

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université 8 mai 1945 Guelma.  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et  
de l'Univers.  
Département des S.N.V.



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Biologie  
Spécialité/Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire/ Immunologie Approfondie  
Thème

---

***Fasciola hepatica*: étude biochimique et immunologique.  
Recherche d'activités enzymatiques dans l'homogénat brut du  
parasite.**

---

Présenté par :

- HAMBLI Meryem
- ZIEITA Bisma

Devant le jury composé de :

- |  |                       |
|--|-----------------------|
| - Présidente : Mme BOUSSENANE Hanane (MAA) | Université de Guelma. |
| - Examinatrice : Mme KAIDI Souad (MAA)     | Université de Guelma. |
| - Encadreur : M. HEMICI Ahmed (MAA)        | Université de Guelma. |

Juin 2015.

# **Remerciements**

*Nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté de mener à terme ce présent travail.*

*On tient à remercier chaleureusement notre promoteur **HEMICI A**, pour nous avoir inspiré le sujet et guidé dans sa réalisation, pour ces précieux conseils et documents, qu'il trouve dans ce travail l'expression de notre profonde gratitude.*

*A notre jury :*

*La présidente. **BOUSSENANE H.**; maître assistante à l'université de Guelma pour avoir accepté de présider ce jury.*

*L'examinatrice. **KAIDI S.**; maître assistance à l'université de Guelma pour avoir voulu apprécier et corriger le mémoire.*

*Nous tenons également à remercier :*

*Mme. **BENATALLAH A.** ; l'inspectrice vétérinaire pour le soutien.*

*Mme. **ABDI S** et tous les employés de l'abattoir d'Annaba pour la collaboration.*

*Mmes. **Ghenya et Ratiba**, techniciennes du laboratoire du département de biologie, pour l'aide qu'elles n'ont apportons dans notre pratique.*

*Nos remercions tous ceux qui ont contribué à notre formation et la réalisation de ce travail.*

*Nos familles, qui durant nos études, nous ont toujours donné la possibilité de faire ce que nous voulions*

*et qui ont toujours cru en nous.*

**Besma et Meryem**

## *Dédicaces*

*Je remercie ALLAH qui m'a donné la patience, le courage, la volonté et la santé pour continuer ce travail.*

*Je dédie ce modeste travail à mes chers parents pour leur soutien, leur aide sans faille et leurs encouragements.*

*A mes frères **Abdelaziz, Hichem et Kamel***

*A ma sœur **Saliha***

*A mon beau frère et mes belles sœurs*

*A mes neveux **Mohammed, Abderrahmane, Abdallah***

*A ma nièce **Hanine***

*A mes cousins et cousines*

*Tous mes proches*

*Mes amies*

*Mes camarades de promotion*

*Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation  
de ce mémoire*

***Meryem***

## ***Dédicaces***

*Je remercie ALLAH qui m'a donné la patience, le courage,  
la volonté et la santé pour continuer ce travail.*

*Je dédie ce modeste travail à mes chers parents pour leur  
soutien, leur aide sans faille et leurs encouragements.*

*A mes frères **Walid, Ghoulem et Anwar.***

*A mes sœurs **Marwa et Ritedj.***

*A mon beau frère **Hassane***

*A mes cousins et cousines*

*Tous mes proches*

*Mes amies*

*Mes camarades de promotion*

*Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation*

*de ce mémoire*

***Besma***

# TABLE DES MATIERES

## LISTE DES FIGURES

## LISTE DES TABLEAUX

## ABREVIATIONS

## INTRODUCTION.....01

## CHAPITRE I: DESCRIPTION ET CONSEQUENCES DE LA FASCIOLOSE

<b>1.</b>	Le parasite .....	03
<b>1.1.</b>	Classification.....	03
<b>1.2.</b>	Morphologie.....	03
<b>1.3.</b>	Autres espèces.....	03
<b>2.</b>	Anatomie .....	06
<b>2.1.</b>	Tégument .....	06
<b>2.1.1.</b>	<i>Appareil digestif</i> .....	06
<b>2.1.2.</b>	<i>Appareil reproducteur</i> .....	06
<b>2.1.3.</b>	<i>Appareil excréteur</i> .....	07
<b>3.</b>	Le cycle biologique .....	09
<b>3.1.</b>	Développement de l'œuf de <i>F. hepatica</i> .....	09
<b>3.2.</b>	Évolution chez l'hôte intermédiaire .....	09
<b>3.3.</b>	Évolution dans le milieu extérieur .....	10
<b>3.4.</b>	Evolution chez l'hôte définitif .....	11
<b>4.</b>	Répartition géographique .....	13
<b>4.1.</b>	Dans le monde .....	13
<b>4.2.</b>	En Algérie .....	13
<b>5.</b>	Impact économique .....	15
<b>5.1.</b>	Production de la viande .....	15
<b>5.2.</b>	Production laitière .....	16
<b>5.3.</b>	Qualité de toison .....	16
<b>5.4.</b>	Reproduction et fertilité .....	16
<b>5.5.</b>	Mortalité .....	17
<b>5.6.</b>	Saisie des foies aux abattoirs .....	17
<b>6.</b>	Effet sur la santé publique .....	18

## CHAPITRE II : INTERACTION HOTE-PARASITE

1. Les antigènes de <i>Fasciola hepatica</i> .....	19
<b>1.1.</b> Les antigènes de surface .....	19
<b>1.2.</b> Les antigènes d'excrétion-sécrétion E/S .....	20
2. Communauté antigénique avec d'autres parasites .....	20
3. Rôle des antigènes d'E/S .....	22
4. Préparation des réactifs antigéniques .....	22
<b>4.1.</b> Antigène standard de <i>F. hepatica</i> .....	23
<b>4.2.</b> Antigène spécifique du genre .....	23
<b>4.2.1.</b> Méthode d'obtention .....	23
<b>4.2.2.</b> Caractéristique de l'antigène spécifique du genre .....	24
<b>4.2.3.</b> Intérêt de l'antigène spécifique du genre .....	26
5. Méthodes de mise en évidence des antigènes .....	26
<b>5.1.</b> Méthodes physico-chimique .....	26
<b>5.1.1.</b> Méthodes électrophorétiques .....	26
<b>5.1.2.</b> Méthodes chromatographiques .....	27
<b>5.2.</b> Méthodes immunologiques .....	28
<b>5.2.1.</b> L'immunoélectrophorèse .....	28
<b>5.2.2.</b> L'immunodiffusion .....	29
6. Immunologie de la fasciolose .....	31
<b>6.1.</b> Immunité à médiation humorale .....	31
<b>6.2.</b> Immunité à médiation cellulaire .....	32
<b>6.2.1.</b> Les éosinophiles .....	32
<b>6.2.2.</b> Les lymphocytes .....	32
<b>6.2.3.</b> Autres cellules immunitaires .....	33
<b>6.3.</b> Mécanismes effecteurs de l'immunité anti- <i>F. hepatica</i> .....	33
<b>6.3.1.</b> Destruction par les macrophages .....	34
<b>6.3.2.</b> Cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante .....	34
<b>6.4.</b> Mécanismes d'échappement du parasite du système immunitaire .....	35
<b>6.4.1.</b> Variation antigénique et renouvellement du glycocalyx.....	35
<b>6.4.2.</b> Clivages des immunoglobulines .....	36
<b>6.4.3.</b> Anticorps bloquants .....	36
<b>6.4.4.</b> Inhibition du complément .....	37
7. Diagnostic et prévention de la fasciolose .....	37

<b>7.1. Méthodes de diagnostic immunologique</b> .....	37
<b>7.1.1. - Réaction de fixation du complément (RFC)</b> .....	37
<b>7.1.2. Immunofluorescence indirecte (IFI)</b> .....	39
<b>7.1.3. Hémagglutination passive (HAP)</b> .....	39
<b>7.1.4. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</b> .....	39
<b>7.1.5. Electrosynérèse et immunoélectrophorèse</b> .....	40
<b>7.2. Prophylaxie médicale</b> .....	40
<b>7.2.1. Vaccination à l'aide d'extraits somatiques et des produits métaboliques</b> .....	41
<b>7.2.2. Métacercaires irradiées</b> .....	42
<b>7.2.3. La glutathione s-transférase (GST)</b> .....	42
<b>7.2.4. Fatty Acid Binding Protein (FABP)</b> .....	42
<b>7.2.5. La cathepsine L</b> .....	43

## **PARTIE PRATIQUE :**

### **MATERIELS ET METHODES**

<b>1. Préparation de l'extrait brut de <i>F. hepatica</i></b> .....	44
<b>1.1. Méthodes de préparation</b> .....	44
<b>1.1.1. Collecte des douves</b> .....	44
<b>1.1.2. Lavage</b> .....	44
<b>1.1.3. Obtention des produits de <i>F. hepatica</i></b> .....	46
<b>1.2. Précipitation des protéines</b> .....	47
<b>1.2.1. Précipitation des protéines par l'acétone pure</b> .....	47
<b>1.2.1.1. Principe</b> .....	47
<b>1.2.1.2. Méthode</b> .....	47
<b>1.2.2. précipitation des protéines au sulfate d'ammonium</b> .....	47
<b>1.2.2.1. Principe</b> .....	47
<b>1.2.2.2. Méthode</b> .....	48
<b>1.3. Dosage des constituants de l'extrait brut</b> .....	49
<b>1.3.1. Dosage de protéines totales</b> .....	49
<b>1.3.1.1. Principe</b> .....	49
<b>1.3.1.2. Réactifs</b> .....	49
<b>1.3.1.3. Procédure</b> .....	50
<b>1.3.2. Dosage des carbohydrates totaux</b> .....	50
<b>1.3.2.1. Principe</b> .....	51

1.3.2.2. Réactifs .....	51
1.3.2.3. Procédure .....	51
1.3.3. Dosage des lipides .....	52
1.3.3.1. Principe .....	52
1.3.3.2. Réactifs .....	52
1.3.3.3. Procédure.....	52
2. Recherche d'activité enzymatique dans l'extrait brutde <i>F. hepatica</i> .....	53
2.1. Effet caséinolytique.....	53
2.1.1. Réactifs utilisés .....	53
2.1.2. Procédure .....	53
2.2. Révélation d'activité enzymatique par électrophorèse SDS-PAGE.....	54
2.2.1. Principe .....	54
2.2.2. Méthodes .....	54
2.2.2.1. Préparation des réactifs .....	54
2.2.2.2. Préparation des gels.....	55
2.2.2.3. Préparation d'échantillon .....	55
2.2.3. Procédure .....	56
<b>PARTIE PRATIQUE :</b>	
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
1. Résultats issus du dosage colorimétrique .....	57
2. Recherche d'activité enzymatique dans l'extrait brutde <i>F. hepatica</i> .....	61
2.1. Effet caséinolytique .....	61
2.2. Révélation d'activités enzymatiquespar électrophorèse SDS-PAGE.....	62
<b>CONCLUSION</b> .....	64
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	66
<b>ANNEXE</b> .....	80
<b>RESUME</b>	



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> <i>Fasciola hepatica</i> adulte (4).....	5
<b>Figure 2:</b> <i>F. gigantica</i> adulte (à gauche) et <i>F. hepatica</i> adulte (à droite) (5).....	5
<b>Figure 3:</b> <i>Fascioloides magna</i> adulte (6).....	5
<b>Figure 4:</b> Structure du tégument de <i>F. hepatica</i> (Threalgold, 1963).....	8
<b>Figure 5:</b> Structure du système digestif de <i>F. hepatica</i> (Soulsby, 1982).....	8
<b>Figure 6:</b> Structure du système reproducteur de <i>F. hepatica</i> (Soulsby, 1982).....	8
<b>Figure 7:</b> Structure de l'appareil excréteur de <i>F. hepatica</i> (Beaumone et Cassier, 1981).....	8
<b>Figure 8:</b> Cycle de développement de <i>F. hepatica</i> (Euzeby, 1971) et (Soulsby, 1982).....	12
<b>Figure 9:</b> Distribution géographique de la fasciolose à <i>F. hepatica</i> (Torgerson et Claxton, 1999).....	14
<b>Figure 10:</b> Schéma de la purification de l'antigène spécifique de <i>F. hepatica</i> (D'après Tailliez et Korach, 1970a).....	25
<b>Figure 11:</b> Electrophorèse sur gélose de l'antigène standard de <i>F. hepatica</i> (D'après Biguet et al., 1962) .....	27
<b>Figure 12:</b> Principe d'immunoélectrophorèse (D'après Bene et al., 1998).....	30
<b>Figure 13:</b> Séparation des antigènes de <i>F. hepatica</i> en plusieurs arcs par immunoélectrophorèse (D'après Biguet et al., 1962).....	30
<b>Figure 14:</b> Mécanismes d'échappement de <i>F. hepatica</i> (D'après Tliba, 2001).....	36
<b>Figure 15:</b> Principe de la réaction de fixation du complément (D'après Bene et Faure, 1998) .....	38
<b>Figure 16:</b> principe d'hemagglutination indirecte (d'après Bene et Faure, 1998).....	39
<b>Figure 17:</b> Principe général de l'ELISA indirecte (9).....	40
<b>Figure 18:</b> Protocole d'obtention des produits somatiques brut de <i>F.hepatica</i> .....	46
<b>Figure 19:</b> Profils d'électrophorèse SDS-PAGE : réalisée sur les différentes échantillon, à des concentrations indiquées.....	63

<b>Figure 20:</b> Révélation d'activité protéolytique de l'extrait brut sur deux substrats analysées de <i>F. hepatica</i> par SDS-PAGE, à concentration fixe (20µl) .....	63
<b>Figure a:</b> Courbe d'étalonnage obtenu par dosage de plusieurs dilution de protéines standards.....	85
<b>Figure b:</b> Courbe d'étalonnage obtenu par dosage d'un sucre étalon (D-glucose) à différentes concentrations.....	85
<b>Figure c:</b> Courbe d'étalonnage obtenu par dosage d'un Acide gras étalon (Ac.oléique) à différentes concentrations.....	86

## LISTE DES TABLEAUX

<b><u>Tableau 1</u></b> : Fractions antigéniques communes de divers Helminthes avec <i>F. hepatica</i> . (D'après Biguet et <i>al.</i> , 1962).....	21
<b><u>Tableau 2</u></b> : Récapitulation des principales tentatives des vaccinations réalisées ave différentes préparations antigéniques (D'après Thoury, 1991).....	41
<b><u>Tableau 3</u></b> : La vaccination par les différentes isoformes de FABP (D'après Tliba, 2001).....	43
<b><u>Tableau 4</u></b> : Valeurs de densités optiques (DO) obtenus par dosages colorimétriques des différents échantillons.....	59
<b><u>Tableau 5</u></b> : Résultats issus du dosage colorimétrique des principaux composants des différents échantillons testés (l'extrait brut et ses deux formes de précipités).....	59
<b><u>Tableau a</u></b> : Valeur des densités optique (DO) issues du dosage colorimétrique des dilution BSA par la méthode de biuret.....	83
<b><u>Tableau b</u></b> : Valeur des densités optique (DO) issues du dosage colorimétrique des carbohydrates totaux.....	83
<b><u>Tableau c</u></b> : valeur des densités optique (DO) issues du dosage colorimétrique des lipides totaux.....	84

## ABBREVIATIONS

<b>Ac :</b>	Anticorps.
<b>ADCC:</b>	Cytotoxicité Cellulaire Dépendante d'Anticorps.
<b>Ag :</b>	Antigène.
<b>BSA:</b>	Bovine serum albumine.
<b>CFA :</b>	Complete Freund Adjuvant.
<b>ConA :</b>	Concanavaline A.
<b>DEAE :</b>	Diethylaminoethyl.
<b>DO :</b>	Densité Optique.
<b>ECF-A :</b>	Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis.
<b>ECP :</b>	Eosinophil cationic protein.
<b>ELISA :</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
<b>ENV :</b>	Ecole Nationale Vétérinaire.
<b>EPO :</b>	Eosinophil peroxydase.
<b>ES :</b>	Antigène excrétoire-sécrétoire.
<b>ESP :</b>	eosinophil stimulation promoter.
<b>F :</b>	Fraction.
<b>FABP:</b>	Fatty Acid Binding Protein.
<b>Fh:</b>	<i>Fasciola hepatica</i> .
<b>FhTA :</b>	<i>Fasciola hepatica</i> total Antigen.
<b>Fig :</b>	Figure.
<b>FII (a) :</b>	Sous fraction (a) de la fraction n°2 purifiée.
<b>FII (b) :</b>	Sous fraction (b) de la fraction n°2 purifiée.
<b>FII (c1) :</b>	Sous fraction (c1) de la fraction n°2 purifiée.
<b>FII (c2) :</b>	Sous fraction (c2) de la fraction n°2 purifiée.
<b>FII p :</b>	la fraction n°2 purifiée.
<b>FII t :</b>	la fraction n°2 totale.
<b>GST:</b>	Glutathion S-transférase.
<b>HAP :</b>	Hémagglutination passive.
<b>HI :</b>	Hemagglutination indirecte.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	peroxyde d'hydrogène.
<b>HPLC:</b>	High pressure liquid chromatography.
<b>IEP :</b>	Immunoélectrophorèse.

<b>IF :</b>	Immunofluorescence.
<b>IFI :</b>	Immunofluorescence indirecte.
<b>Ig :</b>	Immunoglobuline.
<b>INF<math>\gamma</math> :</b>	Interferon gamma.
<b>INRA :</b>	Institut National de Recherche Agronomique.
<b>IM :</b>	Intra-musculaire.
<b>IP :</b>	Intra-péritonéale.
<b>IRM :</b>	Image de Résonance Magnétique.
<b>ITEB :</b>	Intelligence Technique et Energétique du Bâtiment.
<b>JAI :</b>	Jour Après Infestation.
<b>kDa :</b>	Kilodalton.
<b>MAF :</b>	Macrophage-activating factor.
<b>MBP :</b>	Major Basic Protein.
<b>MIF :</b>	Macrophage migration inhibitory factor.
<b>nm :</b>	Nanomètre.
<b>NO :</b>	Monoxyde d'azote.
<b>O<math>_2^-</math> :</b>	Ion superoxyde.
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé.
<b>PBL :</b>	Peripheral Blood Lymphocyte.
<b>PBS :</b>	Phosphate buffer saline.
<b>PES :</b>	Produits d'excrétion-sécrétion.
<b>PESFh :</b>	Produits d'excrétion-sécrétion de <i>Fasciola hepatica</i> .
<b>PM :</b>	Poids moléculaire
<b>PMSF :</b>	Phénylmethylsulfonyl fluoride.
<b>RFC :</b>	Réaction de fixation du complément.
<b>ROI</b>	Radicaux libres oxygénés ou nitrogénés.
<b>SAI :</b>	Semaine après infestation.
<b>SC :</b>	Sous-cutané.
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodécyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
<b>SOD :</b>	Superoxyde dismutase.
<b>t/min :</b>	Tours /minute.

## INTRODUCTION

La fasciolose ou Distomatose hépatobiliaire est une affection parasitaire due à l'invasion du foie et des canaux biliaires par une espèce de trématode digène, *Fasciola hepatica* appelé communément grande douve du foie. Ce parasite se caractérise par un cycle parasitaire complexe faisant intervenir des hôtes définitifs, habituellement des ruminants et un mollusque gastéropode d'eau douce, *Lymnaea truncatula* comme hôte intermédiaire (Rondelaud 1983; Knubben-Schweizer et Torgerson 2015).

L'aire de répartition mondiale de *F. hepatica* est vaste et correspond presque à toutes les régions où le climat permet le développement exogène du parasite dans son hôte secondaire (la limnée tronquée) (Euzéby, 1971), tant dans les pays tempérés que dans les pays tropicaux, y compris en Algérie où elle se rencontre presque sur la plus grande partie du littoral, en particulier dans les zones humides, au Nord-est du pays (Mekroud et *al.* 2004).

Cette parasitose est une zoonose majeure qui affecte aussi bien l'Homme que les ruminants domestiques, et provoque une baisse dans la production ovine et bovine, occasionnant de grandes pertes économiques dues à une mortalité importante chez les ovins et plus généralement des baisses de performances zootechniques (quantité et qualité du lait, croissance, fertilité, etc.) (Tliba, 2001). Celles-ci sont estimées à 2 millions de dollars américains par an dans le monde entier (Torgerson et Claxton, 1999), avec plus de 600 millions d'animaux infestés (Ramajo *et al.*, 2001) et (Mas-Coma et Dalton, 2006). Les foies parasités deviennent impropres à la consommation et elles sont souvent saisies en totalité. En plus, leur qualité organoleptique et nutritive est altérée par formation de fibroses (Euzéby, 1998).

L'hôte définitif s'infeste généralement par la consommation des plantes aquatiques comestibles (cresson et pissenlit) sur lesquelles sont enkystées les formes infestantes (les larves métacercaires) des douves rejetées par la limnée (Rondelaud et Mage 1990) ou suite à la consommation d'eau contaminée (Karahocagil et *al.*, 2011). Les douves immatures sont à la fois histophages et hématophages et leur migration dans le parenchyme hépatique est assurée par l'action lytique de leurs sécrétions enzymatiques. Les formes matures sont toutefois hématophages et dès qu'elles s'installent dans les canaux, elles se nourrissent essentiellement de la dégradation de l'hémoglobine provenant du sang de l'hôte. Chez les animaux atteints, la maladie se manifeste cliniquement par un syndrome d'anémie chronique, cachectisante et des cirrhoses, alors que certains animaux infestés ne présentent parfois aucun signe clinique. Chez

l'Homme, l'infestation par *F. hepatica* semble être moins répandue, mais elle provoque une maladie grave dont le traitement est difficile (Jorland et al., 1995).

Le parasite *F. hepatica* est doté d'une structure biologique très complexe, et contient de nombreuses substances dont le pouvoir antigénique est parfaitement élucidé par la mise au point de diverses techniques de purification ou de dépistage sérologique. Ses antigènes peuvent être divisés en deux catégories : les antigènes somatiques qui font partie intégrante de la structure du tégument et des différents tissus du parasite, et les antigènes métaboliques qui sont principalement les produits d'excrétions-sécrétions libérés spontanément par le parasite dans l'organisme de l'hôte (Lehner et Sewell 1980).

Les premiers antigènes sont largement employés, à l'état brut, dans le dépistage sérologique de la maladie à *F. hepatica*, car ils possèdent un haut potentiel diagnostic. Cependant, ces antigènes sont d'obtention difficile et présentent certaines fractions non spécifiques (Lehner et Sewell, 1980). En plus, la méthode de production d'une molécule purifiée à partir d'un antigène brut excrété-sécrété est souvent laborieuse, peu reproductible et coûteuse en matériel biologique (Bossaert et al. 2000). Les antigènes somatiques bien qu'ils soient rarement utilisables dans les tests d'immunodiagnostic de la fasciolose, ils offrent plusieurs avantages pratiques : ils sont faciles à obtenir et à préparer en quantités satisfaisantes et possèdent en outre plusieurs fractions antigéniques dont la spécificité est plus ou moins importante. Ces caractéristiques ont fait donc des produits somatiques de *F. hepatica* l'objet de plusieurs recherches visant à étudier, purifier et produire d'autres molécules antigéniques plus spécifiques dont l'utilisation comme réactifs permettrait d'améliorer les performances pratiques de l'Elisa qui demeure le test le plus largement employé dans la détection rapide et spécifique de la présence d'anticorps anti- *F. hepatica* dans les sérums d'animaux testés.

Ce travail qui comporte deux chapitres théoriques a pour objectif d'apporter une contribution à l'étude biochimique et immunologique de cette parasitose. Dans un premier chapitre, il nous a paraît important de présenter une description peu approfondie de l'agent étiologique, *F. hepatica*. Puis, dans un deuxième chapitre, nous avons abordé les connaissances acquises jusqu'à présent sur l'immunité de la fasciolose à *F. hepatica*, ainsi que les différents mécanismes dus aux interactions hôte-parasite. Et enfin, la partie pratique qui traite le mode d'obtention, de dosage et de séparation des constituants protéiques de ce parasite.

## 1. Le parasite :

### 1.1. Classification :

Dans la nomenclature zoologique internationale, l'espèce *Fasciola hepatica* est classée dans les taxons suivants:

- **l'Embranchement** des Plathelminthes
- **Classe** des Trématodes
- **Sous-classe** des digénea
- **Ordre** des Distomes
- **Famille** des Fasciolidae
- **Genre** de Fasciola
- **Espèce:** *hepatica*

### 1.2. Morphologie : (Fig. 1)

*Fasciola hepatica*, ou la grande douve du foie, est un ver plat d'aspect lancéolé, à symétrie bilatérale et sans segmentation (Andriamanantena et al., 2005). Elle mesure 20-30 mm de longueur × 8-13 mm de largeur, blanc au centre et plus foncé en périphérie. Son corps comprend deux parties; l'une antérieure qui est un cône céphalique portant un organe de succion dit ventouse buccale, et l'autre postérieure qui est aplatie et se prolonge vers l'arrière par une extrémité élargie et foliacée. La ventouse ventrale est distante de 3 à 5 mm de la ventouse buccale. Elle est musculeuse et permet à la douve de se fixer (Thoury, 1991).

### 1.3. Autres espèces : (Fig. 2 et 3)

En plus de *F. hepatica* qui semble être une espèce très répandue dans le monde, il existe les espèces suivantes :

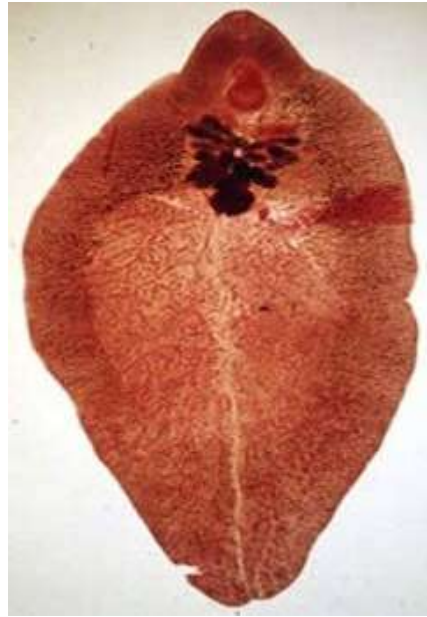
***Fasciola gigantica*** : Elle mesure 3 à 7 cm de longueur sur 8 à 12 mm de largeur à bords presque parallèles. Selon les régions, on les rencontre plus ou moins allongées ou plus ou moins trapues. Le cône céphalique est moins développé et les épaules moins marquées. La couleur générale est brun-pâle avec une large zone périphérique gris (Daynes et Bouchet, 1972). Les œufs de *F. gigantica*, operculés, mesurent de 160 à 200 µm sur 90 à 100 µm (1).



*F. gigantica* est présente chez la chèvre et le buffle en Afrique intertropicale, en particulier au Bénin où elle remplace *F. hepatica*, en Asie (Inde Pakistan, Malaisie, Iran, Irak, dans les îles d'Océanie), en Espagne, en Turquie, aux Etats-Unis et à Hawaï (Guillaume, 2007).

***Fascioloides magna***: Elle se présente comme un ver plat de couleur pourpre-gris, de forme allongée et ovale, elle est souvent entourée par une capsule fibreuse. Baignant dans un liquide boueux, elle apparaît trop sombre. La taille de cette espèce varie de 15-30 mm de large et de 30-100mm de long sur 2-5 mm d'épaisseur (2). *F. magna* se rencontre en Europe et en Amérique du Nord, y compris Canada. En Zimbabwe, entre 30% et 70% des bovins abattus ont été infestés par *F. magna* (FAO, 2004). Elle est présente chez l'élan, le cerf, l'orignal, les bœufs, les moutons, les ovins et les caprins (3).

Il existe aussi d'autres espèces moins répandues dans le monde telles que *Dicrocoelium dendriticum* (petite douve), *Clornorchis sinensis* (douve de chine), *Opistorchis felineus* et *Fasciolopsis buski* qui atteignent les intestins (Iariviere et al., 1987).



**Fig. 1:** *Fasciola hepatica* adulte (4).



**Fig. 2:** *F. gigantica* adulte (à gauche) et *F. hepatica* adulte (à droite) (5).



**Fig. 3:** *Fascioloides magna* adulte (6).

## 2. Anatomie :

### 2.1. Tégument : (Fig. 4)

Le tégument est confluent avec des cellules sous-jacentes par des connexions cytoplasmiques microtubules bordées. Il se compose d'une membrane tégumentaire externe, une matrice contenant des corps discoïdes, organismes membraneux, généralement des mitochondries et une membrane tégumentaire basale. Le tégument contient souvent des épines entre la membrane externe et basale. Les cellules sous-jacentes contiennent des noyaux, des mitochondries, le réticulum endoplasmique rugueux, le complexe de Golgi et les ribosomes (Fried et Graczyk, 1997).

La membrane externe tégumentaire est recouverte d'une couche riche en glucides, le glycocalyx, qui est labile et se compose essentiellement de glycoprotéines avec des chaînes d'oligosaccharides et de gangliosides. Le rôle du glycocalyx chez le parasite n'est pas connu, mais il est probablement important dans la protection, l'absorption, et surtout dans les propriétés immunologiques du tégument qui se renouvelle chaque 2 à 3 heures (Vukman et al., 2013) ; (Fried et Graczyk, 1997).

#### 2.1.1. Appareil digestif : (Fig. 5)

Le tube digestif de *F. hepatica* est constitué de la ventouse buccale, point de départ de l'appareil digestif, suivi d'un pharynx musculueux puis d'un œsophage. Il se termine par un intestin ramifié en de nombreux diverticules aveugles : les *caeca*. Il n'y a pas d'anus (Donnadieu, 2001).

Les formes immatures de *F. hepatica* sont histophages alors que la forme adulte est presque complètement hématophage et le contenu de son intestin est vidé dans la bile au bout de trois à quatre heures régulièrement, ce qui nécessite un système digestif très efficace (Simpkin et al., 1980).

#### 2.1.2. Appareil reproducteur : (Fig. 6)

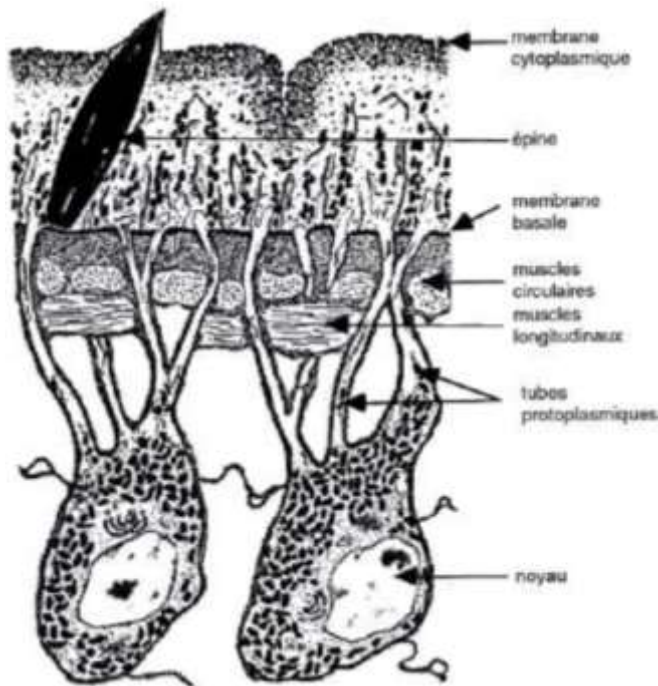
L'appareil génital mâle est formé de deux testicules, lobés et ramifiés, donnant sur deux spermiductes qui aboutissent à un cirre pénien muni de deux crochets, placés dans une enveloppe épaisse. Ce cirre se dévagine lors de l'accouplement. Alors que l'appareil génital

femelle est très développé. L'ovaire est relié par deux glandes vitellogènes lobées et ramifiées, produisant des cellules vitellines qui sont conduites jusqu'à l'ootype pour être associées aux ovules fécondés (Achi, 1990).

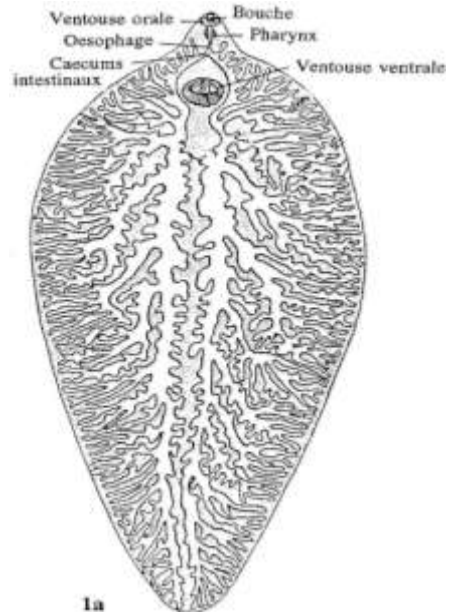
La grande douve est hermaphrodite, possède à la fois un appareil génital mâle et un appareil génital femelle. On suppose cependant que la fécondité est dans la plupart du temps de type croisé, nécessitant donc deux individus. Donc il n'y a pas une autofécondation mais un accouplement réciproque (Dar, 2004); (Daynes et Bouchet, 1972-1973).

### ***2.1.3. Appareil excréteur : (Fig. 7)***

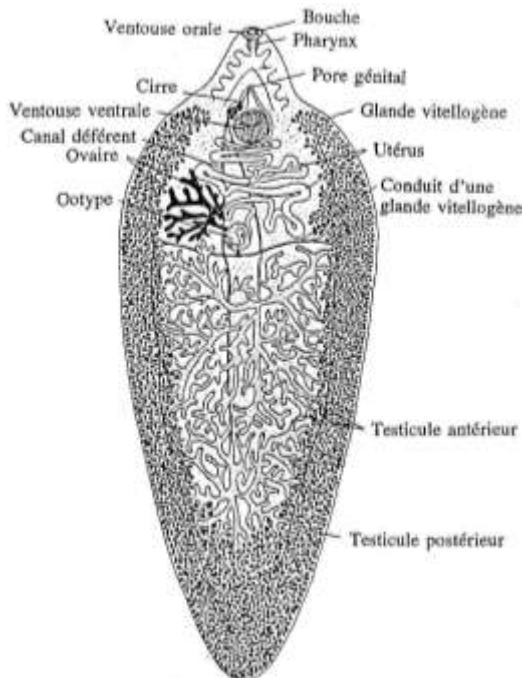
L'appareil excréteur est de type protonéphridien, d'origine ectoblastique et baigne dans l'hémolymphe (Thoury, 1991). Il est formé d'un réseau de canalicules ramifiés. Le canal collecteur commun, pourvu à son extrémité d'une vessie contractile aboutit au pore excréteur. Cet appareil joue un rôle dans l'excrétion des produits de sécrétion (Belkaid et *al.*, 1992).



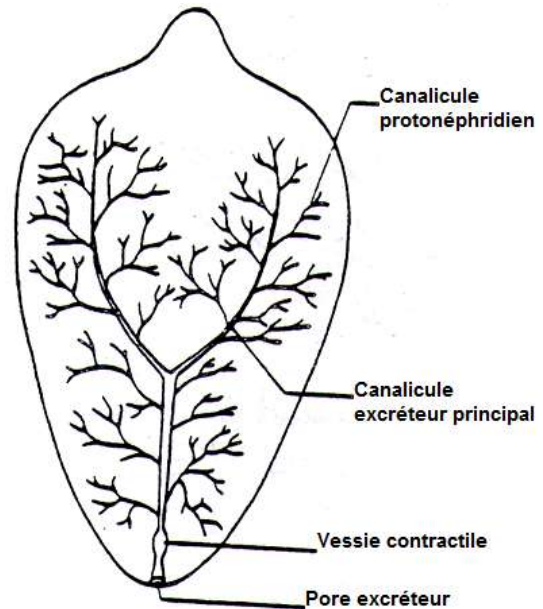
**Fig. 4:** Structure du tégument de *F. hepatica* (Threlgold, 1963).



**Fig. 5:** Structure du système digestif de *F. hepatica* (Soulsby, 1982).



**Fig. 6:** Structure du système reproducteur de *F. hepatica* (Soulsby, 1982).



**Fig. 7:** Structure de l'appareil excréteur de *F. hepatica* (Beaumone et Cassier, 1981).

### 3. Le cycle biologique : (Fig. 8)

Le cycle évolutif de la grande douve du foie est bien connu depuis les études de Leuckart (1881). Il est résumé dans la figure 8.

L'œuf est pondu par la forme adulte dans les canaux biliaires des hôtes définitifs. Il est de couleur jaunâtre, ellipsoïdal avec un opercule polaire. Il renferme une masse moruliforme qui remplit toute la coque. L'œuf mesure 160-200  $\mu\text{m}$   $\times$  90-105  $\mu\text{m}$ . Il est entouré d'un vitellus (Achi, 1990).

#### 3.1. Développement de l'œuf de *F. hepatica* :

Les œufs sont éliminés par la bile et se retrouvent dans les fèces avant d'être rejetés avec eux dans le milieu extérieur. Si les œufs se trouvent dans un milieu humide, ils éclosent après une période d'incubation. La durée de celle-ci dépend des conditions climatiques : elle est, par exemple, de 20 jours à 20° C et de 15 jours à 25° C selon Ollerenshaw (1971). Il en sort des larves libres et ciliées, appelées miracidiums, qui nagent rapidement à la rencontre de l'hôte intermédiaire qui est un mollusque. La durée de vie de ce stade est courte (quelques heures) (Dar, 2004).

#### 3.2. Évolution chez l'hôte intermédiaire :

La rencontre du mollusque par le miracidium est favorisée par un phototropisme positif du miracidium, le poussant à aller vers les zones ensoleillées et à la surface de l'eau, lieu où vivent habituellement les limnées, qui exercent un chimiotropisme (Donnadieu, 2001).

Les hôtes intermédiaires les plus importants de *F. hepatica* sont *Lymnea tomentosa* en Australie, *L. truncatula* en Grande-Bretagne et en Europe, *Galba bulimoides*, *Galba bulimoides techella* et d'autres encore aux Etats-Unis (3). D'après Mekroud et al. (2006), le mollusque le plus distribué dans le nord-est de l'Algérie est *Galba truncatula*. Les mollusques s'infestent préférentiellement au début de l'été, mais peuvent garder l'infestation toute l'année.

Le miracidium pénètre dans l'orifice respiratoire de la limnée, perce par effraction le poumon et s'y transforme en une deuxième forme larvaire, le sporocyste. Le miracidium perd sa ciliature, son tube digestif, ses ocelles, ses protonéphrédies et ses glandes céphaliques. Elle

grossit et devient un sac informe bourré de cellules sexuelles. Chacune de ces cellules pourra dans le sporocyste évoluer par parthénogénèse vers une nouvelle larve : la rédie. Mais leur nombre n'est pas très bien défini. La plupart des auteurs évaluent à dizaine la quantité de rédies produites par sporocyste. Chaque rédie perce la paroi du sporocyste et pénètre dans le foie de limnée. Elle s'y nourrit car elle possède une bouche, un pharynx musculueux et un tube digestif dépourvu d'anus. (Fourie et *al.*, 2012).

Les premières rédies apparaissent progressivement à partir du 14<sup>ème</sup> jour (à 20 °C) et migrent vers le pancréas de la limnée où une seconde génération de rédies est produite. Chaque rédie engendre de 16 à 20 cercaires, une forme larvaire pourvue d'une queue locomotrice. L'émission de ces cercaires se fait 8 à 9 semaines après pénétration de la limnée par le miracidium (Donnadieu, 2001) et (Tliba, 2001).

### 3.3. Évolution dans le milieu extérieur :

Au 50<sup>ème</sup> jour du cycle, les cercaires quittent la limnée vers le milieu extérieur. Une fois dans l'eau, les cercaires ont une durée de vie de deux heures. Elles possèdent un géotropisme et un phototropisme négatifs : elles nagent donc vers les parties sombres des pièces d'eau, le plus près possible de la surface de la nappe. Elles cherchent alors à se fixer sur des supports émergés tels que les plantes aquatiques, comme le cresson sauvage, le pissenlit, la mâche et des brindilles flottantes à la surface de l'eau, par le biais de leur ventouse ventrale.

Après fixation, les cercaires perdent leur queue, sécrètent un mucus qui se solidifie et forme un kyste globuleux, réalisant ainsi le stade métacercaire. C'est une sorte de boule blanche puis brune de 0,2 à 0,3 mm de diamètre, à paroi épaisse. Son enveloppe externe la protège contre le froid, la chaleur, et la sécheresse. La durée de survie est variable selon les conditions climatiques, elle peut atteindre 6 mois à un an (Donnadieu, 2001) et (Tliba, 2001).

Dans les conditions habituelles, à la belle saison, une durée de développement exogène (de l'œuf aux métacercaires) de l'ordre de 3 mois semble nécessaire (Bussiéras et Chermette, 1988) et (Gaasenbeek et *al.*, 1992).

### 3.4. Evolution chez l'hôte définitif :

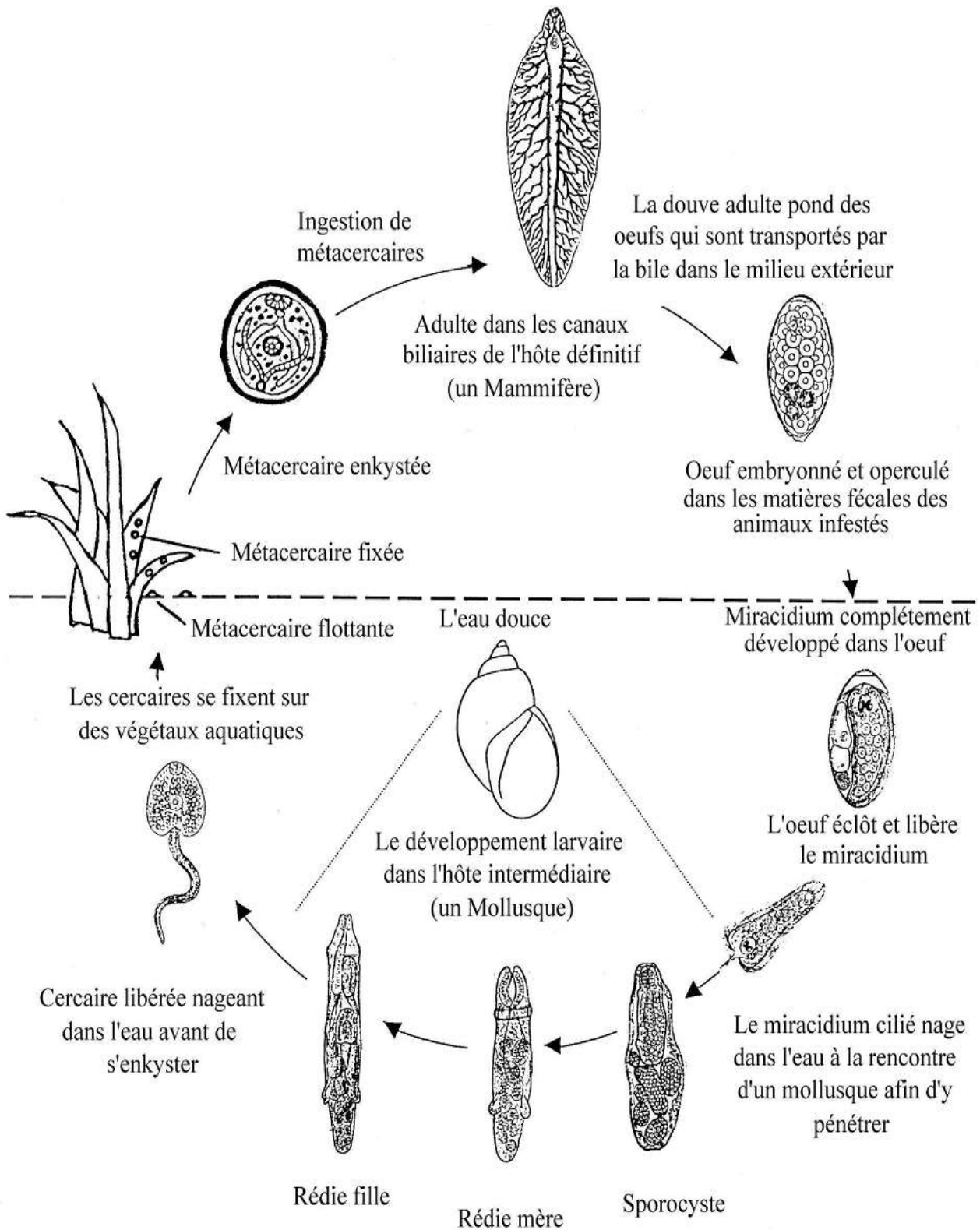
L'infestation de l'hôte définitif se fait par l'ingestion des végétaux contaminés par les métacercaires qui sont la forme infestante.

Les sucs du tractus digestif du nouvel hôte dissolvent l'enveloppe kystique de la jeune douve. Celle-ci franchit la paroi intestinale en moins de 24 heures pour passer dans la cavité abdominale.

La distomule (jeune larve) capable de dilacérer l'épithélium et les tissus sous-jacents, progresse activement jusqu'à pénétrer dans le foie à travers la capsule de Glisson. Après une migration dans le parenchyme hépatique, elle pénètre puis se fixe dans les canaux biliaires et devient adulte. La ponte débute environ 12 semaines après l'infestation; la période prépatente est donc de trois mois environ (Belkaid et *al.*, 1992) et (Donnadieu, 2001).

Les jeunes douves, histophages, se nourrissent des tissus qu'elles traversent durant leur migration; les douves adultes se nourrissent dans les canaux biliaires du sang qui s'écoule lorsqu'elles lèsent la paroi de ces canaux avec leurs épines tégumentaires. La durée totale du cycle évolutif de *F. hepatica* est d'environ 150 jours (Donnadieu, 2001).





**Fig. 8:** Cycle de développement de *F. hepatica* (Euzéby, 1971 ; Soulsby, 1982).

## 4. Répartition géographique :

### 4.1. Dans le monde : (Fig.9)

La fasciolose à *F. hepatica* est une parasitose cosmopolite. Le pourcentage d'infestation par ce parasite chez les animaux herbivores en Amérique, Europe, Asie, Afrique, le sous-continent Indien, et certaines îles du pacifique est très élevé. En Amérique, la maladie est très fréquente à Cuba, aux États-Unis, au Mexique, à Costa Rica, au Puerto Rico, au Pérou, à l'Argentine, à l'Uruguay, au Vénézuéla et au Chili (Andriamanantena et al., 2005). Elle se rencontre également en Russie et en Europe (la Hongrie, l'Allemagne, l'Espagne, la Hollande, l'Angleterre et la France). En Afrique, la fasciolose a été signalé dans le Nord-ouest du continent (Côte d'ivoire, Bénin et Sénégal), l'Égypte, la Somalie et l'Afrique du Sud. En Asie, elle se rencontre fréquemment en Chine, au Tibet, au Japon, à l'Iran, en Inde et aux pays du Moyen-Orient. Dans certaines régions, l'infestation par *F. hepatica* et *F. gigantica* coexiste (Espino et Dumeniga, 2003).

Concernant la distomatose humaine due à *Fasciola*, des études récentes ont reporté que cette parasitose est très répandue dans le monde, et d'après l'OMS on a estimé à environ 7 millions la population humaine à risque de distomatose (Bourée et al., 2011). En outre, et d'après les mêmes auteurs, on a recensé entre 2,5 et 17 millions de cas entre fasciolose animale et humaine dans plus de 50 pays. En France, l'infestation des humains se rencontre surtout dans les grandes régions d'élevage, avec 27 cas recensés dans le département de L'Orne entre 1980 et 1990 et 860 cas recensés dans la région du limousin entre 1955 et 1999 (Bourée et Thiebault, 1993) et (Rondelaudet al., 2000). En Tunisie, 36 cas humains ont été recensés depuis 1940, date du premier cas (Hammami et Ayadi, 1999). Au Pérou, la prévalence de l'infestation humaine a atteint 28 % à Lima et 72 % dans l'Altiplano (Bourée et al., 2011).

### 4.2. En Algérie :

La fasciolose à *F. hepatica* est une importante parasitose qui sévit largement en Algérie et atteint les animaux de pâturage, surtout dans les régions du Nord-est du pays. En effet, une étude sur terrain réalisée au niveau de la wilaya d'El Tarf a montré que cette région est considérée comme une zone endémique, lourdement touchée par cette affection (Righi et al., 2012).

Dans la région littorale de Jijel, la prévalence moyenne de l'infestation naturelle entre 1994 et 1996 a été évaluée à 27% chez les bovins et à 18,2% chez les ovins à l'abattoir local (Mekroud et *al.*, 2006). Le diagnostic sérologique effectué sur 12 troupeaux de la même région entre 1999 et 2001 fournit des chiffres identiques : 26,7% et 23,5% par ordre respectif. Les chiffres sont cependant moins élevés à l'intérieur du pays, avec des taux moyens d'infestation compris entre 6,3 et 9,1% chez les bovins dans la région de Constantine (Mekroud et *al.*, 2006). Ces statistiques sont loin de refléter la réalité actuelle du terrain Algérien puisque de nombreuses études menées ces dernières années ont montré des prévalences nettement plus élevées (Mekroud, 2004).

L'Algérie est un pays qui n'est pas indemne de distomatose humaine puisque, d'après (Aissi et *al.*, 2009), on a signalé 3 cas à Constantine qui s'ajoutent aux 4 cas de fasciolose humaine rapportés dans la localité de Blida entre 1990 et 2003.



**Fig. 9:** Distribution géographique de la fasciolose à *F. hepatica* (Torgerson et Claxton, 1999)

## 5. Impact économique :

La fasciolose est considéré comme étant la deuxième maladie de cheptels, touchant sérieusement l'économie de manières différentes (Espiro et Dumenigo, 2003) :

### 5.1. Production de la viande :

La maladie provoque une baisse dans la prise pondérale des animaux, due à une diminution de l'appétit et de la conversion alimentaire. Les bovins ayant à titre d'exemple une intensité parasitaire de 54 douves adultes, accusent une chute de poids de l'ordre de 8 à 9% en dépit de l'absence du moindre signe clinique. Alors que chez les moutons, les baisses sont estimées entre 0.03 et 0.3 kg/semaine pour des intensités parasitaires allant de 45 à 200 douves adultes (Tliba, 2001).

Selon une étude menée par l'Organisation panaméricaine de la santé, la fasciolose est la cause de pertes importantes en matière de viande industrielle à Cuba, la République dominicaine, Haïti et la Jamaïque (Agnamey et *al.*, 2012).

Une étude européenne effectuée sur des veaux âgés de 8 à 9 mois ayant été infestés expérimentalement par *F. hepatica* a permis de constater au cours de la période d'infestation subclinique (en moyenne 54 douves par veau) une réduction de gain de poids de 8%. Des niveaux plus élevés d'infestation (avec en moyenne 140 douves par veau) ont réduit le gain de poids de 29% (Kaplan et *al.*, 2001).

Des études menées par Mage (1990) sur des veaux limousins ont montré une différence de poids au sevrage de 3 et 12 Kg entre veaux infestés et non infestés. Une autre étude a montré qu'il fallait pour atteindre un même poids, 39 jours supplémentaires d'engraissement chez les animaux infestés par rapport aux animaux non infestés. Un essai mené en collaboration entre l'ITEB, L'INRA et les ENV a montré l'impact de l'infestation expérimental sur la croissance des jeunes bovins avec un manque à gagner de 19 Kg pour le lot infesté non traité par rapport au lot non infesté et de 1,7 Kg pour le lot infesté mais traité six semaines après la dernière infestation expérimentale (Mage, 1990).

### 5.2. Production laitière :

Certains travaux ont évalué l'impact de la fasciolose sur la production de lait. Des résultats établis par Ross (1970) ont montré que les vaches saines produisaient 6% de lait en plus que les animaux infestés et traités et 8 à 20% en plus que les animaux infestés par 100, 200 à 300 et 500 douves adultes et non traités. Dargie (1987) a estimé la perte de lait de 90 à 300 kg par lactation annuelle chez le bovin. Par ailleurs, il a été prouvé que la maladie influe sur la qualité du lait par perturbation du métabolisme hépatique (synthèse de protéines, de matières grasses et de lactose) qui se répercute sur le gain de poids des agneaux et des brebis douvés (Mage, 1990).

### 5.3. Qualité de toison :

La fasciolose provoque une baisse de la quantité et de la qualité de laine à cause de la perte de l'appétit. En effet, d'après Roseby (1970), une diminution de la production lainière de 20 à 30%, a été observée chez des moutons atteints de fasciolose. En outre, lors d'une infestation expérimentale des moutons, il a été constaté une réduction de 23 à 50% de la qualité de la laine des animaux, avec une intensité parasitaire de 45 à 350 douves.

### 5.4. Reproduction et fertilité :

La fasciolose retarde l'âge de la puberté, et diminue la fertilité chez les vaches laitières qui est estimée à 25% d'après l'étude de Mage (1990).

En 1986, une étude sur les béliers pré-pubères a suggéré que l'infestation par la douve du foie altère le catabolisme hépatique des androgènes. Des résultats similaires sont été décrits dans une étude utilisant un modèle murin dans laquelle l'infestation par *F. hepatica* a provoqué une diminution significative du métabolisme hépatique dépendant de la progestérone et la testostérone. Une étude récente sur des génisses pré-pubères a démontré un retard significatif de 39 jours dans l'apparition du premier œstrus chez les animaux infestés. Des génisses infestées par *F. hepatica* avaient aussi des niveaux significativement plus élevés d'œstrogène et de baisse significative des niveaux de progestérone que les animaux non infestés. La cause de cet effet n'est cependant pas claire, mais il semble que les douves du foie modifient quelque peu le métabolisme et/ou l'équilibre des hormones sexuelles normales (Kaplan, 2001).

Des travaux menés chez la brebis montrent que des infestations expérimentales par *F. hepatica*, à forte dose ont provoqué des avortements, des mortalités, une réduction de la fertilité et de la gestation ou encore une diminution de la taille des portées (Tliba, 2001). Ces différentes perturbations seraient associées à des modifications du métabolisme des écosanoïdes et des troubles de la biotransformation des hormones stéroïdiennes (Achi, 1990).

### **5.5. Mortalité :**

La fasciolose peut toucher plus de 700 millions d'animaux d'élevage dans le monde entier (Corvo et *al.*, 2009). La mortalité frappe surtout les moutons. Son importance est variable avec la forme de la maladie : dans la forme aiguë, on peut déterminer une mortalité de 50 à 70%, alors que dans la forme chronique, la mortalité se manifeste que par 5 à 20% des cas à la phase d'anémie et peut atteindre 50% à la période finale de cachexie (Mornet, 1972).

### **5.6. Saisie des foies aux abattoirs :**

La fasciolose peut s'exprimer cliniquement sous une forme aiguë provoquée par la migration des douves immatures dans le parenchyme hépatique, ce qui entraîne une hépatite traumatique. De plus, les douves adultes provoquent des lésions de cholangite chronique entraînant la saisie du foie à l'abattoir (Tliba, 2001).

Dans les années 1960, les taux de condamnation de foie étaient de 11 à 33% à Cuba, 10 à 23% à Sainte-Lucie, de 0 à 3% à Puerto Rico, et 60% de tous les foies ont été condamnés dans un abattoir haïtien (Agnamey et *al.*, 2012).

En 1978, année humide, dans certaines régions de la France, 90% des foies des bovins ont été saisis. Aussi, des enquêtes effectuées dans le sud-ouest de la France, à l'abattoir de pamiers, entre 1985 et 1988 sur des foies de toutes origines géographiques, ont donné le chiffre de 75% de foies infestés (Dorchies et *al.*, 1988). Et selon l'association Américain des vétérinaires parasitologistes (1983), près de 1,5 millions de foies de bovins sont saisis chaque année aux Etats-Unis d'Amérique (Tliba, 2001).

Une analyse économique réalisée durant l'année 1991, à l'abattoir locale de Cuba, a montré que 600 à 689 foies ont été condamnés, et les pertes dues à la saisie des foies n'ont cessé d'augmenter chaque année jusqu'à ce que le taux des foies condamnés atteigne, en 1995, 276 tonnes (Espino et Dumenigo, 2003).

En Algérie, selon une étude effectuée, dans la wilaya de Jijel, la prévalence de l'infestation naturelle par *F. hepatica* a été estimée à 23% chez les bovins et 16% chez les ovins, et le nombre des foies, ayant fait un objet de saisie à l'abattoir local, a été estimé à plus d'un million de dinars (Mekroud et *al.*, 2006).

## 6. Effet sur la santé publique :

Accidentellement, l'Homme s'infecte par la consommation de végétaux crus sauvages ou cultivés tels que le cresson, le pissenlit, la mâche et la menthe. Plus de 300.000 cas cliniques de distomatose humaine à *F. hepatica* ont été rapportés dans le monde depuis 1970 (Andriamanantena, 2005). Il convient de souligner que la fasciolose humaine dans une région donnée ne montre pas nécessairement des caractéristiques épidémiologiques parallèles à ceux des animaux.

Chez l'Homme, la fasciolose est considérée comme une maladie grave, provoquant chez lui de nombreux problèmes, tels que l'hémorragie, la thrombose veineuse extra hépatique, les localisations ectopiques et la crise de colique hépatique. En outre, l'accès d'angiocholite et les poussées d'ictère ont été décrits chez certains patients atteints de fasciolose aiguë. Puisque les vers adultes peuvent vivre dans les canaux biliaires jusqu'à 10 ans, ils entraînent souvent des complications graves et irréversibles comme la cirrhose, la sclérose des voies biliaires, l'abcès hépatique et le granulome nécrotique du foie. Certains ont évoqué la cancérisation éventuelle des légions hépatobiliaires (Thao Duong Quang et *al.*, 2008).

L'infestation humaine a été signalée dans de très nombreux pays, notamment en Amérique latine où il y'a des régions qui présentent des taux d'infestation très élevés et les zones endémiques humains peuvent être largement répandues, comme au Pérou, ou être limités à des points relativement réduits malgré que l'infestation du bétail est distribué dans tout le pays, comme en Bolivie (Ashrafi et *al.*, 2014).

## 1. Les antigènes de *F. hepatica* :

Lorsque le parasite pénètre dans l'organisme hôte, la maladie se développe, entraîne l'activation des défenses spécifiques, et permet l'établissement d'une mémoire spécifique du parasite. Bien que l'organisme ne puisse reconnaître que certaines parties du corps étranger, les antigènes, le système immunitaire est capable de défendre l'organisme contre ce parasite.

*F. hepatica* est une mosaïque antigénique dont la composition change au cours du cycle évolutif. Les différents antigènes ont été classés comme antigènes de surface ou somatiques et antigènes d'excrétions- sécrétions (E/S) ou métaboliques.

### 1.1. Les antigènes de surface :

Les antigènes de surface sont obtenus par différents procédés à partir du parasite entier, vivant ou non ou encore par des fragments parasitaires. Ces antigènes jouent un rôle évidemment primordial dans la réponse immunitaire, parce qu'ils sont situés directement en contact avec l'hôte (Golvan et Ambroise, 1987).

*F. hepatica* possède 03 types de cellules tégumentaires qui libèrent des granules sécrétoires dépendantes du stade évolutif du parasite.

Il existe trois types de cellules tégumentaires qui libèrent des granules sécrétoires variables en fonction du stade : les cellules de type 0 sécrètent des granules "T0", présents chez le ver juvénile fraîchement excysté; les cellules de type 1 sécrètent des granules "T1" chez le ver juvénile qui a atteint le foie; les cellules de type 2 sécrètent des granules "T2", chez le ver adulte qui a atteint les canaux biliaires (Tliba, 2001).

Ces granules sécrétoires gagnent la couche syncytiale externe, puis fusionnent avec la membrane cellulaire pour ajouter leur contenu au manteau glycoprotéique externe : le glycocalyx. Ce dernier est éliminé par le parasite et renouvelé en permanence grâce aux granules sécrétoires « *Turn over* » du glycocalyx (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 sur 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 52 et 170 KDa.



### 1.2. Les antigènes d'excrétion-sécrétion E/S :

Différents antigènes ont été identifiés dans les produits d'excrétions-sécrétions de *F. hepatica*, impliqués dans divers rôles physiologiques : la nutrition, l'excrétion, la reproduction et l'échappement du système immunitaire de l'animal hôte. Ce sont des substances produites par l'appareil digestif et libérées spontanément dans le tissu de l'hôte, aux différents stades du développement (Moreau et *al.*, 1997).

De nombreux auteurs ont mis en évidence de nombreux antigènes spécifiques au cours des différents stades de développement du parasite, par l'emploi de différentes méthodes immunologiques. Le principe de ces méthodes consiste à développer une réaction immunologique entre le sérum prélevé sur plusieurs espèces d'animaux sensibilisées et les différentes molécules antigéniques des formes immatures et adultes. Ensuite, ces molécules antigéniques sont différenciées par leur masse. Ainsi, on a remarqué que chez les formes adultes de *F. hepatica*, les molécules de 260 et 38 KDa sont reconnues par le sérum de toutes les espèces, alors que chez les formes immatures, les molécules de 27 à 52 KDa sont régulièrement retrouvées (Thoury, 1991).

Certains de ces produits d'excrétions-sécrétions montrent des activités protéolytiques et contiennent notamment diverses cystéines protéases, ainsi que des dipeptidylpeptidases (Trap et Boireau, 2000). Ces protéinases jouent un rôle très important dans la digestion protéolytique de l'hémoglobine de l'hôte, permettant ainsi la nutrition du parasite. Outre ces peptidases, *F. hepatica* sécrète différentes Glycosidases :  $\beta$ -N-acetyl hexominidase,  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Glucosidase,  $\alpha$ -fucosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -mannosidase et neuraminidase (Irwin et *al.*, 2004). Ces molécules sont responsables de la pénétration chez l'hôte et de la dégradation des tissus hépatiques par les jeunes larves lors de la migration.

Outre les peptidases et les glycosidases, des études menées par Maggioli et *al.* (2004), ont montré la présence de niveaux élevés de superoxyde dismutase (SOD) dans le produit d'excrétion-sécrétion des vers immatures et adultes. Le peroxyde ( $H_2O_2$ ) produit par dismutation de SOD  $O_2^-$  a un effet qui est potentiellement très dommageable pour les tissus de l'hôte (Maggioli et *al.*, 2004).

## 2. Communauté antigénique avec d'autres parasites :

*F. hepatica* possède des antigènes en commun avec d'autres helminthes responsables souvent de l'apparition des réactions croisées dans les sérums testés au cours des tests

sérologiques. En plus, cette communauté antigénique est à l'origine d'une protection réciproque entre différentes espèces parasitaires (Thoury, 1991).

La moitié des antigènes parmi la mosaïque antigénique de *F. hepatica* est commune chez les cestodes, la quasi-totalité chez les nématodes et le quart environ chez les trématodes (**Tableau 1**).

Ces Communautés antigéniques sont largement exploitées dans la protection des animaux contre certaines infestations parasitaires. En effet, les bovins infestés avec *Schistosoma bovis* acquièrent une résistance à *F. hepatica*, 10 semaines après (Sirag et al., 1985). Le même phénomène a été observé par El Azazy et al. (1985) sur des rats infestés 08 semaines avant par *Schistosoma mansoni*, dans lesquels le cycle de *Schistosoma mansoni* a été interrompu. D'autre part, l'infestation par *Cysticercus tenuicollis* a protégé le mouton contre *F. hepatica* dès la 3<sup>ème</sup> semaine post-infestation. Une autre expérience réalisée par Doy et al. (1981) dans laquelle ils ont induit une résistance à *F. hepatica* chez des rats préalablement infestés par *Nippostrongylus brasiliensis*.

Certaines études ont montré l'utilité de l'utilisation des antigènes de *F. hepatica* comme moyen de protection contre certaines infections, exemple l'antigène 12 KDa isolé à partir de l'extrait brut de *F. hepatica* qui a été employé en tant que vaccin contre l'infestation par *S. mansoni*, chez les animaux (7).

**Tableau 1:** Fractions antigéniques communes de divers Helminthes avec *F. hepatica*  
(D'après Biguet et al., 1962).

Espèce	Nombre de fractions communes avec <i>F. hepatica</i>	Numéro des fractions
<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 lumbricoides</i>	1	6
Hydatide	1	10

### 3. Rôle des antigènes d'E/S :

Les glucides sont doués d'une bonne spécificité immunologique mais d'une faible sensibilité par rapport aux protéines.

Les lipides sont généralement nuisible à la spécificité de la réaction immunitaire, mais ils leur revient le rôle important dans l'élimination du fer qui résulte de la dégradation du sang par le parasite. La délipidation est donc une purification, mais elle n'est pas toujours importante à effectuer lors de la préparation d'antigènes pour les analyses de routine (Korach et Benex, 1966).

Les protéines ont cependant un rôle essentiel sur le plan antigénique, puisqu'elles sont responsables de la reconnaissance, l'interaction (Ag-Ac) et l'intensité de la réponse immunitaire. De plus, les protéines de nature enzymatique (les protéases) interviennent à différents niveaux de l'interaction hôte-parasite. Elles facilitent la pénétration du parasite au sein de l'hôte et y assurent sa nutrition (Chapman et Mitchell, 1982) ; elles participent également à l'échappement vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte (Trap et Boireau, 2000) ou encore comme transporteur transmembranaire de certaines molécules vitales comme c'est le cas de l'hémoprotéine, extraite à partir de douves adultes, qui a montré une activité dans le transport d'oxygène, au profit du parasite (Mcgonigle et Dalton, 1995).

### 4. Préparation des réactifs antigéniques :

Les premiers travaux portant sur le diagnostic immunologique de la fasciolose à *F. hepatica* ont été réalisés avec des extraits de broyats de douves adultes. Ces extraits ont été initialement utilisés en immunoélectrophorèse dans le cadre de dépistage de la fasciolose humaine. Chez les animaux, l'introduction du test ELISA fasciolose comme moyen d'immunodiagnostic de terrain, exige que l'on utilise un réactif antigénique hautement purifié : c'est l'antigène standard, préparé par Boulard selon les étapes suivantes :

- Récolte de douves vivantes à partir des foies parasités ;
- Lavage, séchage et congélation ;
- Broyages à basse température ;
- Extraction dans une solution NaCl 0.0018 M ;
- Centrifugation pendant 1 h. à 12000 t/min ;
- Dialyse contre l'eau distillée et lyophilisation (Poitou et *al.*, 1993).

#### 4.1. Antigène standard de *F. hepatica*:

Actuellement, toutes les recherches sont orientées vers la production de préparations antigéniques excrétées- sécrétées plus pures. Les produits excrétés- sécrétés (PES) sont obtenus en réalisant les étapes suivantes :

- Récolte de douves adultes présentes dans les canaux biliaires des foies infestés ;
- Maintien des parasites en survie (incubation en milieu nutritif pendant des heures) ;
- Récolte du surnageant après la période d'incubation ;
- Concentration et délipidation éventuelle du produit excrété-sécrété ;
- Lyophilisation et conservation jusqu'à utilisation (Abdel-Rahman, 1999).

#### 4.2. Antigène spécifique du genre :

Parmi les nombreux antigènes contenus dans les extraits aqueux de *F. hepatica* et révélés par l'analyse immunoélectrophorétique, un seul paraît spécifique de ce parasite : c'est l'antigène correspondant à la fraction n°2 purifiée (FIIp) (Tailliez et *al.*, 1967). Cet antigène est localisé uniquement dans les régions subcuticulaires (Tailliez et Korach, 1970a).

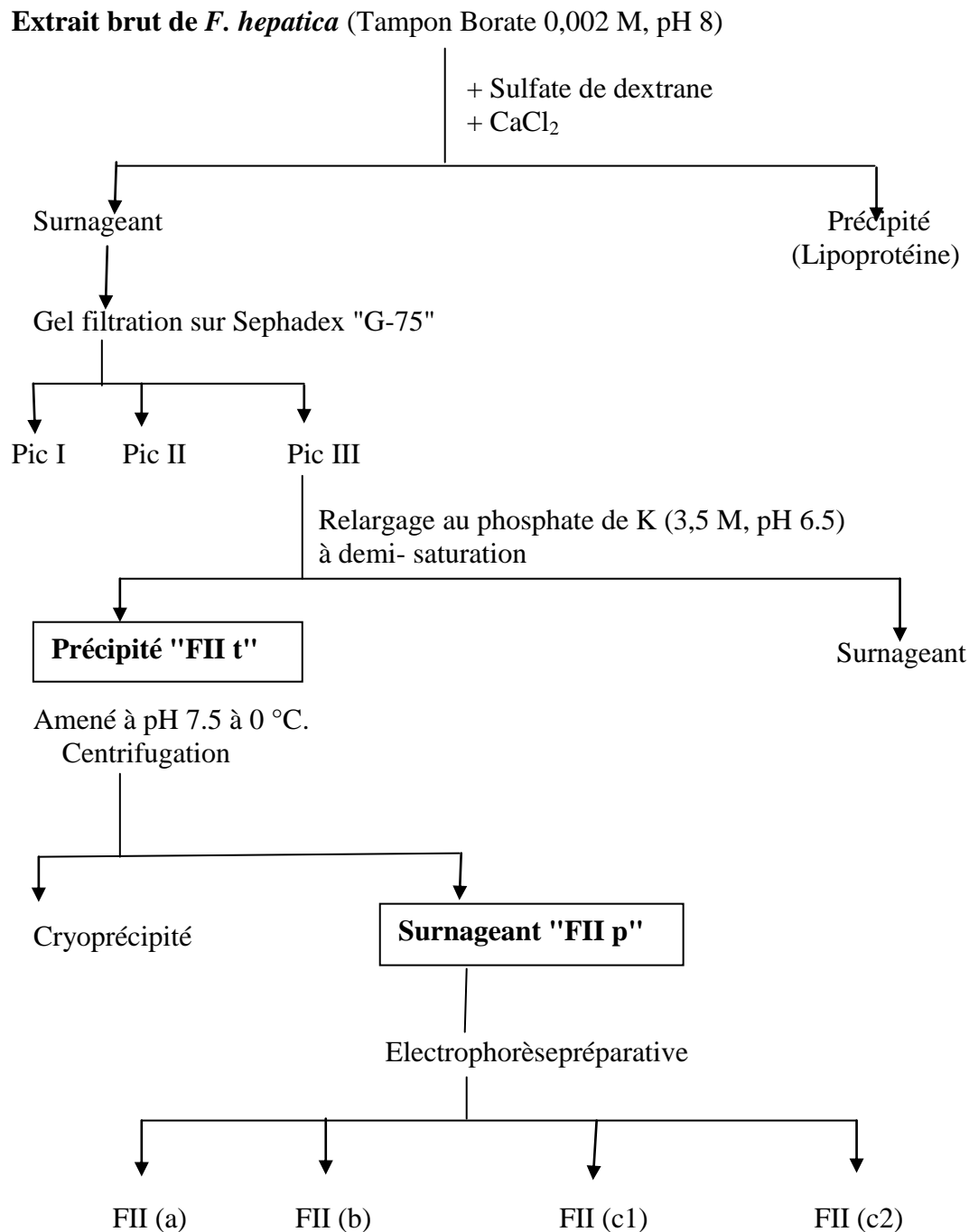
##### 4.2.1. Méthode d'obtention :

L'antigène (FIIp) a été isolé en premier temps par Tailliez et Korach (1970b), à partir du produit excrétoire-sécrétoire de *F. hepatica*, suite à une série des techniques de purification (**Fig. 10**).

En premier, les douves sont recueillies à partir des canaux biliaires des foies de moutons ou de bovins parasités, dans les trois heures suivant l'abattage. Les parasites sont soigneusement lavés plusieurs fois à l'eau physiologique (NaCl 9‰) pour enlever toute trace de sang ou de bile. Les douves vivantes sont ensuite incubées dans environ 15 fois de leur volume de borate de sodium (2 mM). Cette incubation est effectuée sous agitation magnétique à +4°C, pendant 15 h. Après filtration, le liquide d'incubation est centrifugé à 2000 g et le surnageant est recueilli pour subir une électrophorèse préparative permettant de dissocier l'antigène (FIIp) en 04 sous fractions : FII (a), FII (b), FII (c1) et FII (c2) (Poitou et *al.*, 1993). Les deux dernières fractions sont plus difficilement séparables et ont été récoltées initialement ensemble pour être désignées [FII (c)]. Ces trois sous fractions obtenues [FII (a), FII (b), FII (c)] possèdent des motifs antigéniques en communs (Tailliez et Korach, 1970a).

#### 4.2.2. Caractéristique de l'antigène spécifique du genre :

L'antigène spécifique du genre (FIIp) est une protéine tégumentaire, peu chargée en sucre, pauvre en lipides, dont le poids moléculaire est d'environ 25 KDa (Gimard, 2001). Il est très diffusible, ce qui explique l'apparition précoce et rapide d'anticorps au cours de l'infestation parasitaire. Cet antigène contient des quantités notables de fer provenant essentiellement de la digestion de l'hémoglobine et des cellules hépatiques lors de la nutrition du parasite. Il est spécifique de *F. hepatica* puisqu'il n'existe pas ni chez les trématodes (*Clonorchis sinensis* et *Dicrocoelium dendriticum*), ni chez les cestodes (*Taenia saginata*, *Moniezia expansa* et *Echinococcus anulosus*) ni encore chez les nématodes (*Ascaris suum*) (tailliez et korach, 1970b).



**Fig. 10:** Schéma de la purification de l'antigène spécifique de *F. hepatica* (D'après Tailliez et Korach, 1970a).

### 4.2.3. Intérêt de l'antigène spécifique du genre :

L'antigène ne présente pas les réactions croisées que l'on peut observer dans le cas de l'antigène excrétoire-sécrétoire "ES". C'est pourquoi, la présence d'anticorps dirigés contre l'antigène (FII p), dépisté par des techniques immunologiques, est considérée depuis près de 30 ans, comme la preuve la plus sûre d'une fasciolose humaine (Santiago et *al.*, 1986). De plus, lors du dépistage sérologique d'une fasciolose animale, une technique d'hémagglutination indirecte utilisant cet antigène, s'est révélée plus sensible que les techniques de Contre-électrophorèse ou d'ELISA dont les réactifs qui y sont utilisés comme antigènes sont à base d'extraits parasitaires bruts ou purifiés par d'autres techniques (8).

## 5. Méthodes de mise en évidence des antigènes :

### 5.1. Méthodes physico-chimique :

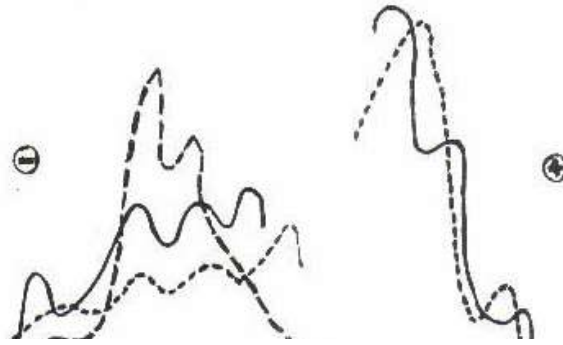
On peut distinguer plusieurs méthodes physico-chimiques fréquemment utilisées pour la séparation et la purification des substances protéiques de *F. hepatica* :

#### 5.1.1. Méthodes électrophorétiques :

Les premiers travaux mis au point pour la séparation des différents constituants de *F. hepatica* adulte, par électrophorèse en gélose, ont été réalisés à partir d'un broyat total par Biguet et *al.* (1962), où ils obtiennent 15 fractions dont la nature biochimique et les fonctions biologiques sont distinctes (**Fig. 11**). Ces fractions ont été dénombrées et classées en 03 catégories :

- 07 fractions protéiques dont 05 majeures ;
- 02 fractions glycoprotéiques majeures ;
- 06 fractions lipoprotéiques dont 02 majeures.

En outre, l'électrophorèse SDS-PAGE, effectuée sur les différents constituants protéiques de *F. hepatica*, a permis d'identifier et de caractériser plusieurs molécules de poids moléculaires variés, compris entre 10 à 180 KDa. L'application de cette technique sur l'extrait brut de *F. hepatica* a mis en évidence plus de 45 fractions peptidiques dont au moins 12 peptides ont montré une activité antigénique capable de reconnaître par le test d'immunoblotting des anticorps spécifiques dans l'anti-sérum du mouton infesté expérimentalement (Yokananth et *al.*, 2005).



**Fig. 11** : Electrophorèse sur gélose de l'antigène standard de *F. hepatica*. (D'après Biguet et *al.*, 1962).

- (—) : Courbes densitométriques et protéinogramme,
- (...) : Lipoprotéinogramme,
- (-----) : Glycoprotéinogramme

### 5.1.2. Méthodes chromatographiques :

Plusieurs types de chromatographies liquides ont été utilisés pour la séparation et/ou la purification des antigènes solubles de *F. hepatica*.

La chromatographie d'exclusion- diffusion ou gel filtration est l'une des méthodes couramment appliquée au fractionnement et à la séparation des antigènes parasitaires. Cette technique a été réalisée par de nombreux auteurs en utilisant différents types de matrice solide.

A l'aide de cette technique, les antigènes somatiques ainsi que les antigènes excrétés-sécrétés de *F. hepatica* ont été pratiquement séparés en plusieurs fractions protéiques dans une colonne remplie de gel Sephadex (Zimmerman et Clark, 1986) et (Espino et *al.*, 1986). Par ailleurs, une chromatographie liquide sous haute pression (HPLC pour High pressure liquid chromatography) a été appliquée par (Rivera et *al.*, 1988) en vue de la séparation des produits bruts excrétés- sécrétés de *F. hepatica*, ce qui a permis l'obtention d'un grand nombre de fractions, correspondant à 10 pics distincts, dont la majorité donnent des réactions positives avec les immun- sérums obtenus sur des lapins expérimentalement infestés par des métacercaires de *F. hepatica*.

La chromatographie d'échange ionique est quant à elle 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'excrétions- sécrétions de celles-ci (Mcgonigle et Dalton, 1995).

### 5.2. Méthodes immunologiques :

Ces méthodes ont permis d'identifier les véritables antigènes parmi tous les constituants. L'immunoélectrophorèse et l'immunodiffusion sont les techniques immunologiques les plus couramment utilisées pour la mise en évidence des antigènes de *F. hepatica*.

#### 5.2.1. L'immunoélectrophorèse :

La technique d'IEP est réalisable selon les étapes suivantes (**Fig.12**) :

- Une lame de microscope est recouverte d'agarose percée de deux puits : la première comporte un sérum de contrôle qui contient les antigènes témoins et la deuxième comporte le sérum à tester ;
- Découpage d'une gouttière au milieu de la lame, dans laquelle on verse de l'anti-sérumpolyclonal provenant d'un animal hyperimmunisé, capable de reconnaître pratiquement tous les antigènes de *F. hepatica* ;
- Ce système est soumis à un champ électrique qui permet de séparer les antigènes selon leur charge ;
- Après diffusion, on obtient des différents arcs de précipitation correspondant aux complexes (Ac-Ag), qui peuvent être colorés et comparés avec les antigènes témoins (Bene et Faure, 1998).

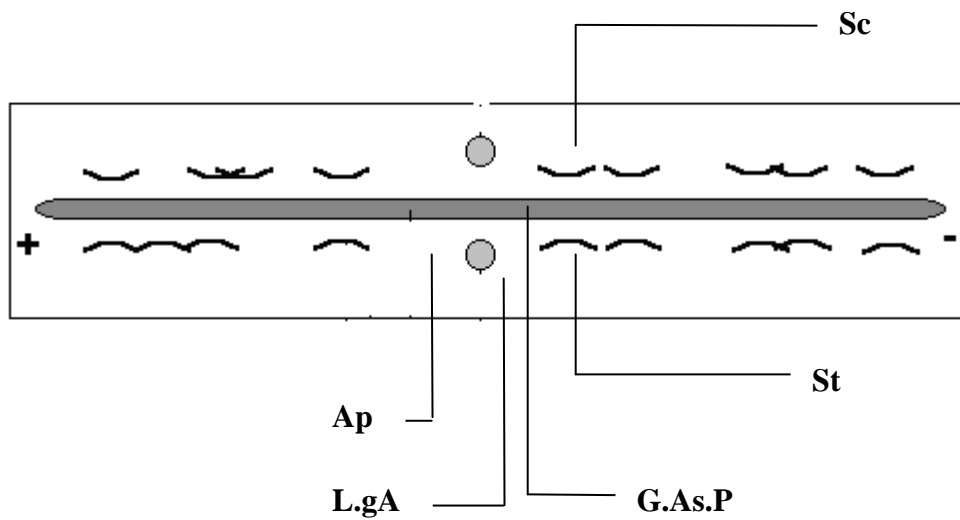
Par l'emploi de cette technique, Biguet et *al.* (1962) poursuivirent leurs investigations à partir du même broyat de douves adultes et arrivèrent à individualiser 15 fractions antigéniques (**Fig.13**). Tailliez et Korach (1970b), en exploitant la même technique, ont pu mettre en évidence l'existence d'une fraction antigénique correspondant à l'arc 2 d'IEP, spécifique de genre *Fasciola* et qui s'est avérée très efficace pour le diagnostic immunologique précoce de la fasciolose animale (Levieux et *al.*, 1992) ;(Pourquier et *al.*, 1995) et(Robert et *al.*, 1980).

### 5.2.2. *L'immunodiffusion :*

Cette méthode a été utilisée dans le but de détecter et tester la réactivité des fractions antigéniques selon la technique de double diffusion ou technique d'Ouchterlony (Ouchterlony, 1958).

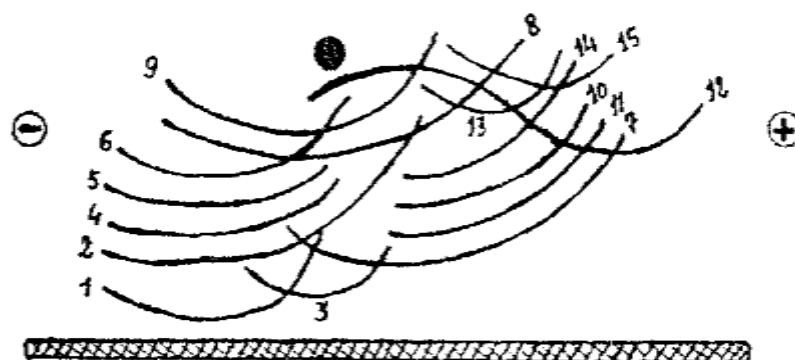
La technique utilise un gel d'agarose coulé sur une plaque de verre de quelques millimètres d'épaisseur, sur lequel on creuse une série de puits disposés en couronne (contenant les antigènes) autour d'un puits central (contenant l'anti-sérum). Après une incubation pendant 48 h, en chambre humide, à + 4 °C, une coloration pendant 10 min avec l'Amidon-schwartz et une décoloration avec 7 % d'Acide acétique, la lecture peut révéler :

- Une fusion des arcs, indiquant un même complexe immun ;
- Un éperon (arcs sécants), indiquant deux complexes immuns différents (les puits périphériques ne contiennent pas les mêmes antigènes) ;
- Des arcs doubles dans le cas de plusieurs anticorps dans le puits central ;
- L'absence d'arcs, indique qu'il n'y a pas d'antigènes dans les puits périphériques, spécifiques à l'antisérum dans le puits central (Bene et Faure, 1998).



**Fig. 12:** Principe d'immunoélectrophorèse (D'après Bene et Faure, 1998).

**Ap:** Arc de précipitation; **G.As.P:** Gouttière avec anti-sérumpolyclonal dirigé contre *F. hepatica*; **L.gA:** lame de microscope couverte d'un gel d'agarose ;**Sc:** Sérum à tester.



**Fig. 13:** Séparation des antigènes de *F. hepatica* en plusieurs arcs par immunoelectrophorèse. (D'après Biguet et al., 1962).

## 6. Immunologie de la fasciolose :

### 6.1. Immunité à médiation humorale :

La réponse humorale anti- *F. hepatica* a été largement étudiée. Elle est généralement précoce. Les études des isotypes d'immunoglobulines spécifiques vis-à-vis des produits excrétés-sécrétés de *F. hepatica* (PESFh) ont montré que les niveaux d'IgM sériques restent élevés tout au long de la migration hépatique des douves immatures (Poitou et *al.*, 1993b ; Chauvin et *al.*, 1995).

L'évolution des anticorps sériques anti- *F. hepatica* chez le rat infesté expérimentalement montre qu'ils apparaissent dès la 2<sup>ème</sup> SAI, ensuite le titre des anticorps atteint un maximum entre la 3<sup>ème</sup> et la 5<sup>ème</sup> SAI, et restent élevés jusqu'à la 7<sup>ème</sup> SAI, puis diminue progressivement après la pénétration du parasite dans les canaux biliaires. L'analyse des isotypes des anticorps impliqués, montre que les titres des IgM, IgE, IgG1 et IgG2a sont élevés chez les animaux infestés (Pfister et *al.*, 1983); (Poitou et *al.*, 1993) et (Van Milligen et *al.*, 1998). La réponse en IgE est biphasique, avec un pic à la 5<sup>ème</sup> et à la 9<sup>ème</sup> SAI. Celle des IgG1 montre un pic à la 5<sup>ème</sup> SAI et reste élevée par la suite, alors que la réponse en IgG2a augmente progressivement au cours des 10 premières SAI. De plus, la réponse en anticorps semble varier en fonction de l'organe lymphoïde étudié. En effet, après une infestation primaire, seuls les ganglions lymphatiques hépatiques semblent stimulés. Par contre, après la réinfestation, les ganglions lymphatiques mésentériques, les ganglions lymphatiques hépatiques et la rate deviennent réactionnels. En outre, Meeusen et Brandon (1994) ont noté que les isotypes d'anticorps sont variables selon les sites; au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques ils ont détecté des IgA, au niveau des ganglions lymphatiques hépatiques des IgE et enfin au niveau de la rate des IgM. Localement au niveau hépatique, on a montré une évolution bien différenciée des isotypes d'Igs en distinguant des anticorps d'apparition précoce (IgM, IgG2a, IgG2b et IgA), et des anticorps d'apparition plus tardive (IgG1, IgE, IgG2c) (Tliba et *al.*, 2000a).

Le mouton produit, durant son infestation, des anticorps qui sont majoritairement les isotypes d'IgG. Ces anticorps montrent un pic vers les 5<sup>ème</sup>-6<sup>ème</sup> SAI et restent élevés par la suite dans le sérum jusqu'à plusieurs semaines (Chauvin et *al.*, 1995). En revanche, Duffus et Franks, 1981 ; Clery et *al.*, 1996) ont observé une prédominance d'IgG1 par rapport d'IgG2 chez le bovin infesté. Le titre des IgG1 dans le sérum testé augmente entre la 8<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> SAI, puis il diminue progressivement par la suite.

## 6.2. Immunité à médiation cellulaire :

L'immunité à médiation cellulaire peut être générale, et elle est dans ce cas transitoire et présente dès la 2<sup>ème</sup> à la 5<sup>ème</sup> semaine post- infestation, ou locale en rapport avec les différents lieux de présence des douves évoluant dans l'organisme de l'hôte (Moreau et *al.*, 1997). Par ailleurs, l'ensemble des études sur la réponse cellulaire a été effectué au niveau périphérique (lymphocytes du sang périphérique, rate), sans qu'aucune étude ne se soit portée sur les lymphocytes hépatiques.

### 6.2.1. Les éosinophiles :

Au niveau de la circulation générale, il a été observé chez le rat une éosinophilie biphasique, avec développement d'un pic à la 3<sup>ème</sup> et à 9<sup>ème</sup> SAI. Chez les autres espèces hôtes, comme par exemple le mouton, le lapin et le bovin, les mêmes observations ont été notées (Furmaga et *al.*, 1975) ; (Furmaga et *al.*, 1983) et (Chauvin et *al.*, 1995). Ce profil biphasique peut être mis en parallèle avec les stades de migration parasites, le premier pic correspond à la migration des douves dans le parenchyme hépatique et le deuxième pic correspond à l'arrivée des douves dans les canaux biliaires. Cette augmentation des éosinophiles peut avoir plusieurs origines : i) les PESFh contiennent une fraction ayant une activité chimiotactique attirant les éosinophiles vers la douve (Horii et *al.*, 1986) ; ii) les PESFh contiennent une substance ( IL-5 Like) qui stimulerait la maturation des éosinophiles au niveau de la moelle osseuse (Milbourne et Howell, 1993) ; iii) les mastocytes libèrent des facteurs chimiotactiques pour sensibiliser les éosinophiles (ECF-A) après fixation d'anticorps anaphylactiques (Capron et *al.*, 1978).

### 6.2.2. Les lymphocytes :

La réponse lymphocytaire peut être mesurée par l'étude de la prolifération in vitro des leucocytes d'animaux infestés, cultivés en présence d'antigènes de douves (extrait total de douves ou de PESFh). Elle est précoce et transitoire et persiste de la 2<sup>ème</sup> à la 4<sup>ème</sup> semaine chez le rat (Poitou et *al.*, 1992) et jusqu'à la 5<sup>ème</sup> semaine chez les bovins (Oldham, 1985) et le mouton (Chauvin et *al.*, 1995).

La réponse proliférative des lymphocytes aux mitogènes (Concanaline A, Phytohémagglutinine) est généralement synchrone avec la réponse lymphocytaire antigène-spécifique. Cette réponse est variable d'une espèce à l'autre. Ainsi, Poitou et *al.*, (1992) ont

observé une activation précoce et transitoire de la réponse proliférative des splénocytes de rats infestés, à la 2<sup>ème</sup> SAI et à la 4<sup>ème</sup> SAI, qui diminue par la suite jusqu'à la 9<sup>ème</sup> SAI. De plus, selon les mêmes auteurs, les populations lymphocytaires de la rate n'ont pas montré de variation majeure durant l'infestation. En revanche, chez le mouton, la capacité des lymphocytes circulants à proliférer en présence de mitogènes est inhibée chez les animaux infestés dès la 1<sup>ère</sup> semaine (Zimmerman et *al.*, 1983 ; Chauvin et *al.*, 1995). Cette observation suggère que la réponse cellulaire est variable selon le niveau de sensibilité de l'hôte. De plus, le nombre de lymphocytes T périphériques (CD5+, CD4+ et CD8+) diminue à partir de la 3<sup>ème</sup> SAI pour revenir à la normale vers la 6<sup>ème</sup> SAI (Moreau, 1997). Chez le bovin, dans des expériences de déplétion *in vivo*, Mccole et *al.* (1999) ont montré que les lymphocytes CD4+ et CD8+ sont impliqués dans la réponse proliférative des PBL (peripheral blood lymphocytes), alors que les lymphocytes  $\gamma\delta$  ne semblent pas jouer un rôle.

### **6.2.3. Autres cellules immunitaires :**

Lors d'une infestation expérimentale, chez le rat, Poitou et *al.* (1992) ont observé par cryométrie de flux une augmentation du pourcentage des lymphocytes B spléniques entre la 3<sup>ème</sup> et la 5<sup>ème</sup> SAI, avec un pic à la 4<sup>ème</sup> SAI qui peut être corrélé chronologiquement avec la production des Igs. Cette augmentation se maintient jusqu'à la 6<sup>ème</sup> SAI, puis diminue pour revenir à la normale à la 8<sup>ème</sup> SAI. Ces mêmes auteurs n'ont cependant pas constaté aucune variation significative dans la cinétique de recrutement et d'activation des monocytes.

Chez les hôtes peu permissifs (le rat et le bovin), on a observé une forte infiltration de la muqueuse intestinale, le premier tissu traversé par le parasite, par des mastocytes et des éosinophiles. En outre, Davies et Goose (1981) ont montré que les douves immatures, excystées *in vitro* et implantées dans la cavité péritonéale de rats préalablement infestés, étaient couvertes par des cellules inflammatoires dans la minute qui suivait leur implantation. Ces cellules sont majoritairement des éosinophiles ; les autres cellules présentes sont des mastocytes, des neutrophiles et des macrophages.

### **6.3. Mécanismes effecteurs de l'immunité anti- *F. hepatica* :**

La survie du parasite au sein de l'hôte dépend directement de la balance entre les mécanismes effecteurs de l'immunité de l'hôte et les mécanismes d'échappement du parasite.

### 6.3.1. Destruction par les macrophages :

Durant l'infestation, les lymphocytes T reconnaissent les antigènes du parasite et prolifèrent, donnant naissance à une population de cellules T sensibilisées. Lors d'une deuxième présentation à l'antigène, ces cellules sécrètent des lymphokines (comme MAF ou MIF) qui agissent sur les macrophages. Ceux-ci peuvent alors participer à une réponse de type hypersensibilité retardée. Les macrophages ainsi activés par les lymphocytes T s'accumulent autour du parasite, libèrent des facteurs fibrogènes, en stimulant la formation de tissu granulomateux et finalement la fibrose qui résiste à l'action des spicules des douves matures qui ne peuvent ni prélever des nutriments, ni se reproduire car le milieu devient hostile aux douves qui s'éliminent progressivement (Moreau et al., 1997).

Par ailleurs, une destruction du parasite par des macrophages activés par l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) qui produisent du monoxyde d'azote (NO), à effet toxique pour le parasite, a été décrit dans le cas des schistosomes (Sher et al., 1982). Ce mécanisme a ensuite été investi pour *F. hepatica*. En effet, Spithill et al., (1997) ont démontré que les douves juvéniles sont détruites par un mécanisme de cytotoxicité des anticorps dépendant des macrophages activés qui est médié par le NO chez le rat. De plus, Sibille et al. (2001) ont montré, chez le rat infesté, une augmentation de la production du NO par les macrophages péritonéaux à la 7<sup>ème</sup> JAI. Ces derniers sont capables de détruire les douves juvéniles *in vitro*. Par contre, chez le mouton, Piedrafita et al. (1995) ont montré que le NO n'est pas le seul agent responsable de la destruction des douves juvéniles *in vitro*, et que l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) est capable de médier la destruction de ces dernières.

### 6.3.2. Cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante :

Les éosinophiles jouent un grand rôle dans l'immunité antiparasitaire. Ils sont attirés par certaines sécrétions des cellules T (ESP) et par les mastocytes et basophiles (ECF-A), qui en présence des anticorps présents à la surface du parasite permettent la fixation des éosinophiles par leur fragment FC. C'est ce qu'on appelle la réaction d'ADCC (Thoury, 1991).

Ce mécanisme d'ADCC permet la destruction du parasite après adhésion des cellules effectrices (macrophages, plaquettes ou éosinophiles) au parasite par l'intermédiaire d'IgG, d'IgE, d'IgA, et éventuellement du complément C3b. L'activation des éosinophiles provoque

la fusion des granules à la membrane cellulaire et la libération de substances toxiques pour le parasite (MBP, ECP, EPO), ainsi que des radicaux libres oxygénés ou nitrogénés (ROI) (Mcewen, 1992 ; Maizels et *al.*, 1993). En outre, Van Milligen et *al.* (1998) ont noté que les formes juvéniles de *F. hepatica*, durant leur migration à travers la sous muqueuse intestinale des rats immuns, étaient rapidement recouvertes par des anticorps d'isotypes IgG1 et IgG2a, et entourées par des éosinophiles. Ces auteurs suggèrent que les éosinophiles peuvent jouer un rôle important dans la destruction des parasites via un mécanisme d'ADCC (IgE, IgG1 et IgG2a) au niveau intestinal et probablement au niveau péritonéal.

Ces diverses études *in vitro*, ont conduit à émettre l'hypothèse qu'un mécanisme d'ADCC pourrait jouer un rôle dans la réponse immunitaire protectrice. Toutefois, *F. hepatica* possède un ensemble de mécanismes potentiels d'échappement à cette réaction.

#### **6.4. Mécanismes d'échappement du parasite du système immunitaire :**

Pour pouvoir survivre et se multiplier, les parasites doivent d'abord déjouer les résistances non spécifiques de l'hôte. Dans un deuxième stade, ils doivent lutter contre les effecteurs spécifiques développés par leurs propres déterminants antigéniques. Dans les deux cas, le parasite mis en jeu des facteurs intrinsèques qui lui permettent de détourner ou de bloquer l'attaque immunitaire, par différents mécanismes :

##### **6.4.1. Variation antigénique et renouvellement du glycocalyx (Fig. 14) :**

*F. hepatica* renouvelle en permanence ses antigènes de surface. En effet durant son développement, le parasite change la composition de son glycocalyx pour s'adapter aux changements de son environnement. Ainsi le glycocalyx des douves juvéniles contient des granules de type T0 puis produit ensuite des granules de type T1 après leur pénétration dans le parenchyme hépatique. Avant leur pénétration dans les canaux biliaires, les granules de type T1 cèdent la place aux granules de type T2. D'autre part, le parasite est pourvu d'un 'turnover' permanent et rapide au niveau du tégument, toutes les 3 heures (Hanna, 1980), ce qui empêche un contact suffisant entre le parasite et les éosinophiles pour permettre leur dégranulation, et par conséquent l'ADCC. D'autre part, la formation d'un précipité de complexes immuns à IgM (anticorps pour lesquels les éosinophiles ne possèdent pas de récepteurs) à la surface des douves immatures empêche les cellules effectrices d'adhérer au parasite (Hanna, 1980). Ainsi, Glauert et *al.* (1985) ont observé que les éosinophiles de bovin n'adhéraient aux douves que dans les zones du tégument libre de précipité de complexe immuns.

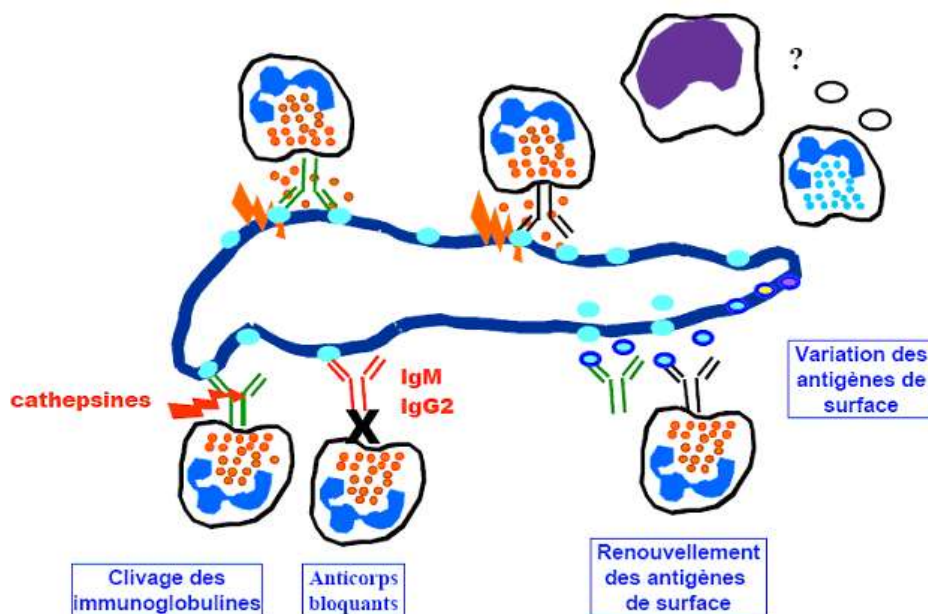


### 6.4.2. Clivages des immunoglobulines (Fig. 14):

Chapman et Mitchell (1982) ont mis en évidence dans les produits d'excrétions-sécrétions de *F. hepatica* (PESFh) des enzymes protéolytiques capables de cliver les Igs, ce qui empêche par conséquent l'attachement des cellules effectrices (les éosinophiles et les macrophages) au parasite. Les Cathepsines (L1 et L2) sécrétées par les cellules caecales de *F. hepatica* (Smith et al., 1993 ; Dowd et al., 1994) sont des cystéines protéases capables de cliver le CD23 (récepteur de faible affinité de l'IgE) à la surface des lymphocytes B, des éosinophiles, des cellules dendritiques folliculaires, des neutrophiles, des macrophages et des plaquettes (Hewitt et al., 1995). De plus, Carmona et al. (1993) ont montré in vitro que les cathepsines L inhibe l'attachement anticorps-dépendant des éosinophiles sur les Juvéniles; l'utilisation d'anticorps contre ces protéases lève cette inhibition (Smith et al., 1994). De plus, une autre cathepsine, la cathepsine B a été identifiée chez les Juvéniles et se révèle aussi capable de cliver les immunoglobulines (Wilson et al., 1998).

### 6.4.3. Anticorps bloquants (Fig. 14):

Au cours des schistosomoses chez le rat, il apparaît des anticorps bloquants incapables de permettre l'activation ou l'adhésion des éosinophiles sur les schistosomules. Ceux-ci sont des IgM (anticorps pour lesquels les éosinophiles ne possèdent pas de récepteurs) ou certains isotopes d'IgG (IgG2c) (Capron et al., 1987 ; Dunne et al., 1987). Pour *F. hepatica*, il a été mis en évidence que les douves en migration dans le parenchyme hépatique étaient couvertes d'IgM (Chauvin et Boulard, 1996 ; Tliba et al., 2000).



**Fig. 14** : Mécanismes d'échappement de *F. hepatica* (D'après Tliba, 2001).

#### 6.4.4. Inhibition du complément :

Les douves juvéniles montrent une forte résistance à la destruction par le complément. La présence d'acide sialique dans les composants du glycocalyx peut inhiber l'activation de la voie alterne du complément (Baeza et *al.*, 1994). De plus, quand les douves juvéniles sont incubées avec du sérum immun, aucune consommation du complément n'a été observée (Montgomery et *al.*, 1986).

### 7. Diagnostic et prévention de la fasciolose :

#### 7.1. Méthodes de diagnostic immunologique :

Les tests sérologiques constituent un moyen sûr et efficace de diagnostic et de détection précoce de l'infestation par *F. hepatica*. Ils sont souvent utilisés pour détecter les infections dues aux formes immatures où quand les matières fécales ne contiennent pas les œufs. La recherche des anticorps est réalisée avec les extraits antigéniques purifiés, les produits d'excrétion-sécrétion ou des coupes des vers à la congélation.

##### 7.1.1. Réaction de fixation du complément (RFC):

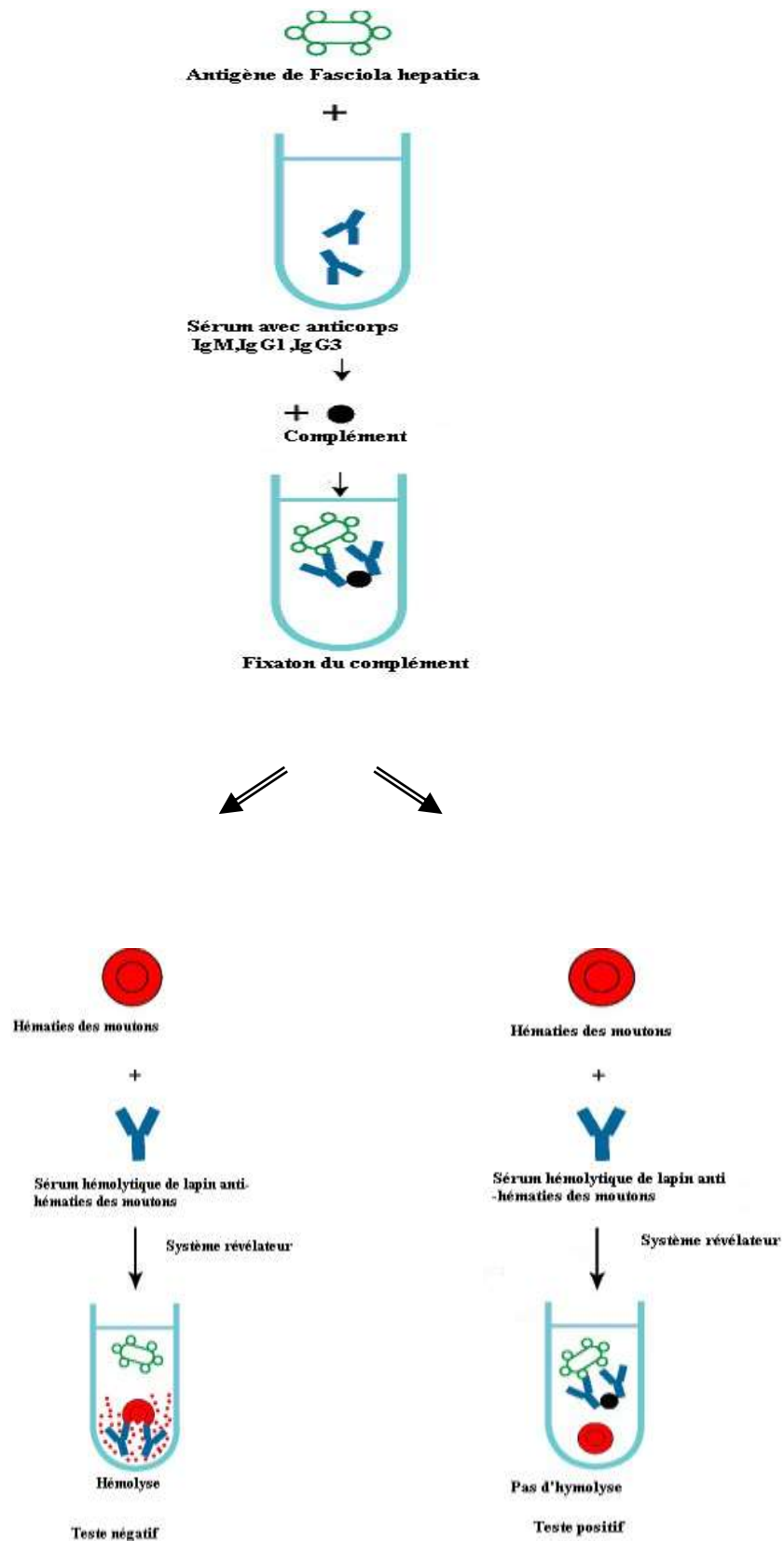
Dans cette réaction, le principe repose sur la mise en évidence quantitative d'anticorps, fixant le complément par interaction avec un antigène délipidé de *F. hepatica* (Fig. 15).

La réaction de fixation est effectuée en présence d'un système révélateur formé d'hématies de mouton, qui est ensuite ajouté pour but de rechercher la présence de complément qui reste libre après la première réaction.

La présence de complément libre signifie que le sérum examiné est exempt d'anticorps spécifiques. Dans le cas contraire, la réaction est considérée comme positive (Espinasse, 2006).

La sensibilité de la RFC (89%) est de la même grandeur que celle des autres tests sérologiques majeurs (immunofluorescence 92% et immunoélectrophorèse 96%).

La spécificité et la fiabilité du test ont été considérablement améliorées par la mise au point d'un antigène délipidé, par ailleurs, l'exécution demeure longue et délicate (Espinasse, 2006).



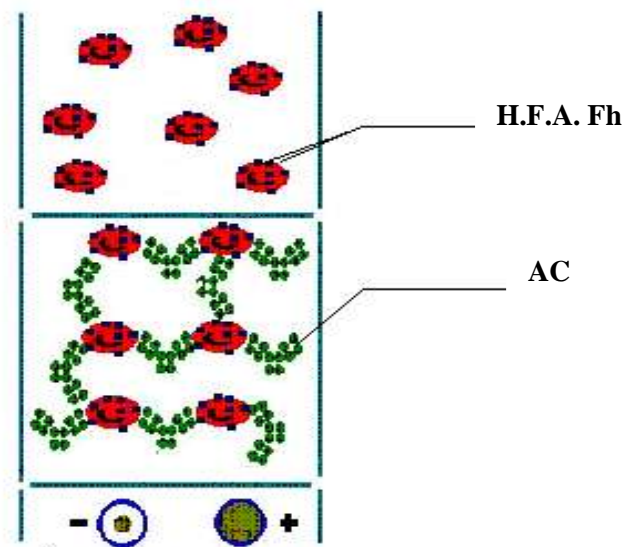
**Fig. 15** : Principe de la réaction de fixation du complément (D'après Bene et Faure, 1998).

### 7.1.2. Immunofluorescence indirecte (IFI) :

C'est une technique quantitative qui permet un diagnostic précoce, la réaction est positive dans 95% des cas en phase d'invasion, quelques semaines après l'infestation (presque 20 jours suivant l'infestation) (Giraudon *et al.*, 1997). L'IFI est réalisée sur des coupes à la congélation des douves adultes incluses dans un cylindre de muscle strié et déposées sur une lame.

### 7.1.3. Hémagglutination passive (HAP) (Fig. 16):

C'est aussi une technique quantitative permettant de poser un diagnostic précoce car elle détecte les IgM et IgG. L'hémagglutination est 90% positive pendant la phase d'invasion (Giraudon *et al.*, 1997). Cette technique est effectuée avec des globules rouges (groupe O, RH<sup>-</sup>) formolés et traités par le Glutaraldéhyde qui permet la fixation des extraits antigéniques délipidés (Pailler *et al.*, 1990; Giraudon *et al.*, 1997).



**Fig. 16:** principe d'hemagglutination indirecte (d'après Bene et Faure, 1998).

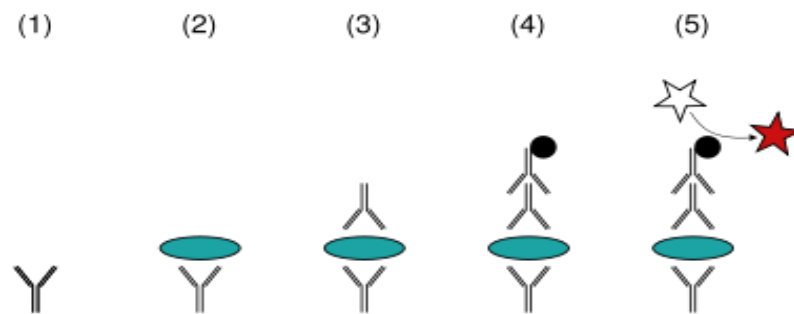
Ac : anticorps spécifique ;

HFA. Fh : Hématies fixées par les antigènes de *F. hepatica*.

### 7.1.4. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) : (Fig. 17)

La méthode ELISA permet la détection de l'apparition des premiers anticorps anti-Fasciola dès la 3<sup>ème</sup> semaine d'infestation, c'est-à-dire elle permet un dépistage précoce de la

Fasciolose (Diaw *et al.*, 1994). Elle est réalisée soit avec les produits d'excrétion-sécrétion soit avec l'antigène F2, comme elle peut être effectuée sur le sérum sanguin ou le lactosérum (Reichel *et al.*, 2005). Elle est cependant peu spécifique, on observe fréquemment des réactions croisées avec d'autres parasites (Hydatidose, Paragonimose et Schistosomose) (Diaw *et al.*, 1994).



**Fig. 17:** principe général de l'ELISA indirecte (9)

### 7.1.5. Electrosynérèse et immunoélectrophorèse :

L'électrosynérèse est une technique quantitative, réalisée avec des extraits antigéniques dépilidés, et permet de mettre en évidence un ou plusieurs arcs de précipitation. Les résultats sont positifs dans plus de 80% des cas (Giraudon *et al.*, 1997). L'immunoélectrophorèse est par contre une technique très spécifique mais peu sensible, les résultats sont positifs dans plus de 90% des cas, à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine d'infestation (Giraudon *et al.*, 1997). Cette technique analytique, dont le résultat positif révèle la présence de l'arc 2 spécifique de *F. hepatica*, est utilisée comme test de confirmation après d'autres tests immunologiques.

### 7.2. Prophylaxie médicale:

Deux types de prophylaxie sont envisagés : l'immunisation passive où l'on protège l'individu à l'aide de sérum immunitaire (protection homologique ou hétérologique), et l'immunisation active qui correspond à la vaccination (**Tableau 2**).

**Tableau 2:** Récapitulation des principales tentatives des vaccinations réalisées avec différentes préparations antigéniques (D'après Thoury, 1991).

Antigènes	Voie d'inoculation	Espèce	Protection	Auteurs
Douves immatures	Implantation Sous-cutané (SC)	Rat	+/-	Howell 1978
Douves adultes	Implantation SC	Rat	-	Howell 1978
Antigènes somatiques	Voie intrapéritonéale (IP)	Souris	+	Lang et Hall 1977-1978
		Bovin	+/- (Lésions hépatiques)	
Antigènes de douves adultes - CFA	Intramusculaire (IM) ou SC. 2 fois à 3 semaines	Rat	-	Hughes 1981
Douves adultes	IP	Rat	+	Oldham 1982
Douves juvéniles.	IP	Rat	+	
Extraits d'œufs ou de formes juvéniles	IM	Rat	+/-	Burden 1980

### 7.2.1. Vaccination à l'aide d'extraits somatiques et des produits métaboliques :

Des injections à la souris d'extraits somatiques de vers âgés de 16 jours, conduisent à une baisse importante de l'intensité parasitaire. D'autres essais de la vaccination à l'aide de produits métaboliques de la douve, chez le lapin, le rat et la souris ont échoué. Une résistance significative a été obtenue chez le rat par l'utilisation des excréctions- sécrétions des vers immatures. De plus une vaccination chez le rat par injection d'un complexe antigène-

anticorps dans l'adjuvant de Freund, a développé chez cet animal une résistance de 50 % (Tliba, 2001).

### 7.2.2. *Métacercaires irradiées* :

Les premiers essais de vaccination contre la fasciolose ont été réalisés avec des métacercaires irradiées. Mais les taux de protection obtenus sont variables selon le protocole de vaccination et les espèces vaccinées. Par exemple, une réduction de 70% de l'installation des douves a été observée chez le bovin vacciné 2 fois à 4 semaines d'intervalle (Tliba, 2001). Mais il faut noter des échecs très fréquents chez le mouton et la souris et des espèces reconnues comme permissives à *F. hepatica* (Beaza, 1992).

### 7.2.3. *La glutathione s-transférase (GST)* :

La GST a été mise en évidence chez *F. hepatica* au niveau des cellules parenchymateuses, dans les tissus périphériques et dans l'intestin. Aussi, des différentes études ont montré l'existence de GST de masse moléculaire comprise entre 23 et 26.5 KDa dans les broyats du parasite.

La vaccination par la GST, est le seul vaccin ayant vraiment fait de bonnes preuves dans l'induction d'une résistance partielle chez le mouton. Ce vaccin permet, chez les animaux traités, une anémie moins marquée, une altération de la migration larvaire et bien également une diminution de la charge parasitaire (Kenneth *et al.*, 1986).

### 7.2.4. *Fatty Acid Binding Protein (FABP)* :

La FABP est le premier antigène défini à avoir été testé dans la vaccination contre la fasciolose. Ce type de cible vaccinale offre l'avantage d'une protection croisée avec d'autres trématodes dont *Schistosoma mansoni*. Plusieurs isoformes de FABP (**Tableau 3**) ont été décrites et testées en vaccination chez *F. hepatica* qui donne des protections variables. La première est FhSmIII (M), qui est une FABP purifiée chez *Schistosoma mansoni* et donne une protection croisée avec *F. hepatica* (Tliba, 2001).

**Tableau 3:** La vaccination par les différentes isoformes de FABP (D'après Tliba, 2001).

Isoformes de FABP	Animal testé	Pourcentage de protection
FhSmIII(M)/ACF	Souris	69-78%
	Veaux	55%
rSm14/ACF	Souris	100%
rFh15-ACF	Lapin	Non significative
FABP3/DEAE	Bovin	0%

### 7.2.5. *La cathepsine L :*

Deux isoformes de la cathepsine L (CL1 et CL2) ont été testées et utilisées en tant qu'un antigène vaccinal. La vaccination des bovins par CL1 permet une réduction de la charge parasitaire (42.5%) et de la viabilité des œufs (40 à 65%). Par contre chez les moutons aucune diminution de la charge parasitaire n'est observée, malgré une réduction de la viabilité des œufs (Carnevale et *al.*, 2001).





## 1. Préparation de l'extrait brut de *F. hepatica*

### 1.1. Méthodes de préparation :

#### 1.1.1. Collecte des douves (photo 1):

Les douves utilisées pour la préparation des antigènes ont été prélevées à l'abattoir Seybouse (Juino) à Annaba, sur des foies de bovins et d'ovins saisis pour fasciolose. L'inspection des foies au niveau des abattoirs se fait par le vétérinaire et comporte deux phases :

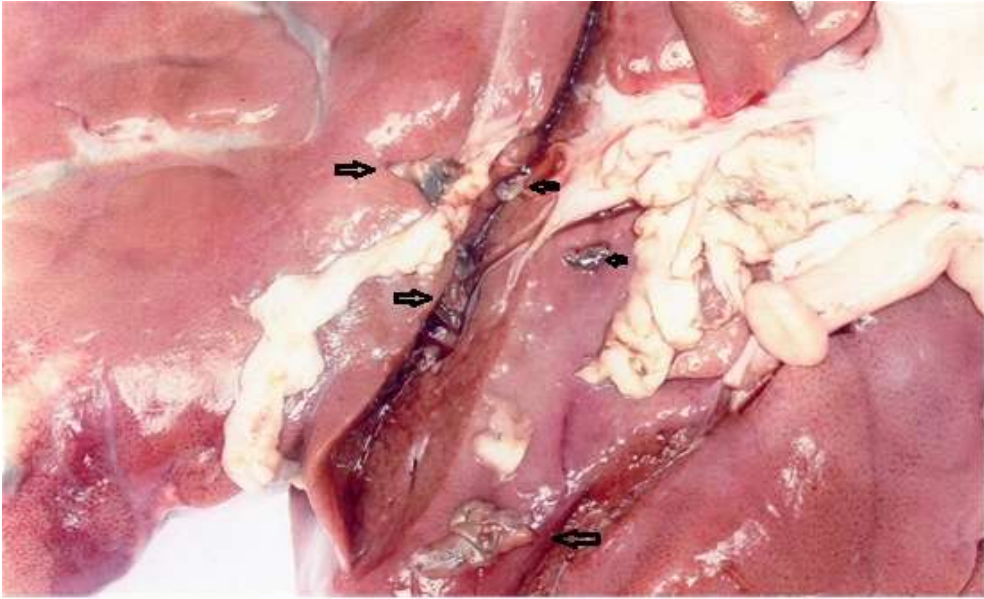
- L'examen visuel des deux faces du foie. Dans le cas de fasciolose, on peut observer une hypertrophie, des trajets fibrosés au niveau du parenchyme et un épaissement des canaux biliaires.

- La réalisation de deux incisions, une transversale et l'autre longitudinale. Ces deux incisions permettent la détection des douves 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. Les canaux incisés doivent être pressés très fort pour faire sortir le maximum de parasites.

#### 1.1.2. Lavage (photo 2) :

Une fois collectées, les douves sont mises à conserver dans un récipient contenant la solution tampon PBS, pH 7.2 en présence d'un antiseptique ( $\text{NaN}_3$  à 0.01%). Durant cette étape, on sélectionne rapidement les formes actives. Les parasites immatures ou sectionnés sont éliminés.

Les douves adultes et vivantes sont reprises, à l'état intact, pour subir une série de lavage. Elles sont replongées plusieurs fois dans une dizaine de boites de pétri remplies de tampon PBS, pH 7,2 et sont rincées soigneusement pendant 1h jusqu'à ce qu'on les débarrasse de toute trace de sang, de bile ou autres impuretés.



**Photo 1:** Foie de bovin parasité par *F. hepatica*.



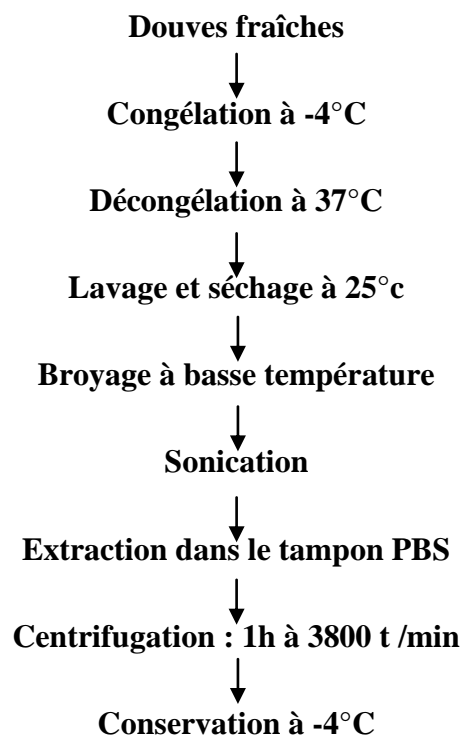
**Photo 2:** Lavage en série des douves de *F. hepatica*.

### 1.1.3. Obtention des produits de *F. hepatica*: (Fig. 18)

Plus de 60 douves ont été récoltées à l'abattoir. Elles sont congelées à  $-4^{\circ}\text{C}$  et décongelées à  $37^{\circ}\text{C}$  trois fois de suite de façon à fragiliser leurs parois.

Les douves décongelées sont rincées avec de l'eau distillée et séchées entre deux papiers filtre à l'air ambiant. Elles sont pesées et ajustées à 7g de poids sec. Par la suite, elles sont broyées dans un mixer à basse température et le broyat obtenu est ultra sonorisée à l'aide d'une sonde moyenne dans de la glace pilée pendant 60 secondes, à l'amplitude 4.

L'ultrasonat est ensuite homogénéisé au vortex avec un volume de 20 ml de tampon PBS, pH 7,2, 0,8 mM PMSF à raison de 2 ml/1g de douves, et l'ensemble est centrifugé pendant 40 min, à une vitesse de 3800 t/min. Le surnageant récupéré après centrifugation constitue notre antigène brut. Une fraction aliquote de celui-ci est prélevée pour dosage tandis que le reste est conservé dans des eppendorfs à  $-4^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.



**Fig. 18** : Protocole d'obtention des produits somatiques brut de *F. hepatica*.

## 1.2. Précipitation des protéines (photo 3) :

La précipitation des protéines est l'une des méthodes les plus anciennes, utilisée pour séparer différents types de protéines en fonction de leur degré de solubilité. Elle est le procédé par lequel l'addition d'un réactif (Sels neutres, Alcool, solvants organique, etc.) provoque le passage d'une protéine de l'état soluble à l'état insoluble.

### 1.2.1. *Précipitation des protéines par l'acétone pure:*

#### 1.2.1.1. *Principe :*

À température basse (0°C), un mélange de protéines peut être fractionné par addition progressive d'un volume de solvant organique neutre (Ex : Éthanol, Méthanol, Acide acétique, Acétone, Phénol etc.). Un solvant organique ajouté à une solution protéique aqueuse, entraîne une diminution du constant diélectrique, donc de la solubilité en déplaçant les molécules d'eau de zones hydratées des chaînes protéiques, ce qui induit de nouvelles interactions électrostatiques et formation d'un réseau ou agrégat protéique (Marouf, 2001-2002).

#### 1.2.1.2. *Méthode :*

- Ajouter à 1V de l'homogénat total contenant les protéines somatiques à 3V d'acétone (à 10 ml de protéines solubles, on ajoute 30 ml acétone) ;
- Laisser décanter le mélange (protéine-acétone) pendant 1h, à -4 °C pour former le précipité ;
- Centrifuger le mélange à 3800t/min pendant 45 min ;
- Mettre le culot des protéines à l'air ambiant pour éliminer l'acétone qui s'évapore rapidement.
- Dissoudre ensuite le culot dans le tampon PBS, pH 7,2 ; PMSF, NaN<sub>3</sub> 0,1%, à raison de 1V protéines/2V acétone.
- Enfin. Les protéines resolubilisées sont aliquotées et congelées à -4°C jusqu'à utilisation.

### 1.2.2. *précipitation des protéines au sulfate d'ammonium.*

#### 1.2.2.1. *Principe :*

La précipitation des protéines par adjonction des sels, appelée aussi précipitation par « salting-out », est la méthode de précipitation la plus largement utilisée. Le principe de la

précipitation 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 solvataion. 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 (Kamoun, 1977).

#### 1.2.2.2. Méthode :

La précipitation des protéines totale est réalisée à basse température (0°C) par addition directe d'un poids de sulfate d'ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (en g) correspondant au volume de la solution des protéines utilisées, et ce pour une forte saturation de sel (70% de saturation). La quantité de sulfate d'ammonium (en g) à ajouter à un litre de solution protéique pour atteindre le degré de saturation souhaité S<sub>2</sub> a été calculée selon l'équation suivante:

$$Q = \frac{515(S_2 - S_1)}{100 - (0,3 \times S_2)}$$

Q= Poids en g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à ajouter à 1000 ml de la solution protéique

S<sub>1</sub>= Concentration initiale de sulfate d'ammonium.

S<sub>2</sub>= Concentration finale à attendre de sulfate d'ammonium.

$$Q = \frac{515(70-0)}{100-(0,3 \times 70)} = 456 \text{ g}/1000 \text{ ml}$$

Pour un volume de 10 ml d'extrait somatique brut de *F. hepatica*, on a donc besoin de 4.56 g de sulfate d'ammonium pour provoquer la précipitation de la totalité des protéines.

La manipulation est pratiquée dans la glace pilée (à 0°C), par ajout de sulfate d'ammonium en quantités fractionnées, sous agitation rotatoire de la solution protéique. La suspension obtenue (protéines-sulfate) est incubée 1h à +4°C, centrifugée ensuite à 3000 t/min pendant 10 min pour former le culot. Ceci est repris avec un volume de tampon PBS, pH 7,2, NaN<sub>3</sub> 0,1%, égale à 2 fois son volume (1V culot/2V tampon). Le produit final est dosé, aliquoté et conservé à -4°C jusqu'à utilisation.



**Photo 3 :** Centrifugation des constituants protéiques de *F. hepatica* après précipitation.

### **1.3. Dosage des constituants de l'extrait brut :**

#### **1.3.1. Dosage de protéines totales :**

##### **1.3.1.1. Principe :**

La méthode de Biuret est une méthode colorimétrique, très employée pour l'analyse quantitative des protéines solubles. Elle est basée sur le développement d'une réaction colorée capable d'absorber les spectres visibles, à une longueur d'onde  $\lambda=540\text{nm}$ . Dans cette réaction, les ions cuivriques (provenant du sulfate de cuivre) forment avec les liaisons peptidiques un complexe de coloration bleu- violacée, en milieu alcalin (présence de NaOH). Le nombre de liaison peptidiques dans le complexe formé, et par conséquent la concentration en protéine détermine l'intensité de cette coloration. Cette intensité est mesurable en termes de densités optiques (DO) par le spectrophotomètre.

##### **1.3.1.2. Réactifs : (Voire Annexe 1).**

- Eau physiologique 9‰.
- Bovin sérum albumine (BSA)
- Solution de Biuret

**1.3.1.3. Procédure :**

- **Courbe d'étalonnage :**

À partir d'une solution mère de protéine étalon BSA (Bovin sérum albumine), à une concentration de 10mg/ml, on a réalisé une gamme de dilutions protéiques croissantes, distribuées sur cinq tubes contenant de 2 jusqu'à 10 mg de BSA. La réalisation des dosages est effectuée selon le tableau ci-dessous.

N° tube \ Volume	<i>Blanc</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
ÉtalondeBSA [10mg/ml]	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau physiologique (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Solution de biuret (ml)	4	4	4	4	4	4
Concentration des protéines (mg/ml)	0	2	4	6	8	10

- Ensuite, les tubes bien mélangés sont maintenus pendant 20 min, à l'obscurité jusqu'à le développement de la coloration.

- La lecture de l'absorbance, dans chaque tube, est réalisée en duplicata à l'aide du spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 540 nm. Les résultats des densités optiques (DO) des différentes dilutions de BSA sont regroupés dans l'annexe 2 (**Tableau a**). Voir également dans l'annexe 3 la courbe d'étalonnage :  $DO=F([C])$  (**Fig. a**).

**1.3.2. Dosage des carbohydrates totaux :**

Le dosage des carbohydrates totaux est effectué selon la méthode au phénol-acide sulfurique (Dubois M, 1956). La réaction est très sensible et peut être utilisée dans la détermination quantitative de microquantités de sucres simples, de polysaccharides et de leurs dérivés méthyles



**1.3.2.1. Principe :**

Le phénol, en présence de l'acide sulfurique concentré, se combine aux résidus carbohydratés déjà liés aux protéines par des liaisons covalentes. Il se forme un complexe de couleur jaune- orange dont l'intensité est fonction de la quantité du phénol fixée. Ce complexe absorbe la lumière visible, à une longueur d'onde de 490 nm.

**1.3.2.2. Réactifs :**

- Phénol 80%
- Acide sulfurique 95%

**1.3.2.3. Procédure :**

- **Courbe d'étalonnage :**

À partir d'une solution- mère de D- glucose à une concentration de 1mg/ml, une gamme de cinq dilutions a été réalisée selon le tableau ci-dessous.

N° tube Volume	Blanc	1	2	3	4	5
Étalon de D- glucose [1mg /ml]	0	200	400	600	800	1000
Eau distillée ( $\mu$ l)	1000	800	600	400	200	0
Phénol (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Acide sulfurique	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Concentration de D- glucose (mg/ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1

- Cette opération a été réalisée dans un milieu froid.
- On laisse réagir l'ensemble pendant 10 mn avec agitation puis l'on incube environ 15min, dans le bain-marie à 25-30°C.
- L'absorbance de la couleur caractéristique est mesurée au spectrophotomètre et les valeurs des DO obtenus sont représentées dans l'annexe 2 (**Tableau b**). La courbe d'étalonnage relative :  $DO=F([C])$  est représentée par la (**Fig. b**) (voir annexe 3).

**1.3.3. Dosage des lipides :**

Le dosage des lipides totaux est effectué selon la méthode de (Frings et Dunn, 1970).

**1.3.3.1. Principe :**

Le phospho-vanilline en présence de l'acide phosphorique et l'acide sulfurique se combine aux résidus lipidiques qui se trouvent liés aux protéines par des liaisons covalentes. Il se forme une couleur rose- violacée dont l'intensité est fonction de la quantité des acides fixés aux lipides.

**1.3.3.2. Réactifs : (Composition: annexe 1)**

- Vanilline (0.6g/100ml)
- Acide phosphorique
- Acide sulfurique
- Acide oléique (Étalon)

**1.3.3.3. Procédure :**

- **Courbe d'étalonnage :**

À partir d'une solution= mère d'acide oléique, à la concentration de 0.1 mg/ml, une gamme de cinq dilutions contenant de 20 à 100 µl d'échantillon a été réalisée selon le tableau ci-dessous:

(Cette opération doit être réalisée dans un milieu froid)

N° tube Volume	Blanc	1	2	3	4	5
Étalon d'acide oléique [0.1mg /ml]	0	200	400	600	800	1000
Phosphovanilline (ml)	10	10	10	10	10	10
Acide sulfurique (µl)	200	200	200	200	200	200
Concentration de D- glucose (mg/ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1

- Cette manipulation a été effectuée dans un milieu froid.
- Les réactifs sont bien mélangés au vortex, puis incubés, à 37 °C dans le bain-marie pendant 15min. On laisse refroidir pendant 5 min, jusqu'à ce que la réaction se produise.
- L'absorbance de la couleur caractéristique est mesurée au spectrophotomètre à 540 nm et les valeurs des DO obtenus sont représentées dans l'annexe 3 (**Tableau c**). La courbe d'étalonnage relative :  $DO=F([C])$  est représentée par la (**Fig. c**) (voir annexe 3).

## 2. Recherche d'activité enzymatique dans l'extrait brut de *F. hepatica* :

### 2.1. Effet caséinolytique:

#### 2.1.1. Réactifs utilisés (voir composition dans l'annexe 1):

- a. Tampon sodium acétate (pH 5,0).
- b. Tampon sodium phosphate (pH 7,5).
- c. Tampon Tris-HCl 0.5M (pH 9,0).

#### 2.1.2. Procédure :

- Trois types de Tampons ont été préalablement préparés, à différents pH. Il s'agit de :
  - Tampon sodium acétate (pH 5,0) ;
  - Tampon sodium phosphate (pH 7,5) ;
  - Tampon Tris-HCl 0,5 M (pH 9,0)
- La caséine est dissoute, à raison de 1% dans chaque tampon, de façon à préparer trois milieux homogènes mais de pH différents. Ensuite les solutions de caséine sont 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 (environ 10 µl) de l'extrait brut de *F. hepatica* sera déposé.
- Les boîtes sont incubées, dans l'étuve à 37 °C pendant 24 h. et le développement de la réaction positive (formation d'halot) est comparé à la boîte de pétri témoin.

## 2.2. Révélation d'activité enzymatique par électrophorèse SDS-PAGE (Photo 4):

L'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) est actuellement la technique la plus utilisée dans l'analyse des protéines. C'est une méthode simple, rapide et précise qui remplace actuellement la plupart des méthodes physique y compris la chromatographie pour la détermination du PM d'une protéine.

### 2.2.1. Principe :

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 s'effectue sur la base de la masse moléculaire.

### 2.2.2. Méthodes :

#### 2.2.2.1. Préparation des réactifs :

**Solution A** : Acrylamide / bis-Acrylamide.

Acrylamide.....30g  
Bis Acrylamide.....0,8g  
H<sub>2</sub>O dist., autoclavée.....100ml

**Solution B** : Tampon pour gel de concentration (Tris-Hcl 1M, pH 6,8)

Tris-base ... ..1,2g  
H<sub>2</sub>O .....15ml  
Hcl .....qsp..... pH 6,8  
H<sub>2</sub>O .....20ml

**Solution C** : Tampon pour gel de séparation (Tris-Hcl 3M, pH 8,8)

Tris-base .....7,32g  
H<sub>2</sub>O .....15ml  
Hcl .....qsp..... pH 8,8  
H<sub>2</sub>O.....qsp.....20ml

**Solution D:** Tampon de migration (Tris 0,025M, pH 8,3, Glycine 0,192 M, SDS 0,1%)

Tris-base .....	3,03g
Glycine.....	14,4g
SDS.....	1g
H <sub>2</sub> O .....	1000ml

#### 2.2.2.2. Préparation des gels :

- **Préparation du gel de concentration à 5% (stacking gel) :**

Acrylamide/ bis Acrylamide (Sol. A) .....	9,98 ml
Tris 1M-HCl, pH 8.6 (Sol. B).....	2,66 ml
H <sub>2</sub> O distillée, autoclavée.....	30 ml
SDS 10 % (Sol F) .....	400 µl
TEMED .....	40 µl
Persulfate d'ammonium (Sol G) .....	200 µl
Volume total.....	40 ml

- **Préparation du gel de séparation à 12 % (Running gel) :**

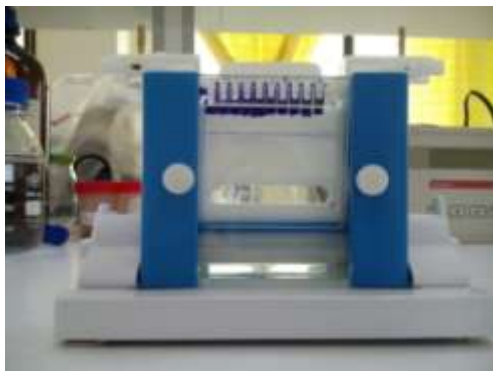
Acrylamide / bis Acrylamide (Sol A).....	41,6 ml
Tris 3M -HCL, pH 8.8 (Sol C) .....	14ml
H <sub>2</sub> O distillée, autoclavée.....	47 ml
SDS 10% (Sol F) .....	1040 µl
TEMED .....	120 µl
Persulfate d'ammonium (Sol. G).....	500 µl
Volume total .....	104 ml

#### 2.2.2.3. Préparation d'échantillon :

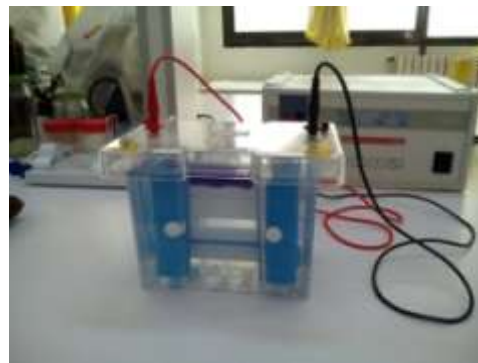
Les échantillons sont préalablement dénaturés à 100 °C pendant 5 min, dans le tampon du dépôt, en présence d'un réducteur ( $\beta$ -mercaptoéthanol) et un détergent ionique (SDS) (voir composition dans l'annexe).

**2.2.3. Procédure :**

- Le gel de polyacrylamide est coulé entre deux plaques de verre. L'épaisseur du gel entre les deux plaques est réglée par un espaceur en caoutchouc.
- Avant la polymérisation du gel, on insère un peigne en plastique entre les deux plaques. Dès que le gel devient solide, on retire doucement le peigne du gel. Ainsi, on réalise des pistes individuelles (puits) destinées à la migration de chaque échantillon.
- Chaque puits reçoit un échantillon de l'ordre de quelque  $\mu\text{l}$ , dont la concentration ne doit pas dépasser 100  $\mu\text{g}$ .
- Un courant électrique continu est appliqué dans la cuve d'électrophorèse contenant les solutions tampons maintenues en contact permanent avec la plaque du gel. La migration se fait verticalement (Du haut en bas) pendant des heures jusqu'à ce que le colorant indicateur atteigne l'extrémité inférieure du gel.
- La révélation des protéines séparées se fait par trempage du gel dans une solution colorante au bleu de coomassie R-250.
- La décoloration est réalisée par incubation du gel coloré dans un mélange de méthanol-Acide acétique.



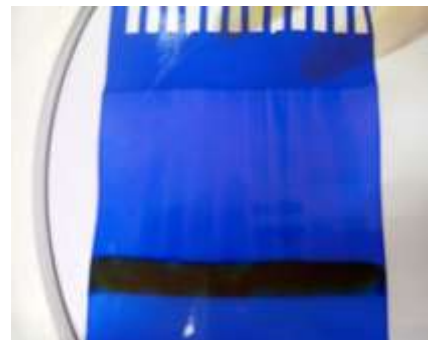
Dépôt des échantillons.



Début de la migration.



Coloration.

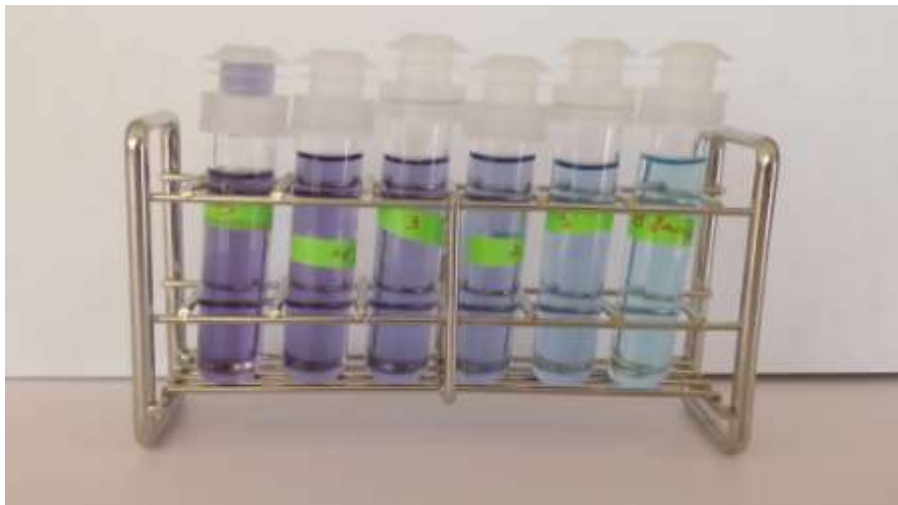


Décoloration.

**Photo 4:** Dispositifs utilisés en électrophorèse SDS-PAGE.

## 1. Résultats issus du dosage colorimétrique :

Le dosage biochimique des différentes substances biologiques est généralement basé sur le développement de réactions colorées dues à la combinaison des molécules avec le colorant utilisé. Dans ce type de dosage, dit colorimétrique, l'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration de la substance à doser. Au cours de notre pratique, les trois produits utilisés comme étalons ou standards (BSA, D-glucose et acide oléique) ont réagi avec leurs colorants spécifiques en donnant des colorations variables (**Photo 5, Photo 6 et Photo 7**), ce qui nous a permis d'établir pour chaque gamme d'étalonnages une courbe référentielle que l'on a ensuite utilisée pour la détermination de la concentration exacte de la substance analysée.



**Photo 5:** Gamme d'étalonnage de BSA (dilutions croissantes, de couleurs variables) utilisée pour le dosage des protéines totales dans les différents échantillons.



**Photo 6:** Gamme d'étalonnage de D- glucose (dilutions croissantes, de couleurs variables) utilisée pour le dosage des carbohydrates totaux dans les différents échantillons.



**Photo 7:** Gamme d'étalonnage d'acide oléique (dilutions croissantes, de couleurs variables) utilisée pour le dosage des protéines totales dans les différents échantillons.

Le dosage colorimétrique effectué dans ce travail pratique consiste à déterminer les concentrations ou les taux des divers constituants de *F. hepatica* (protéines, carbohydrates et lipides totaux) présents à l'état soluble dans trois préparations ou échantillons choisis. Il s'agit de l'extrait somatique brut de *F. hepatica*, l'extrait somatique traité avec l'acétone (précipité à



l'acétone) et l'extrait somatique traité avec le sulfate d'ammonium (précipité au sulfate d'ammonium).

L'ensemble des résultats relatifs aux dosages des différents composés contenus soit dans notre échantillon du départ (l'extrait brut de *F. hepatica*), soit dans les autres fractions issues de précipitation par l'acétone ou par le sulfate d'ammonium, sont représentés successivement dans les **tableaux (4) et (5)**: dans le tableau 4 sont récapitulées les valeurs densitométriques (DO) résultants de lectures spectrophotométriques des trois types d'échantillons testés. Dans le tableau 5 sont présentées, pour l'extrait brut et pour les deux formes de précipités, les concentrations correspondantes aux valeurs de D.O. précédemment indiquées.

**Tableau 4 :** Valeurs de densités optiques (DO) obtenus par dosages colorimétriques des différents échantillons.

Échantillons Constituants	Extrait brut	Précipité à l'Acétone	Précipité au Sulfate
les protéines	0,78	0,79	0,73
carbohydrates	0,16	0,33	0,46
les lipides	0,25	0,345	0,50

**Tableau 5 :** Résultats issus du dosage colorimétrique des principaux composants des différents échantillons testés (l'extrait brut et ses deux formes de précipités).

Échantillons Composés [mg/ml]	Extrait brut	Précipité à l'Acétone	Précipité au Sulfate
Protéines	19,4	18,6	17,2
Carbohydrates	13,2	13,0	12,6
Lipides	3,9	0,1	0,9

D'après les résultats démontrés dans le tableau 5, on constate que les protéines sont les constituants les plus abondants, puisqu'elles se présentent avec un taux très élevé dans le produit somatique de *F. hepatica* par comparaison aux autres composés (carbohydrates et lipides). Les carbohydrates existent aussi, à des concentrations importantes, et semble avoir un rôle prépondérant au sein de ce produit. Par contre, les composés lipidiques sont de faibles proportions. Dans la littérature, il a été rapporté que ces composés existent majoritairement, au niveau du parasite, soit sous forme de glycoprotéines ou de lipoprotéines impliquées éventuellement dans divers processus d'interactions 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 (Trudgett et *al.*, 2000).

D'autres études ont démontré que les protéines possèdent un pouvoir antigénique considérable et ils sont responsables de la virulence des formes larvaires de *F. hepatica* durant leur migration dans le tissu hépatique. Toutefois, les carbohydrates en général, en particulier les composés glycosylés, sont dépourvus d'activité immunologique, et il semble avoir à cet effet une faible sensibilité par rapport aux protéines (Gaudier et *al.*, 2012).

D'autre part, la précipitation par des solvants ou des sels, est un procédé analytique très recommandé pour la concentration des protéines présentes en faible quantités dans leurs solutions. Bien que cette technique comporte un risque potentiel de dénaturation, du fait de l'emploi de solutions salines concentrées ou des solvants très polaires, il parait, d'après les résultats mentionnés dans le tableau 5, que le protocole de travail mis en œuvre au cours de notre pratique a permis de précipiter l'extrait brut, soit par addition de sulfate d'ammonium ou d'acétone, sans qu'il y'ait de pertes significatives dans les produits somatiques de *F. hepatica*.

Il est à noter aussi que la précipitation favorise considérablement l'élimination des lipides qui pourraient avoir un effet contaminant sur les protéines et diminue, par conséquent leur pouvoir antigénique. En tenant compte de la faible proportion des lipides après précipitation de l'extrait par l'acétone (précipité à l'acétone), Il en ressort que l'acétone convient à la précipitation des protéines mieux que le sulfate d'ammonium.

## 2. Recherche d'activité enzymatique dans l'extrait brut de *F. hepatica* :

### 2.1. Effet caséinolytique:

Le stade adulte du parasite *F. hepatica* produit au moins cinq activités protéasiques, majoritairement de la famille des cystéines protéases. Certaines de ces protéases ont la capacité de dégrader les collagènes de type I, III et IV, la fibronectine et la laminine, ce qui faciliteraient la pénétration et la migration des parasites au travers de la paroi intestinale et au travers de la masse hépatique. D'autres protéases participeraient à la dégradation extracellulaire des protéines de l'hôte dont l'hémoglobine (Trap et Boireau 2000).

A la lumière de ces données bibliographiques, nous nous sommes amenés à tester l'effet caséinolytique de l'extrait somatique brut de *F. hepatica*, à différentes pH. Les résultats obtenus (**Photo 8**) indiquent clairement la formation d'halots dus à une lyse enzymatique qui s'est produit au niveau des milieux contenant le substrat caséine dissout dans le tampon sodium phosphate (pH 7,5) et dans le Tris (pH 9,0), et ce par comparaison au témoin (**Photo 9**). Cela signifie que cette activité ne peut être accomplie que dans un milieu neutre ou basic, alors qu'elle est impossible dans un pH acide.



**Photo 8:** Réaction caséinolytique de l'extrait brut de *F. hepatica* dans le tampon sodium phosphate (pH 7,5) et dans le Tris (pH 9,0). Réaction négative dans le tampon sodium acétate (pH 5,0).



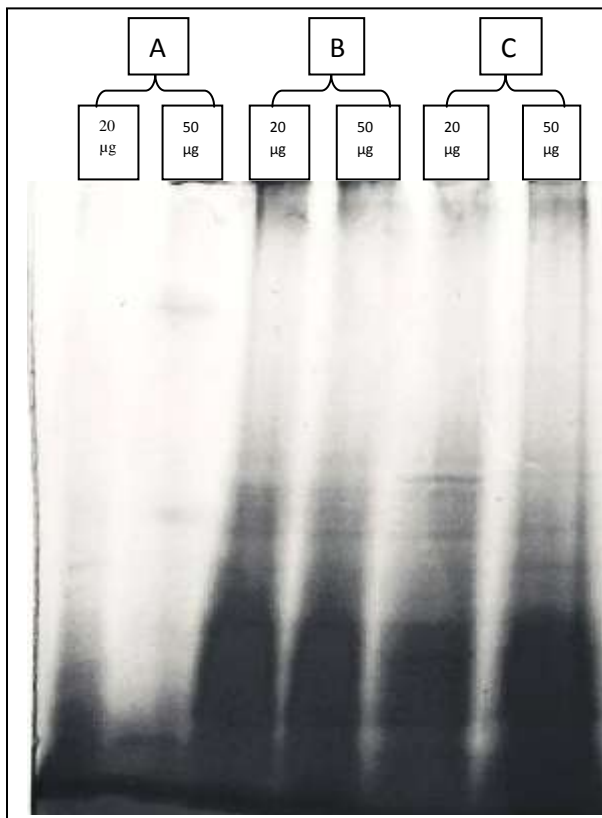
**Photo 9:** Boite de pétri témoin ne contenant que la caséine dissoute dans le tampon (Réaction négative).

## 2.2. Révélation d'activités enzymatiques par électrophorèse SDS-PAGE :

L'électrophorèse SDS-PAGE, a été réalisée dans les conditions dénaturantes, dans un double but : le dénombrement des sous- unités protéiques éventuellement présentes dans nos différents échantillons, et la mise en évidence d'activités hémoglobolytique et caséinolytique dans les profils électrophorétiques correspondants.

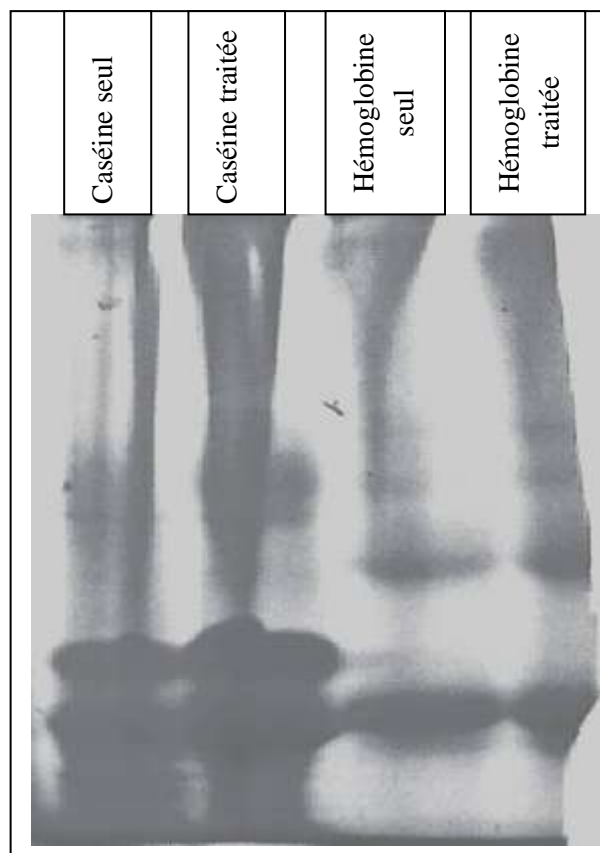
Dans la **figure 19** sont démontrés les profils électrophorétiques du produit brut de *F. hepatica* ainsi que ceux issus des deux précipités (précipité au sulfate d'ammonium et précipité à l'acétone). Les trois échantillons ont été analysés à deux concentrations différentes, ce qui a conduit à la visualisation de plusieurs bandes peptidiques, colorées par le Bleu de coomassie. D'après ce qui a été rapporté dans la littérature comme résultats électrophorétiques, les peptides d'origine somatiques les plus abondants sont des fractions peptidiques de PM compris entre 10-25, 30-35 et 60 à 90 KD, ainsi que quelques peptides de PM supérieurs, de l'ordre de 125 ,150 ,168 et 180 kD (Ruiz-Navarrete et *al.*, 1993).

La **figure 20** montre, quant à elle, une légère dégradation protéolytique au niveau de la caséine et de l'hémoglobine, en présence de l'extrait de *F. hepatica* contenant évidemment de protéases ayant un effet lytique sur les deux substrats, par déduction des sous-fractions supplémentaires apparues dans les profils d'hémoglobine et de caséine après incubation de chacun des substrats avec l'extrait brut de *F. hepatica*.



**Fig. 19** : Profils d'électrophorèse SDS-PAGE réalisée sur les différents échantillons, à des concentrations indiquées.

- (A) Extrait brut de *F. hepatica*
- (B) Précipité à l'acétone
- (C) Précipité au sulfate d'ammonium



**Fig. 20**: Révélation d'activité protéolytique de l'extrait brut sur deux substrats de *F. hepatica* analysés par SDS-PAGE, à concentration fixe (20µl).

## CONCLUSION

La fasciolose ou distomatose hépato- biliaire est une parasitose cosmopolite que l'on peut rencontrer dans les zones tempérées, à travers le monde entier. Elle existe également dans le territoire algérien et affecte la production ovine et bovine en occasionnant des grandes pertes dans les élevages.

*F. hepatica*, en raison de sa structure protéique très complexe, exprime en contact du système immunitaire de l'animal hôte un nombre variable de substance dont la composition biochimique est tellement diversifiée. Ces substances synthétisées dans les cellules somatiques du parasite, puis excrétés-sécrétés dans les tissus de l'hôte agissent efficacement vis-à-vis des cellules immunitaires comme étant des antigènes circulants par différents mécanismes, en permettant la protection et/ou l'échappement du parasite vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte. D'autres substances ayant des activités enzymatiques, exercent un effet protéasique, ce qui leur permet de jouer un rôle critique dans la virulence des pathogènes, et interviennent à différents niveaux de l'interaction hôte-parasite. En plus, elles facilitent la pénétration du parasite au sein de l'hôte et y assure sa nutrition.

Les techniques biochimiques occupent une place prépondérante dans le domaine de l'immuno-parasitologie, puisqu'elles permettent l'amélioration des conditions d'isolement et de caractérisation des antigènes d'origine parasitaire, ce qui conduit à l'obtention de produits antigéniques purs pouvant être employés dans les différentes applications pratiques, en particulier comme réactifs antigéniques dans les tests de diagnostic sérologique de la maladie. Ainsi, la méthodologie suivie au cours de nos démarches pratiques, et les protocoles que nous avons suivi pour préparer et isoler les composants biochimiques de *F. hepatica*, nous ont permis en un temps record, d'avoir relativement de bons résultats. L'obtention, en quantités satisfaisantes d'échantillons ou de préparations de composition hétérogène (protéines, carbohydrates et lipides), avec des taux satisfaisants que l'on a estimé par dosage colorimétrique, est la preuve sûre d'une bonne adaptation de ces méthodes analytiques, souvent

considérées classiques, et de leur performance à traiter, purifier ou caractériser des molécules d'intérêt biologique.

Les produits extraits à l'état brut sont généralement des substances très sensibles, qui peuvent facilement être altérées en présence d'enzymes protéolytiques produites par les différents stades parasitaires dans leurs milieux de culture. Cependant, l'emploi dans notre cas, d'un milieu de culture tamponné, en présence d'antiseptique (Azide de sodium  $\text{NaN}_3$ ) et d'anti-protéase (PMSF), nous a facilité le traitement et le maintien des douves vivantes, à l'air ambiant, pour une période assez longue, ce qui a conduit à la récolte de produits antigéniques bruts dans des conditions aseptiques sans qu'il se produise de décomposition ou de dénaturation au niveau de leur structure moléculaire.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abdel-Rahman S., K.L. O'reilly et J.B. Malone (1999).** Biochemical characterization and localization of *Fasciola hepatica* 26-28 kDa diagnostic coproantigen. Parasite Immunology, 1999: 21:279–286.
- **Achi Y.L. (1990).** Contribution à l'étude de la fasciolose bovine au Nord de la Côte-d'Ivoire. Résultats d'enquêtes réalisées dans les abattoirs. Thèse de Docteur vétérinaire. École nationale vétérinaire de Toulouse. 125 pages.
- **Aissi M., K.H. Harhoura, S. Gaid et B. Hamrioui (2009).** Étude préliminaire sur la prévalence de la fasciolose due à *Fasciola hepatica* dans quelques élevages bovins du Nord centre algérien (la Mitidja). Bull Soc Pathol Exot, 102, 3, pp:177-178.
- **Agnamey P., E. Fortes-Lopes, C.P. Raccurt, J. Boncy et A. Totet (2012).** Cross-sectional serological survey of human fascioliasis in Haiti. Journal of Parasitology Research. Volume 2012, Article ID 751951. 3 pages, doi :10.1155/2012/751951.
- **Andriamanantena D., P. Rey, L. Perret et F. Klotz (2005).** Distomatoses , EMC - Maladies Infectieuses, Volume 2, Issue 2, pp : 105-118.
- **Ashrafi K., M.D. Bargues, S. O'Neill, S.Mas-Coma (2014).** Fascioliasis: A worldwide parasitic disease of importance in travel medicine. Travel Medicine and Infectious Disease, Volume 12, Issue 6, Part A, November–December, pp : 636-649.
- **Baeza E., I. Poitou, C. Villejoubert et C. Boulard (1994).** Complement depletion in rats infected with *Fasciola hepatica*: in vivo and in vitro studies. Vet Parasitol.51: 219-230.
- **Beaumone A. et P.Cassier (1981).** Biologie animale des protozoaires aux métazoaires épithélienneuriens. Tome I. édition,3, Paris,France.459 p.
- **Belkaid M., N. Zenaidi, B. Hamrioui, O. Tabet Derraz et A. Chellali (1992).** Cours de Parasitologie, Helminthiases, Tome II, Office des Publications Universitaires. 212 pages.
- **Bene et Faure (1998).** Les techniques utilisées en immunologie, partie 2. Compte rendu de stage d'immunologie. Laboratoire d'immunologie. Formation continuée NANCY-



METZ.<http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/SVT/ressour/rescien/immuno/immsomm.htm>

- **Biguet J., A. Capron et V.K.P. Tran. (1962).** Les antigènes de *Fasciola hepatica*. Etude électrophorétique. Identification des fractions et compaaison avec les antigènes correspondant à sept autres helminthes. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 37, 221-231.
- **Bossaert K., J.M. Martin-Alonso, A.D. Ruiz De Eguino, R. Casais, M.S. Marin, J.A. Boga, B. Losson et F. Parra (2000).** Identification et caractérisation partielle d'un gène de *Fasciola hepatica* d'intérêt diagnostique potentiel. Ann. Med. Vet. 144 :161-168.
- **Bouree P., F. Bisaro et P. Resende (2011).**Diagnostic et traitement des distomatoses. Les entretiens de Bichat, pp : 202-204. [http://www.lesentretiensdebichat.com/Media/publications/medecine\\_202\\_204\\_wmk.pdf](http://www.lesentretiensdebichat.com/Media/publications/medecine_202_204_wmk.pdf)
- **Bouree P. et M. Thiebault (1993).** Fasciolose à *Fasciola hepatica* en Basse- Normandie de 1980 à 1990. Bull. Soc. Fr. Parasitol. 11: 79-82.
- **Bussiéras J. et R. Chermette, (1988).** Abrégé de parasitologie vétérinaire, Fascicule III : Helminthologie. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, service de parasitologie, Paris, 267 p.
- **Capron M., A. Capron, G. Torpier, H. Bazin, D. Bout et M. Joseph (1978).**Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of Igg2a antibody and role of mast cells. Eur J Immunol. 8: 127-133.
- **Capron A., J.P. Dessaint, M. Capron, J.H. Ouma et A.E. Butterworth (1987).** Immunity to schistosomes: Progress Toward Vaccine. Science.238: 1065-1072.
- **Carmona C., A.J. Dowd, A.M. Smith et J.P. Dalton (1993).**Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. Mol Biochem Parasitol.62: 9-17.
- **Carnevale S., M.I. Rodríguez, E.A. Guarnera, C. Carmona, T. Tanos, S.O. Angel (2001).** Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cystein

proteinase. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. Volume 41, Issues 1–2, September–October 2001, Pages 43–49.

- **Chapman C.B. et G.F. Mitchell (1982).**Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola Hepatica*. Vet Parasitol. 11: 165-178.
- **Chauvin A., G. Bouvet et C. Boulard (1995).**Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. Int J Parasitol.25: 1227-1241.
- **Chauvin A. et C. Boulard (1996).**Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. Parasite.3: 209-215.
- **Clery D., P. Torgerson et G. Mulcahy (1996).**Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola Hepatica* [Published Erratum Appears In Vet. Parasitol 1996 Oct 15;65(1- 2):169]. Vet Parasitol. 62: 71-82.
- **Corvo I., M. Cancela, M. Cappetta, N. Pi-Denis, J. F. Tort et L.Roche (2009).**The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile *Fasciola hepatica* prefers proline in the subsite and can cleave collagen , Molecular Biochemical Parasitology ,167 :41–47.
- **Dalton J. P. et P. Joyce (1987).**Caractérisation of surface glycoproteins and proteins of différent développemental stages of *Fasciola Hepaticaby* surface radiolabelling. Journal Para :73, 1281-1284.
- **Davies C. et J. Goose (1981).**Killing of newly excysted juveniles of *Fasciola hepatica* in sensitized rats. Parasite Immunol.3: 81-96.
- **Dar Y. (2004).**Génération rédiennes de *Fasciola gigantica* (Digenea) et productivité cercarienne chez deux espèces de *lymnaeidae* (Mollusca). These de Doctorat en Parasitologie, Université de Limoges. 490 pages.
- **Dargie J.D. (1987).** The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep. Int J Parasitol., 17(2), pp: 453-463.

- **Daynes P. et A. Bouchet (1972).**La Distomatose des ruminants à *Fasciola Gigantica*. Terre Malgache, 14, pp : 123-150. [http://madarevues.recherches.gov.mg/IMG/pdf/terre-mg14\\_8\\_.pdf](http://madarevues.recherches.gov.mg/IMG/pdf/terre-mg14_8_.pdf)
- **DiawO.T, M.M. Seye, M. Seye, Y. Sarr et G. Vassiliadès (1994).** Immunodiagnosis of *Fasciola gigantica* fascioliasis by elisa technique in senegal. preliminary observations in 2 lambs.Rev Elev Med Vet Pays Trop. 1994;47(3):291-4.
- **Donnadieu D.J. (2001).**Traitement et prévention de la fasciolose à *Fasciola hepatica* en élevage bovin laitier. Essai d'un protocole utilisant le closantel et l'oxyclozanide. Thèse de Docteur Vétérinaire, 61 pages.
- **Dorchies P., J. Ducos De Lahitte, L. J. Pangui, J. P. Alzieu et H. Bichet (1988).** Etude des parasites hépatiques des bovins : *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium lanceolatum*, *Linguatula denticulata*. Recherche sur les foies saisis en abattoir. Incidences thérapeutiques. 15 th World Buiatries Congress, Ed, Leon. (Espagne).
- **Dowd A.J., A.M. Smith, S. Mcgonigle et J.P. Dalton (1994).**Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola Hepatica*. Eur J Biochem. 223: 91-98.
- **Doy T.G., d.L. Hughes, E. Harness (1981).**The heterologous protection of rats against a challenge infection with *Fasciola hepaticaby* prior infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* : Para.Immuno.3171-180.
- **Dubois M., K. Gilesa, P.A. Hamilton et F. Smith (1956).** Coloremimetric method for determination of sugars and related sustances. Analyt Chem. 28 : 350-356.
- **Duffus W.P. et D. Franks (1981).** The interaction in vitro between bovine immunoglobulin and juvenile *Fasciola hepatica*. Parasitology.82: 1-10.
- **DunneD. W., Q. D. Bickle, A. E. Butterworth et B. A. Richardson (1987).**The blocking of human antibody-dependent, eosinophil-mediated killing of *Schistosoma mansoni schistosomulaby* monoclonal antibodies which cross-react with a polysaccharide containing egg antigen. Parasitology.94: 269-280.
- **Duong Quang T., T. Hai Duong, D. Richard-Lenoble, P. Odermatt et K. Khammanivong (2008).** Émergence chez l'homme de fasciolose à *Fasciola gigantica* et

de distomatose intestinale à *Fasciolopsis buski* au Laos. Cahiers Santé, vol. 18, n° 3, juillet-août-septembre : 12-15.

- **El Azazy O.M.E. et T.W. Shillhorn Van Veen (1985).** The effect of pre-exposure to *Fasciola hepatica* or *Schistosoma mansionion* challenge infection with *Fasciola hepatica* Vet.Para.17(2),173-176.
- **Euzéby J.(1971).** Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine. Tome II, Livre 1 : Distomatoses hépato-biliaires . Vigot frères éditeur, Paris, France, 798 pages.
- **Euzéby J. 1998.** Parasite des viandes: épidémiologie physiologie incidence zoonotique. Lavoisier Tec et doc, Paris.324-335p.
- **Espinasse C. (2006).** Diagnostic sérologique de la fasciolose bovine. Intérêt de la méthode Elisa pourquier en troupeaux allaitants. Thèse de Doctorat, E.N.V. ALFORT, France, 138p.
- **Espino A. M. et B.E.Dumenigo (2003).**Internationa handbook of foodborne pathogens :*Fasciola hepatica*. Mared Dekker, Inc. 539 pages.
- **Espino A.M., T. Gomez, B. Dumenigo et B. Badel (1986).** Separation of *Fasciola hepatica* antigens by gel chromatography. Rev, Cubana Med. Trop. 38 (2), 151-158.
- **FAO (2004).** Animal production and health : Good practices for the meat industry. Editional production and design group. Publishing Management Service. 41pages.
- **Fourie C., C. Ferra, P. Médori, J. Dévaux et J. L. Hemptinne (2012).** Ecolgie : Approche scientifique et pratique. 6<sup>ème</sup> édition, Lavoisier. 266 pages.
- **Fried B. et T. K.Graczyk (1997).** Advances in : Trematode Biology. Edition de CRC Press I.I.C. P. 447.
- **Frings C.S. et R.T.A. Dunn (1970).** Colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-vanilin reaction. Amer. J. Clin. Pathol. 53, 89.
- **Furmaga S., J.L. Gundlach et K. Sobieszewski (1975).**White cell system changes in the course of eperimental fasciolasis in rabbit and sheep. Acta Parasitol. Pol.23: 159-175.

- **Furmaga A., J.L. Gundlach et M. Uchacz (1983).**Experimental studies on cattle susceptibility to *Fasciola hepatica* (trematoda) superinfection. Acta. Parasitolo. Pol.28: 305-319.
- **Gaasenbeek, C. P., H. J. Over, N. Noorman et W. A. De Leeuw (1992).**An epidemiological study of *Fasciola hepatica* in the netherlands [published erratum appears in vet q 1993 mar;15(1):40]. Vet Q.14: 140-144.
- **Gaudier J.F., K. Caban-Hernandez, A. Osuna and A.M. Espino, (2012).** Biochemical characterization and differential expression of a 16,5- Kilodalton tegument-associated antigen from the liver fluke *Fasciola hepatica*. Clin. Vaccine Immunol., Mar., 19(3). 325-333.
- **Gimard G. (2001).** Fasciolose bovine. Enquête épidémiologique en abattoir et évaluation de la sensibilité des testes sérologiques. Thèse Doctorat d'état. Th n°114, E.N.V. Nantes, 96p.
- **Giraudon P., S. Buart, A. Bernard, M.F. Belin (1997).** Cytokines secreted by glial cells infected with htlv-i modulate the expression of matrix metalloproteinases (mmps) and their natural inhibitor (timps): possible involvement in neurodegenerative processes. Mol Psychiatry. 1997 Mar;2(2):107-10, 84.
- **Glauert A.M., D.A. Lammas et W.P. Duffus (1985).** Ultrastructural observations on the interaction in vitro between bovine eosinophils and juvenile *Fasciola hepatica*. Parasitology. 91: 459-470.
- **Golvan Y.J et T. P. Ambroise (1987).** Les nouvelles techniques en parasitologie. Chapitre xii : fasciolose. Autres distomatoses. Flammarion médecine science. 2<sup>ème</sup> Edition. 112p.
- **Guillaume V. (2007).** Parasitologie : fiche pratique, auto-évolution, manipulation. Edition de Boek Université. 111 pages.
- **Hammami H., et A. Ayadi (1999).** Écologie de *Lymnaea truncatula* Müller, hôte intermédiaire de *Fasciola hepatica* Linné dans le microclimat de Tozeur, sud-ouest, Tunisie. Parasitologie, manuscrit n° 2047.

- **Hanna R.E. (1980).***Fasciola Hepatica*: glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Exp Parasitol*.50: 103-114.
- **Hewitt C.R., A.P. Brown, B.J. Hart et D.I. Pritchard (1995).** A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin e network by selectively cleaving cd23: innate protection by antiproteases. *J Exp Med*. 182: 1537-1544.
- **Horii Y., K. Fujita et M. Owhashi (1986).**Partial purification and characterization of eosinophil chemotactic factors from soluble extract of *Fasciola Species*. *Am J Vet Res*.47: 123-126.
- **Irwin J.A, P. E. W. Morrissey, P. Jraya, A. Walshe, S. M. O'neil, S. D. Carrington, E. Matthews, E. Fitzpatrick, G. Mulcahy, A. P. Corfield et J. P. Dalton (2004).**Cambridge university glycosidase activity in the excretory-secretory products of the fluke, *Fasciola hepatica*. Cambridge University Press Printed In The United Kingdom.*Parasitology*.129 ,465-472.
- **Kamoun P. (1977).** Appareils et méthodes en Biochimie. Flammarion Medecines Sciences. 2<sup>ème</sup> édition. 205 pages.
- **Kaplan R.M. (2001).** *Fasciola hepatica*: A Review of the economic impact in cattle and considerations for control. *Veterinary Therapeutics*. Vol. 2, N° 1. pp : 40-50.
- Karahocagil, M.K., Akdeniz, H., Sunnetcioglu, M., Cicek, M., Meter, R., Akman, N., Ceylan, E., Karsen, H. et Yapici, k. 2011. A familial outbreak of fascioliasis in Eastern Anatolia: a report with review of literature.*Acta Trop*. Jun. **118**(3): 177-83. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.08.013. Epub 2008 Sep 21.
- **Kenneth et M.C. Peter (1986).** Immunodiagnosis of parasitic diseases (Fascioliasis, paragonimiasis, clonorchiasis, and Opisthorchiasis). *Helminthinc diseases edit*.Vol.(1), 39-68.
- **Knubben-Schweizer G. et P.R. Torgerson (2015).** Bovine fasciolosis : Control strategies based on the location of *Galba truncatula* habitats on farms. *Vet Parasitol*.**208**(1-2): 77-83. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.12.019. Epub 2014 Dec 24.
- **Korach S. et J. Benex (1966).** Alipoprotein antigen in *Fasciola hepatica*. I. Isolation, physical and chemical data. *Exp. Parasitol*. 19, 193-198.

- **Lariviere M., B. Beauvais, F. Derouin, F. Traore (1987).** Parasitologie médicale. Edition Marketing, Paris, France, p.256
- Lehner, R.P. et Swell, M.H. 1980. A study of the antigens produced by adulte *Fasciola hepatica* maintained in vitro. parasite Immunol. **2**: 99-109.
- **Leuckart K. (1881).** Zur entwicklungsgeschichte des leberegels. Zoologischer Anzeiger, 4, pp: 641-646 (English translation in Kean, Mott and Russel, 1978, Volume 2, 568-5700.
- **Levieux D., A. Levieux et A. Venien (1992).** An improved passive hemagglutination test for the serological diagnosis of bovine fosciosis using the specific antigen F2. Vet. Parasitol. 42, 53-66.
- **Mage C. (1990).** Conséquences zootechniques de l'infestation naturelle par *Fasciola hepatica* chez des tourillons limousins. Rev. Méd. Vét., 141. pp : 205-208.
- **Maggioli G., L. Piacenza, B. Carambula et C. Carmona (2004).**Purification, characterization, and immunolocalization of a thioredoxinreductase from adult*Fasciola hepatica*. J. Parasitol.,90(2), 2004, pp. 205–211.
- **Maizels R.M., D.A. Bundy, M.E. Selkirk, D.F. Smith et R.M. Anderson (1993).** Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. Nature. 365: 797-805.
- **Marouf A. (2001-2002).** Analyse instrumentale à l'usage des biologistes : Edition DAR EL GHARB. 2<sup>ème</sup> édition. 276 pages.
- **Mccole D.F., M.L. Doherty, A.W. Baird, W.C. Davies, K. McGill Et P.R. Torgerson (1999).**T cell subset involvement in immune responses to *Fasciola hepatica*infection in cattle. Parasite Immunology. 21: 1-8.
- **Mcewen B.J. (1992).** Eosinophils: A Review. Vet Res Commun.16: 11-44.
- **Mcgonigle S. et J.P. Dalton (1995).** Isolation of *Fasciola hepatica* haemoglobin. Cambridge Univ,Press.111,209-215.
- **Meeusen E. et M. Brandon (1994).** The use of antibody-secreting cell probes to reveal

tissue-restricted immune responses during infection. Eur J Immunol.24: 469-474.

- **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, Université Mentouri, Constantine, Algérie. 299 pages.
- Mekroud, A., Benakhla, A., Vignoles, P., Rondelaud, D. et Dreyfuss G. 2004. Preliminary studies on the prevalences of natural fasciolosis in cattle, sheep, and the host snail (*Galba truncatula*) in northeastern Algeria. Parasitol. Res. **92**: 502-505.
- **Mekroud A., A. Titi, A. Benakhla, P. Vignoles et D.Rondelaud (2006).** *Fasciola hepatica*, sensibilité des *Galba truncatula* du Nord-est algérien à l'infestation expérimentale avec des miracidiums sympatriques. Revue Méd. Vét., 157, 10: 494-501.
- **Milbourne E.A. et M.J. Howell (1993).**Eosinophil differentiation in response to *Fasciola hepatica*and its excretory/secretory antigens. Int J Parasitol. 23: 1005-1009.
- **Montgomery T. D., R. W. Leid et R. B. Wescott (1986).**Interaction of bovine complement with *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol.19: 55-65.
- **Moreau E., A. Chauvin et C. Boulard (1997).**Interaction hôte-parasite au cours de la fasciolose a *Fasciola hepatica*.Le Point Vétérinaire, Numéro Spécial, "Parasitologie Des Ruminants".28, 1827-1834.
- **Mornet P. (1972).** Les maladies animales et leurs incidences sur l'économie agricole. Revue périodique : l'inventaire permanent des richesses et des virtualités françaises, pp : 234-235.
- **Oldham G. (1985).**Immune responses in rats and cattle to primary infections with *Fasciola hepatica*. Res Vet Sci.39: 357-363.
- **Ollerenshaw, C.B., (1971).**Some observations on theepidemiology of fascioliasis in relation to the timing of molluscicide applicationsin the control of the disease. Vet. Rec., 88, 152-164
- **Ouchterlony O. (1958).** Diffusion in gel methods for immunological analysis : progr. Allergy. 5, 1-78.



- **Pailler S., D. Puygauthier-Toubas, A. Bonnin, C. Mary-Chemla, P. Camelynck, H. Thoannes, J.M. Pinon. (1990).** Caractérisation isotypique des anticorps spécifiques dans la distomatose humaine a*Fasciola hepatica*. Med. Mal. Infect., 20 (1990), Pp. 177–181.
- **Pfister K., K. Turner, A. Currie, E. Hall et E.E. Jarrett (1983).** IgE production in rat fascioliasis. Parasite Immunol.5: 587-593.
- **Piedrafita D. (1995).** Immune mechanisms of killing of juvenile *Fasciola hepatica*. Immunology. Melbourne, Australia, La Trobe University.
- **Poitou I., E. Baeza et C. Boulard (1992).**Humoral and cellular immune responses in rats during a primary infestation with *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol. 45: 59-71.
- **Poitou I., E. Baeza et C. Boulard (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: 179-190
- **Pourquier P.H., L. Caquineau, M. Galaup, Y. Le Moal, L. Martin, F. Salingardes et R. Turmel (1995).** Evaluation de l'infestation naturelle de cheptels bovis par *Fasciola hepatica* d'après le titrage d'anticorps du sang ou du lait avec un réactif ELISA utilisant l'antigène spécifique F2. Bull. Soc. Vét. Prat de France. 79 (6-7), 285-291.
- **Reichel M.P, K Vanhoff et B Baxter. (2005).** Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay performed in milk for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle. veterinary parasitology 129 (2005) 61–66.
- **Righi S., Benakhla A., Mekroud A., Ouchene N. et Sedraoui S. (2012).** Diagnostic de *Fasciola hepatica* chez *Galba truncatula* par PCR multiplex, Journées nationales de la SFBC –Journées internationales de biologie 2011, Annales de Biologie Clinique 2012, 70 (1), pp : 33-84.
- **Robert R., J.P. Leynia, D. Chabasse, C. Mahaza, C. Bizon et H. Genthon (1980).** Contribution au diagnostic immunologique de la fasciolose à *Fasciola hepatica* chez les bovins : recherche d'antigène fraction II et d'anticorps antifraction II. Rec. Med. Vét. 156 (7-8), 533-538.
- **Rondelaud D. (1983).** Surface drainage systems and their colonization by

*Lymnaea trunculata* Müller. Apropos of 4 years of observations in Haute-Vienne, France. Ann Rech Vet.14 (1): 57-63.

- **Rondelaud D., G. Dreyfuss, B. Bouteille et M.L. Darde (2000).** Changes in human fasciolosis in a temperate area. About some observations over a 28 year period in central France. Parasitol. Res, 86 : 753-757.
- **Rondelaud,D. et C. Mage (1990).** La fasciolose humaine et les cressonnières. Le point Vétérinaire. 21(126): 899-903.
- **Roseby F. B. (1970).** The effect of fasciolosis on the wool production of Merino sheep. Aust. Vet. J., 46 (8), pp: 361-365.
- **Ross J. G. (1970).** The economics of *Fasciola hepatica* infections in cattle. Br Vet J.,126 (4). pp: 13-27.
- **Ruiz-Navarrette, M.A., C. Arriaga, C.R. Bautista et A. Morilla (1993).** *Fasciola hepatica* : characterization of somatic and excretory-secretory antigens of adult flukes recognized by infected sheep. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 35: 301-307.
- **Santiago N., G.V. Hillyer, R. Garcia et M.H. Morales (1986).** Identification of functional *Fasciola hepatica* antigens in experimental infections in rabbits. Am.J .Trop. Med. Hyg. 35(1) ,1355-140.
- **Sibille P. et A. Chauvin (2001).** Isolation of an immunosuppressive fraction of adult *F. hepatica* Excretion/secretion products using a galanthus nivalis agglutinin. Sixth international veterinary immunology symposium.Uppsala, Juillet, 2001.
- **Sirag S.B., N.Q. Christensen, P. Nansen,J. Mourad et F. Frandsen (1985).** Resistance to *Fasciola hepatica* in calves harboring primary patent *Schistosoma bovis* infection. Jour .Of Helminthol. 55(1),63-70.
- **Sher A., S.L. James, A.J. Simpson, J.K. Lazdins et M.S. Meltzer (1982).** Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. Iii. Loss of susceptibility to macrophage-mediated killing during maturation of *S. mansoni schistosomula* from the skin to the lung stage. J Immunol.128: 1876-1879.

- **Smith A.M., C. Carmona, A. J. Dowd, S. Mcgonigle, D. Acosta et J. P. Dalton (1994).** Neutralization of the activity of A *Fasciola hepatica* Cathepsin L proteinase by anti-cathepsin L antibodies. *Parasite Immunol.*16: 325-328.
- **Smith A.M., A.J. Dowd, S. Mcgonigle, P.S. Keegan, G. Brennan, A. Trudgett et J.P. Dalton (1993).** Purification of a cathepsin l-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol.*62: 1-8.
- **Simpkin K.G., C.R. Chapman et G.C. Coles (1980).** *Fasciola hepatica* : a proteolytic digestive enzyme. *Experimental Parasitology*, 49, pp: 281-287.
- **Soulsby E.L. (1982).** Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals, 7<sup>th</sup> edition, London : Bailliere Tindall, 809 pages.
- **Spithill T.W., D. Piedrafita et P.M. Smooker (1997).** Immunological approaches for the control of fasciolosis. *Int J Parasitol.* 27: 1221-1235.
- **Sripa B., M.R. Haswell-Elkins et P. Sinawat. (2003).** Histological analysis of gallbladder diseases in relation to opisthorchiasis in endemic areas of Thailand. *Acta Tropica* 88 (2003) 239–246.
- **Tailliez R. et S. Korach. (1970a).** les antigènes de *Fasciola hepatica*. II. Etude immunologique et localisation in situ d'un antigène spécifique du genre. *Ann. Inst. Pasteur.* 118, 330-339.
- **Tailliez R. et S. Korach (1970b).** Les antigènes de *Fasciola hepatica*. Isolement Et Caractérisation d'un Antigène Spécifique Du Genre. *Ann .Inst. Pasteur.* 118 ,61-78.
- **Tailliez R., R. Mangalo et S. Korach. (1967).** Isolement d'un antigène spécifique de la genre de la grande douve du foie (*Fasciola hepatica L.*) G. R. Acar. *Sc. Paris*, T. 265 (séries D), 466-468.
- **Threadgold L.T. (1963).** The Tegument and Associated Structures of *Fasciola Hepatica*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* s3-104, 505-512
- **Thoury V. H(1991).** contribution à l'étude immunologique de la fasciolose. Mémoire de Doctorat Vétérinaire, Univ. Paul Sabatier, Toulouse, 102 pages.

- **Tliba O.(2001)** .Caractérisation de la réponse immunitaire hépatique durant la phase précoce d'une fasciolose expérimentale chez le rat. Thèse de doctorat, Université Francois- Rabelais. Tours, 168 pages.
- **Tliba O., P. Sibille, C. Boulard et A. Chauvin (2000)**.Local hepatic immune response in rats during primary infection with *Fasciola hepatica*. *Parasite*.7: 9-18.
- **Torgerson P.et J.Claxton (1999)**. Epidemiology and control, CABI Publishing, Dalton JP, ed., Chap 4, Oxon, UK, pp: 113-149.
- **Trap C, et P. Boireau (2000)**. Les protéases chez les helminthes. Article de synthèse. INRA, EDP sciences. *Vet Res*. 31, 461-471.
- **Trudgett A., A.T. McNair, E.M. Hoey, P.S. Keegan, J.P. Dalton, B.K. Rima, A. Miller et P. Ramasamy (2000)**. The major tegumental antigen of *Fasciolahepatica* contains repeated elements. *Parasitology*.**121**: 185-191.
- **Van Milligen F.J., J.B. Cornelissen et B.A. Bokhout (1998)**.Location of induction and expression of protective immunity against *Fasciola hepatica*at the gut level: a study using an ex vivoinfection model with ligated gut segments. *J Parasitol*. 84: 771-777.
- **Vukman K.V., P.N. Adams, M. Metz, M. Maurer et S. O'neill (2013)**. *Fasciola hepatica* tegumental coat impairs mast cells' ability to drive Th1 immune responses. *the journal of immunology*. Mar 15; 190(6), pp: 2874-2879.
- **Wilson L. R., R. T. Good, M. Panaccio, G.L. Wijffels, R. M. Sandeman et T.W. Spithill (1998)**.*Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin b protease secreted by newly excystedjuvenile liver fluke. *Experimental Parasitology*.88: 85-94.
- **Yokananth S., S. Ghosh, S.C. Gupta, M.G. Suresh et D. Saravanan. (2005)**. Characterization of specific and cross-reacting antigens of *Fasciola gigantica* by immunoblotting. *Parasitology Research Volume 97, Issue 1*, pp 41-48.
- **Zimmerman G.L. et C.R. Clarck (1986)**. Séparation of parasite antigens by molecular exclusion, anion exchange and chromatofocusing utilizing FPLC protein fraction systems. *Vetparasito. L ; 10 (1-3)*, 217-228.

- **Zimmerman G.L., N.I. Kerkvliet, J.A. Brauner et J.E. Cerro (1983).** Modulation Of Host Immune Responses By Fasciola Hepatica: Responses By Peripheral Lymphocytes To Mitogens During Liver Fluke Infections Of Sheep. J Parasitol. 69: 473-477.
- (1) [madarevues.recherches.gov.mg/IMG/pdf/1070.pdf](http://madarevues.recherches.gov.mg/IMG/pdf/1070.pdf)
  - (2) [http://www.michigan.gov/dnr/1,1607,7-153-10370\\_12150\\_12220-26639--,00.html](http://www.michigan.gov/dnr/1,1607,7-153-10370_12150_12220-26639--,00.html)
  - (3) [http://www.vetbatna.com/uploads/5/9/1/7/5917861/les\\_maladies\\_provoques\\_par\\_les\\_helminthes\\_parasites.pdf](http://www.vetbatna.com/uploads/5/9/1/7/5917861/les_maladies_provoques_par_les_helminthes_parasites.pdf)
  - (4) [http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Fasciola+Hepatica&lang=4](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Fasciola+Hepatica&lang=4)
  - (5) <https://www.studyblue.com/notes/note/n/parasite-lab-practical-2/deck/8238340>
  - (6) <http://cal.vet.upenn.edu/projects/parasit06/website/lab6new2009.htm>
  - (7) **Hillyer G.V et al.** A service of national library of medicine and the national institutes of health. Département of biology, university of Puerto Rico, Rio.38(1),103-10. [http://www.ncbi.nih.gov/entrezquery.fcgi?itool=abstractplus&db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=anstractplus&list\\_uids=3124643](http://www.ncbi.nih.gov/entrezquery.fcgi?itool=abstractplus&db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=anstractplus&list_uids=3124643) (Consultation le 20/05/2009).
  - (8) Diagnostic immunologique de la fasciolose par la méthode ELISA dans les sérums et les laits (240 réaction). KIT ELISA fasciolose sérum et bicupule. Version p05 120/03 du 26/07/2005. 5 pages, <http://www.institut-pourquier.fr> (consultation le 21/05/2009).
  - (9) douve du foie. Licence de documentation libre GNU (GFDL), de la wikipedia foundation, Inc. Article de wikipédia, l'encyclopédie libre. 501(c) (3) du code fiscal des Etats-Unis. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked\\_immunosorbent\\_assay](http://fr.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_immunosorbent_assay) (consultation le 26 /04/2009).

**Annexe 1 : Composition des solutions :**

- **Eau physiologique (NaCl 0,9%).**

NaCl.....9g  
H<sub>2</sub>O .....1000ml

- **solution SDS 10%.**

SDS.....1g  
H<sub>2</sub>O distillé .....10ml

- **Tampon de dépôt : (Tris 1M-HCL, pH 8, EDTA 0,5 M, SDS 10%, glycérol 10%, EDTA 2%)**

Tris-base .....1,21g  
EDTA .....1,46g  
SDS.....1g  
Glycérol .....1ml  
B-Mercaptoéthanol.....0,5ml  
Bromophénol.....0,1g  
H<sub>2</sub>O distillé .....10ml

- **solution de persulfate d'ammonium 10%.**

Persulfate d'ammonium.....1g  
H<sub>2</sub>O distillée.....10ml

- **colorant (Bleu de coomassie 0.25%)**

Bleu de coomassie R-250 (0,3g) dans 100 ml solvant:

Ethanol(5V) .....62,5ml  
H<sub>2</sub>O distillée.....62,5ml  
Acide acétique.....12,5ml

- **Décolorant (1litre).**

Ethanol (5%) .....	50ml
H <sub>2</sub> O distillée (87,5%) .....	875ml
Acide acétique(7,5%).....	75ml
Volume total .....	1000ml

- **Tampon PBS,pH 7.2 ,Azide de sodium 0.01%.**

Nacl.....	89g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,2g
Kcl.....	0,2g
NaN <sub>3</sub> .....	0,1g
H <sub>2</sub> O.....	1000ml

- **Tampon PBS, pH 7,2, PMSF 0,8 mM, 0,01% NaN<sub>3</sub>.**

PMSF.....	0,14g
Ethanol.....	4 ml

Dissoudre bien le PMSF mettre le mélange dans un litre de PBS pH 7,2, 0,01% NaN<sub>3</sub>.

- **Solution de Biuret :**

NaOH.....	0,75 mol/l
Sulfate de cuivre (CuSO <sub>4</sub> )....	0,006 mol/l
Tartrate de Na et K.....	0,02 mol/l
Iodure de potassium (KI)....	0,006 mol/l

- **Tampon sodium acétate (pH 5,0) :**

Acide acétique .....	0,28 ml
Acétate de sodium .....	0,42 g
H <sub>2</sub> O .....	QSP .....
100 ml	
Ajuster le pH avec du NaOH jusqu'à pH 5.	

- **Tampon sodium phosphate (pH 7.5) :**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ..... 0,224 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ..... 0,258 g

$\text{H}_2\text{O}$  ..... 100 ml

Ajuster le pH jusqu'à pH 7,5.

- **Tampon Tris-HCl, 0.5M (pH 9.0) :**

Tris ..... 6,05 g

$\text{H}_2\text{O}$  ..... 100 ml

Ajuster le pH jusqu'à pH 9,0.



## Annexe 2 : Les valeurs des densités optiques (DO) :

- *Pour le dosage des protéines :*

**Tableau a** : valeur des densités optique (DO) issues du dosage colorimétrique des dilutions BSA par la méthode de Biuret.

Tube \ DO	1	2	3	4	5
Première lecture	0,094	0,185	0,268	0,350	0,420
Deuxième lecture	0,094	0,185	0,267	0,350	0,420
Lecture moyenne	0,094	0,185	0,2675	0,350	0,420

- *Pour le dosage des carbohydrates :*

**Tableau b**: valeur des densités optique (DO) issues du dosage colorimétrique des carbohydrates totaux.

Tube \ DO	1	2	3	4	5
Première lecture	0,180	0,300	0,470	0,640	0,766
Deuxième lecture	0,140	0,360	0,450	0,660	0,786
Lecture moyenne	0,160	0,330	0,460	0,650	0,776

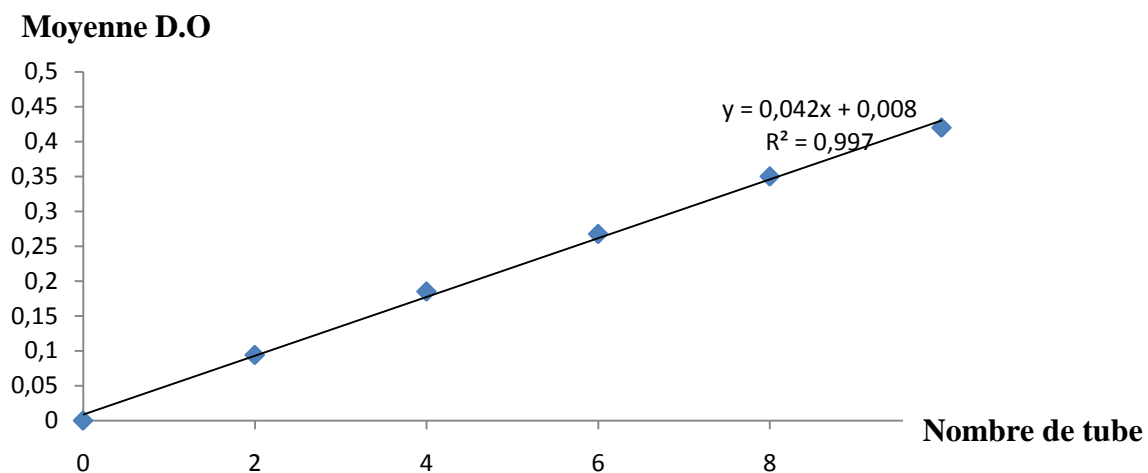
- *Pour le dosage des lipides :*

**Tableau c :** valeur des densités optique (DO) issues du dosage colorimétrique des lipides totaux.

Tube \ DO	1	2	3	4	5
Première lecture	0,221	0,349	0,494	0,718	0,814
Deuxième lecture	0,179	0,341	0,509	0,612	0,764
Lecture moyenne	0,200	0,345	0,501	0,665	0,789

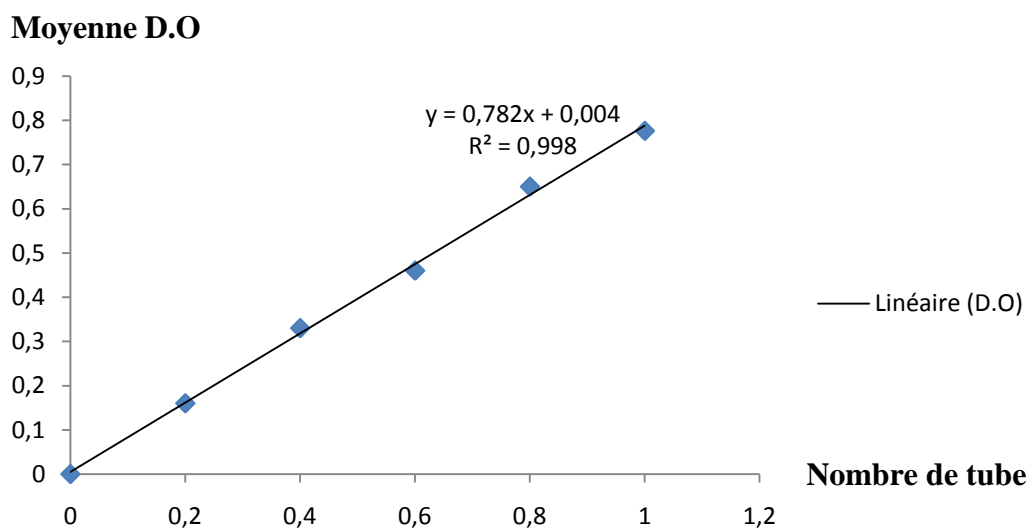
**Annexe 3 : Les courbes d'étalonnages :**

- *Pour les protéines :*



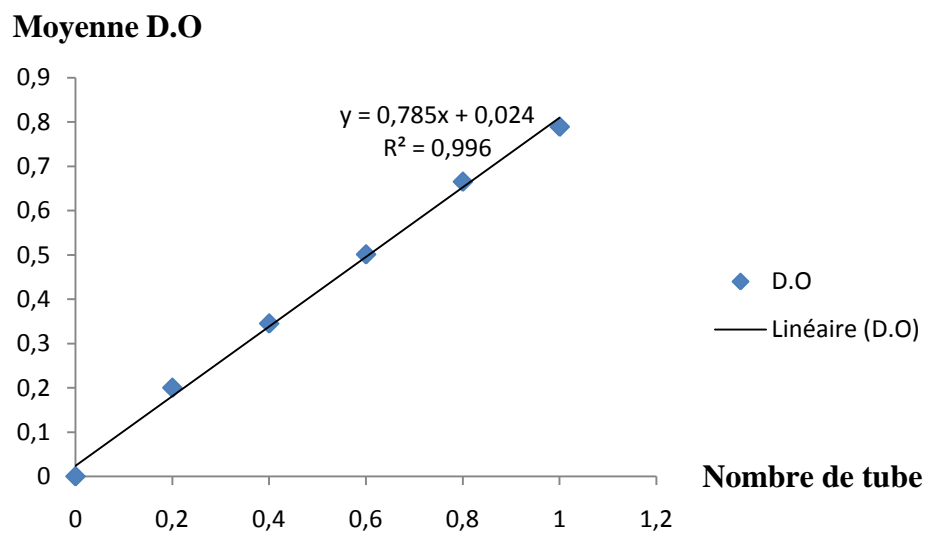
**Fig. a :** Courbe d'étalonnage obtenu par dosage de plusieurs dilutions de protéines standards.

- *Pour les carbohydrates :*



**Fig. b :** Courbe d'étalonnage obtenu par dosage d'un sucre étalon (D-glucose) à différentes concentrations.

- Pour les lipides :



**Fig. c** : Courbe d'étalonnage obtenu par dosage d'un Acide gras étalon (Acide oléique) à différentes concentrations.

## RESUME

La distomatose hépatobiliaire ou fasciolose est une parasitose due à la présence d'un trématode digène, dit *Fasciola hepatica* ou grande douve du foie, dans les canaux biliaires des ruminants, occasionnant de nombreux troubles et des pertes économiques.

L'Homme peut en être atteint accidentellement. La contamination résulte de l'ingestion, avec l'alimentation du stade infestant, les métacercaires. Ces dernières traversent la paroi intestinale et passent dans le foie puis dans les canaux biliaires où elles deviennent adultes.

La migration de ce parasite est assurée par la sécrétion d'enzymes qui permettent la progression dans les tissus par la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire. Ces enzymes sont également impliquées dans l'inactivation du système immunitaire de l'hôte par divers mécanismes.

La diversité antigénique et structurale de *F.hepatica* et sa richesse en molécules protéiques associées à d'autres composés complexes, ont fait d'elle l'objet de plusieurs investigations d'ordre biochimique et immunologique. À cet effet, de nombreuses techniques et procédés biochimiques étaient nécessaires afin d'assurer l'extraction, la préparation ainsi que le dosage des différentes substances. En outre, l'emploi de l'électrophorèse SDS-PAGE paraît très utile dans la séparation et la révélation des protéines de ce parasite et la mise en évidence de l'effet protéolytique engendré par les protéases présentes dans l'homogénat brut de *F. hepatica*.

**Mots clés:** *F. hepatica*; Etude biochimique et immunologique; Electrophorèse SDS-PAGE; Effet protéolytique.

## المخلص

داء المتورقات الكبدية أو Fasciolose هو مرض طفيلي ناتج عن وجود المتورقة الكبدية *Fasciola hepatica* في القناة الصفراوية عند المجترات، ويسبب العديد من الاضطرابات و الخسائر الاقتصادية. يمكن أن يصيب الإنسان من خلال ابتلاعه للمرحلة المعدية مع الأغذية. تمر هذه الأخيرة من خلال جدار الأمعاء والكبد إلى أن تصل إلى القناة الصفراوية أين تصبح بالغة.

تتحقق هذه الهجرة عن طريق إفراز الإنزيمات التي تسمح لها بالتقدم في الأنسجة عن طريق إتلاف مكونات المصفوفة خارج الخلية. و تشارك أيضا هذه الإنزيمات في تعطيل الجهاز المناعي

التنوع الجيني و البنيوي للدودة الكبدية وكذا كمية البروتينات الموجودة فيها و المرتبطة بجزيئات أخرى أكثر تعقيدا، جعلتها موضوعا للعديد من الدراسات و التحقيقات سواء في الكيمياء الحيوية أو المناعية.

تحقيقا لهذه الغاية، هناك العديد من التقنيات والعمليات الكيميائية الحيوية اللازمة لضمان استخراج وإعداد الجرعات المختلفة من المواد. وبالإضافة إلى ذلك، فإن استخدام SDS-PAGE يبدو مفيدا جدا في الفصل والكشف عن البروتين الطفيلي وتسلط الضوء على تأثير التحلل البروتيني الناتج عن البروتياز الموجودة في جناسة الخام للدودة المتورقة.

**كلمات البحث:** *F. hepatica*، SDS-PAGE، الكيمياء الحيوية ودراسة مناعية، تأثير التحلل البروتيني.

## ABSTRACT

Distomatosis or hepatobiliary fascioliasis is a parasitic disease caused by the presence of a trematode digenean, says *F. hepatica* or large liver fluke, in the bile ducts of ruminants causing many disorders and economic losses. Man can be reached accidentally. The contamination result from the ingestion with feeding infective stage, metacercariae. This stage passes through the intestinal wall and in the liver in the bile ducts or they become adult flukes.

This migration is achieved by the secretion of enzymes that allow progression in tissues by degradation of extracellular matrix components. These enzymes are also involved in the inactivation of the immune system of the host.

The antigenic and structural diversity of *Fasciola hepatica* and its rich protein molecules associated with other complexes have made it the subject of several investigations of biochemical and immunological order. For this purpose many biochemical techniques and processes were necessary to ensure the extraction, preparation and dosing of different substances. In addition, the use of SDS-PAGE seems very useful in the separation and the revelation of the parasite protein and the highlight of the proteolytic effect generated by proteases present in the crude homogenate *F. hepatica*.

**Keywords:** *F. hepatica*; Biochemical and immunological study; SDS-PAGE Electrophoresis; proteolytic effect.