9	±	-	-
18	SMP [†] 51,52	0,544	0,616	0,58	88,3	+	+	VP
19	SMP [†] 53,54	0,188	0,257	0,2225	54,6	+	+	VP
20	SMP [†] 55,56	0,398	0,315	0,3565	42,5	+	+	VP
21	SMP [†] 57,58	0,196	0,211	0,2035	11,1	-	-	VN
22	SMP [†] 59,60	0,228	0,221	0,2245	15,3	-	-	VN
23	SMP [†] 61,62	0,596	0,372	0,484	68,5	+	+	VP
24	SMP [†] 63,64	0,451	0,477	0,464	64,6	+	+	VP
25	SMP [†] 65,66	0,255	0,306	0,2805	26,9	±	+	-
26	SMP [†] 67,68	0,229	0,188	0,2085	12,3	-	-	VN
27	SMP [†] 69,70	0,336	0,257	0,2965	30,2	+	-	FP
28	SMP [†] 71,72	0,223	0,196	0,2095	12,5	-	-	VN
29	SMP [†] 73,74	0,376	0,417	0,3965	50,7	+	+	VP
30	SMP [†] 75,76	0,177	0,199	0,188	8,2	-	-	VN
31	SMP [†] 77,78	0,443	0,500	0,4715	66	+	+	VP
32	SMP [†] 79,80	0,148	0,151	0,1495	0,2	-	-	VN
33	SMP [†] 81,82	0,340	0,257	0,2985	30,7	+	-	FP
34	SMP [†] 83,84	0,239	0,258	0,2485	13,9	-	-	VN
35	SMP [†] 85,86	0,553	0,421	0,487	63,3	+	+	VP
36	SMP [†] 87,88	0,148	0,153	0,1505	0,4	-	-	VN
37	SMP [†] 89,90	0,205	0,191	0,198	10,2	-	-	VN
38	SMP [†] 91,92	0,217	0,132	0,1745	5,3	-	-	VN
39	SMP [†] 93,94	0,288	0,271	0,2795	26,7	±	+	-
40	SMP [†] 95,96	0,385	0,321	0,353	41,8	+	+	VP

La suite du Tableau D :

41	SMP ^{††} 17,18	0,300	0,264	0,282	27,3	±	+	-
42	SMP ^{††} 19,20	0,144	0,155	0,1495	0,2	-	-	VN
43	SMP ^{††} 21,22	0,495	0,420	0,4575	63,1	+	+	VP
44	SMP ^{††} 23,24	0,386	0,410	0,398	51,0	+	+	VP
45	SMP ^{††} 25,26	0,215	0,183	0,199	10,4	-	-	VN
46	SMP ^{††} 27,28	0,275	0,276	0,2755	25,9	±	+	-
47	SMP ^{††} 29,30	0,451	0,414	0,4325	57,9	+	+	VP
48	SMP ^{††} 31,32	0,111	0,143	0,127	0,1	-	-	VN
49	SMP ^{††} 33,34	0,161	0,134	0,1475	0,1	-	-	VN
50	SMP ^{††} 35,36	0,147	0,190	0,1685	4,18	-	-	VN
51	SMP ^{††} 37,38	0,196	0,239	0,2175	14,1	-	-	VN
52	SMP ^{††} 39,40	0,196	0,203	0,1995	10,4	-	-	VN
53	SMP ^{††} 41,42	0,226	0,267	0,2465	20	-	+	FN
54	SMP ^{††} 43,44	0,168	0,170	0,169	4,3	-	-	VN
55	SMP ^{††} 45,46	0,169	0,160	0,1645	3,3	-	-	VN
56	SMP ^{††} 47,48	0,156	0,169	0,1625	2,9	-	-	VN
57	SMP ^{††} 49,50	0,263	0,258	0,2605	22,8	±	-	-
58	SMP ^{††} 51,52	0,227	0,208	0,2175	14,2	-	-	VN
59	SMP ^{††} 53,54	0,231	0,248	0,2395	18,6	-	-	VN
60	SMP ^{††} 55,56	0,139	0,154	0,1465	0,1	-	-	VN
61	SMP ^{††} 57,58	0,197	0,212	0,2045	11,4	-	-	VN
62	SMP ^{††} 59,60	0,487	0,515	0,501	72,0	+	+	VP
63	SMP ^{††} 61,62	0,159	0,143	0,151	0,6	-	-	VN
64	SMP ^{††} 63,64	0,168	0,137	0,1525	0,8	-	-	VN
65	SMP ^{††} 65,66	0,257	0,307	0,282	27,3	±	+	-
66	SMP ^{††} 67,68	0,262	0,191	0,2265	15,9	-	-	VN
67	SMP ^{††} 69,70	0,428	0,367	0,3975	50,8	+	+	VP
68	SMP ^{††} 71,72	0,224	0,196	0,210	12,6	-	-	VN
69	SMP ^{††} 73,74	0,377	0,219	0,298	30,6	+	-	FP
70	SMP ^{††} 75,76	0,219	0,280	0,2495	20,6	-	-	VN
71	SMP ^{††} 77,78	0,162	0,139	0,1505	0,40	-	-	VN
72	SMP ^{††} 79,80	0,565	0,335	0,45	61,6	+	+	VP
73	SMP ^{††} 81,82	0,242	0,212	0,227	16,1	-	-	VN
74	SMP ^{††} 83,84	0,239	0,257	0,248	20,4	-	-	VN
75	SMP ^{††} 85,86	0,557	0,420	0,4885	69,3	+	+	VP
76	SMP ^{††} 87,88	0,404	0,338	0,371	45,5	+	+	VP
77	SMP ^{††} 89,90	0,337	0,191	0,264	23,7	±	+	-
78	SMP ^{††} 91,92	0,217	0,132	0,1745	5,3	-	-	VN
79	SMP ^{††} 93,94	0,232	0,272	0,252	21,2	-	-	VN
80	SMP ^{††} 95,96	0,261	0,227	0,244	19,6	-	-	VN

- SMP[†]: Sérum testé en double essais dont chacun est affecté d'un n° dans le **Tableau D** de ci-dessus.

- SMP^{††}: Sérum testé en double essais dont chacun est affecté d'un n° dans la suite du **Tableau D** ci-dessus.

Tableau E : Résultats des analyses sérologiques effectuées sur les 80 sérums bovins par le test ELISA_(PES) et les résultats du diagnostic biologique établi pour chaque animal testé.

Ordre	N° d'échant. "sample"	Sérologie par ELISA _(PES)				Statut de l'animal		
		DO ₁	DO ₂	DO _{Moy.}	% Ac	Sérologie	Auto- psie	Statut
1	SMP* 17,18	0,305	0,308	0,3065	33,7	+	+	VP
2	SMP* 19,20	0,294	0,270	0,282	28,6	±	+	-
3	SMP* 21,22	0,287	0,302	0,2945	31,2	+	+	VP
4	SMP* 23,24	0,153	0,166	0,1595	3,4	-	-	VN
5	SMP* 25,26	0,221	0,220	0,2205	16,0	-	+	FN
6	SMP* 27,28	0,211	0,185	0,198	11,3	-	-	VN
7	SMP* 29,30	0,344	0,325	0,3345	39,4	+	+	VP
8	SMP* 31,32	0,115	0,178	0,1465	0,70	-	-	VN
9	SMP* 33,34	0,385	0,359	0,372	47,2	+	+	VP
10	SMP* 35,36	0,274	0,263	0,2685	25,8	±	+	-
11	SMP* 37,38	0,408	0,403	0,4055	54,1	+	+	VP
12	SMP* 39,40	0,395	0,379	0,387	50,3	+	+	VP
13	SMP* 41,42	0,198	0,200	0,199	11,5	-	-	VN
14	SMP* 43,44	0,218	0,216	0,217	15,2	-	-	VN
15	SMP* 45,46	0,193	0,211	0,202	12,1	-	-	VN
16	SMP* 47,48	0,170	0,175	0,1725	6,0	-	-	VN
17	SMP* 49,50	0,218	0,256	0,237	19,4	-	-	VN
18	SMP* 51,52	0,566	0,576	0,571	88,2	+	+	VP
19	SMP* 53,54	0,225	0,184	0,2045	12,7	-	+	FN
20	SMP* 55,56	0,248	0,323	0,2855	29,4	±	+	-
21	SMP* 57,58	0,204	0,216	0,21	13,8	-	-	VN
22	SMP* 59,60	0,213	0,251	0,232	18,3	-	-	VN
23	SMP* 61,62	0,241	0,324	0,2825	28,7	±	+	-
24	SMP* 63,64	0,458	0,498	0,478	69,1	+	+	VP
25	SMP* 65,66	0,265	0,299	0,282	28,6	±	+	-
26	SMP* 67,68	0,245	0,215	0,23	17,9	-	-	VN
27	SMP* 69,70	0,298	0,285	0,2915	30,6	+	-	FP
28	SMP* 71,72	0,227	0,201	0,214	14,6	-	-	VN
29	SMP* 73,74	0,388	0,428	0,408	54,6	+	+	VP
30	SMP* 75,76	0,182	0,204	0,193	10,3	-	-	VN
31	SMP* 77,78	0,457	0,508	0,4825	70,0	+	+	VP
32	SMP* 79,80	0,151	0,131	0,141	0,1	-	-	VN
33	SMP* 81,82	0,328	0,262	0,295	31,3	+	-	FP
34	SMP* 83,84	0,243	0,228	0,2355	19,1	-	-	VN
35	SMP* 85,86	0,567	0,428	0,4975	72,9	+	+	VP
36	SMP* 87,88	0,157	0,145	0,151	1,6	-	-	VN
37	SMP* 89,90	0,182	0,193	0,1875	9,2	-	-	VN
38	SMP* 91,92	0,225	0,134	0,1795	7,4	-	-	VN
39	SMP* 93,94	0,181	0,281	0,231	18,1	-	+	FN
40	SMP* 95,96	0,238	0,214	0,226	17,1	-	+	FN

La suite du Tableau E

41	SMP** 17,18	0,274	0,274	0,274	27,2	±	+	-
42	SMP** 19,20	0,190	0,193	0,1915	9,9	-	-	VN
43	SMP** 21,22	0,561	0,581	0,571	88,4	+	+	VP
44	SMP** 23,24	0,338	0,338	0,338	40,3	+	+	VP
45	SMP** 25,26	0,203	0,196	0,1995	11,5	-	-	VN
46	SMP** 27,28	0,230	0,223	0,2265	17,1	-	+	FN
47	SMP** 29,30	0,539	0,531	0,535	81	+	+	VP
48	SMP** 31,32	0,110	0,183	0,1465	0,7	-	-	VN
49	SMP** 33,34	0,144	0,151	0,1475	0,8	-	-	VN
50	SMP** 35,36	0,185	0,202	0,1935	10,4	-	-	VN
51	SMP** 37,38	0,247	0,205	0,226	17,1	-	-	VN
52	SMP** 39,40	0,207	0,189	0,198	11,3	-	-	VN
53	SMP** 41,42	0,247	0,324	0,2855	29,3	±	+	-
54	SMP** 43,44	0,196	0,179	0,1875	9,1	-	-	VN
55	SMP** 45,46	0,160	0,174	0,167	4,9	-	-	VN
56	SMP** 47,48	0,154	0,158	0,156	2,6	-	-	VN
57	SMP** 49,50	0,242	0,248	0,245	21,1	-	-	VN
58	SMP** 51,52	0,230	0,243	0,2365	19,2	-	-	VN
59	SMP** 53,54	0,251	0,192	0,2215	16,1	-	-	VN
60	SMP** 55,56	0,158	0,156	0,157	2,9	-	-	VN
61	SMP** 57,58	0,183	0,205	0,194	10,5	-	-	VN
62	SMP** 59,60	0,565	0,450	0,5075	75,2	+	+	VP
63	SMP** 61,62	0,169	0,154	0,1615	3,7	-	-	VN
64	SMP** 63,64	0,165	0,152	0,1585	3,1	-	-	VN
65	SMP** 65,66	0,234	0,277	0,2555	23,3	±	+	-
66	SMP** 67,68	0,209	0,213	0,211	14	-	-	VN
67	SMP** 69,70	0,321	0,379	0,35	42,7	+	+	VP
68	SMP** 71,72	0,200	0,179	0,1895	9,5	-	-	VN
69	SMP** 73,74	0,341	0,228	0,2845	29,1	±	-	-
70	SMP** 75,76	0,281	0,206	0,2435	20,6	-	-	VN
71	SMP** 77,78	0,149	0,154	0,1515	1,6	-	-	VN
72	SMP** 79,80	0,550	0,321	0,4355	60,3	+	+	VP
73	SMP** 81,82	0,226	0,238	0,232	18,3	-	-	VN
74	SMP** 83,84	0,225	0,244	0,2345	18,8	-	-	VN
75	SMP** 85,86	0,170	0,190	0,18	7,6	-	+	FN
76	SMP** 87,88	0,366	0,303	0,3345	39,4	+	+	VP
77	SMP** 89,90	0,204	0,176	0,19	9,7	-	+	FN
78	SMP** 91,92	0,199	0,125	0,162	3,9	-	-	VN
79	SMP** 93,94	0,263	0,247	0,255	23,1	±	-	-
80	SMP** 95,96	0,268	0,202	0,235	19	-	-	VN

- **SMP***: Sérum testé en double essais dont chacun est affecté d'un n° dans le **Tableau E** de ci-dessus.

- **SMP****: Sérum testé en double essais dont chacun est affecté d'un n° dans la suite du **Tableau E** ci-dessus.