

Sommaire

PREAMBULE.....	9
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
<u>I. ETUDE DU PARASITE :ANOPLOCEPHALA PERFOLIATA.....</u>	15
1.1. Taxinomie.....	15
1.2. Morphologie.....	15
1.2.1. Morphologie du parasite adulte.....	15
1.2.2. Morphologie de l'œuf.....	16
1.3. Cycle biologique.....	17
1.4. Epidémiologie.....	18
1.4.1. Epidémiologie descriptive.....	18
1.4.1.1. Prévalence.....	18
1.4.1.2. Variations de prévalence.....	19
1.4.1.2.1. Variations régionales.....	19
1.4.1.2.2. Variations saisonnières.....	19
1.4.1.2.3. Variations avec les caractéristiques individuelle.....	19
1.4.1.2.4. Variations avec le mode de vie et les conditions de logement.....	
1.4.2. Epidémiologie analytique.....	20
1.4.2.1. Sources de parasites.....	20
1.4.2.2. Résistance du parasite.....	20
1.4.2.3. Modes d'infestation.....	20
1.5. Pathologie.....	21
1.5.1. Symptômes.....	21
1.5.2. Lésions.....	21
1.4.3. Pouvoir pathogène.....	21

II. METHODES DIAGNOSTIQUES

2.1. Diagnostic ante-mortem.....	22
2.1.1. <i>Diagnostic épidémiologique et clinique</i>	22
2.1.2. <i>Diagnostic coproscopique</i>	23
2.1.3. <i>Diagnostic sérologique</i>	23
2.1.4. <i>Diagnostic par détection des copro-antigènes</i>	24
2.2. Diagnostic post-mortem.....	24

MATERIEL ET METHODES.....25

OBJECTIFS.....27

PREMIERE PARTIE : ECHANTILLONNAGE DES FECES

1.1. Nature de l'échantillon.....	29
1.2. Recrutement des échantillons.....	29
1.3. Récolte des échantillons.....	29
1.4. Conservation, transport.....	29
1.5. Informations complémentaires.....	30

DEUXIEME PARTIE : REALISATION DE COPROSCOPIES

I. PRINCIPE DE L'EXAMEN COPROSCOPIQUE.....31

1.1. Principe de la méthode de flottation.....	31
1.2. Principe de la méthode de Proudman.....	31

II. METHODE DE FLOTTATION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE

2.1. Matériel	32
2.2. Procédure.....	33

III. METHODE DE CENTRIFUGATION, FLOTTATION

3.1. Matériel.....	33
3.2. Procédure.....	34

TROISIEME PARTIE : MISE AU POINT D'UN TEST ELISA POUR LA DETECTION DE COPRO-ANTIGENES.....35

I. PRINCIPE DU TEST ELISA35

II. PRODUCTION DES ANTIGENES PARASITAIRES..... 39

2.1. Production d'antigènes à partir des parasites entiers.....	39
2.2. Production d'antigènes excrétés / sécrétés.....	40
2.2.1. Premier essai de production d'antigènes excrétés / sécrétés.....	40
2.2.2. Deuxième essai de production d'antigènes excrétés / sécrétés.....	41
2.3. Dosage des solutions antigéniques.....	42

III. PRODUCTION DE SERUMS.....43

3.1. Immunisation des souris.....	43
3.2. Evaluation de l'immunisation.....	43

IV. UTILISATION DES TECHNIQUES AVEC DES FECES DE CHEVAL.....45

4.1. Traitement des échantillons de fèces.....	45
4.1.1. Premier essai de traitement des fèces.....	45

4.1.2. Deuxième essai de traitement des fèces.....	46
4.2. Dosage ELISA des antigènes contenus dans le surnageant.....	47
4.3. Modification de différents paramètres.....	48
4.3.1 Action sur la température.....	48
4.3.2 Action sur les supports de plaque.....	48
4.3.3 Changement du type de révélation.....	48

RESULTATS.....49

PREMIERE PARTIE : ECHANTILLONNAGE

I. CARACTERISTIQUES DE L'ECHANTILLON DE CHEVAUX DE L'ETUDE.....51

1.1. Répartition des animaux suivant leur âge.....	51
1.2. Répartition des animaux suivant leur sexe.....	52
1.3. Répartition des animaux suivant leur race.....	52
1.4. Répartition des animaux en fonction du degré d'infestation.....	53
1.5. Répartition des animaux en fonction des dates de prélèvement.....	54

DEUXIEME PARTIE : REALISATION DE COPROSCOPIES

SUR FECES DE CHEVAL.....55

I. RESULTATS DES DIFFERENTES METHODES.....55

II. ETUDE DE LA SENSIBILITE, SPECIFICITE DES METHODES D'ANALYSE COPROSCOPIQUE.....57

2.1. Définitions	57
2.1.1. Sensibilité.....	57

2.1.2. <i>Spécificité</i>	57
2.2. Résultats des analyses coproscopiques.....	58
2.2.1. <i>Méthode de flottation simple</i>	58
2.2.2. <i>Méthode de flottation quantitative : Mac Master</i>	58
2.2.3. <i>Méthode de flottation centrifugation</i>	58

III. ETUDE DES VALEURS PREDICTIVES POSITIVES ET NEGATIVES.....59

3.1 Définitions	59
3.1.1. <i>Valeur prédictive positive</i>	59
3.1.2. <i>Valeur prédictive négative</i>	60
3.2. Résultats des analyses coproscopiques.....	60

TROISIEME PARTIE : MISE AU POINT D'UN TEST ELISA POUR LA DETECTION DE COPRO-ANTIGENES.....62

I. PRODUCTION DES ANTIGENES PARASITAIRES.....62

1.1. Dosage des solutions antigéniques.....	62
1.2. Valeurs des doses à injecter.....	63

II. PRODUCTION DE SERUMS.....64

2.1. Résultats de la production de sérums à partir des solutions antigéniques S et P.....	65
2.1.1. <i>Résultats de la première immunisation (Jo+18)</i>	65
2.1.2. <i>Résultats de la seconde immunisation (Jo+34)</i>	66
2.2. Résultat de la production de sérums à partir de la solution antigénique E/S.....	67

<u>III. UTILISATION DES TECHNIQUES AVEC LE FECES DE CHEVAL</u>	68
3.1. Résultats du test ELISA avec les sérums S et P.....	68
3.2. Résultats du test ELISA avec les sérums E/S.....	68
 DISCUSSION	69
 <u>I. PREMIERE PARTIE : ETUDE DE L'ECHANTILLON</u>	71
 <u>II. DEUXIEME PARTIE : REALISATION DE COPROSCOPIES</u>	71
2.2. Caractéristiques des méthodes.....	71
2.2.1. <i>Sensibilité</i>	71
2.2.2. <i>Spécificité</i>	74
2.2.3. <i>Valeurs prédictives</i>	74
 <u>III. TROISIEME PARTIE : MISE AU POINT DU TEST ELISA</u>	75
3.1. Production des sérums.....	75
3.2. Causes de l'absence de détection des copro-antigènes.....	75
3.2.1. <i>Sélection des antigènes</i>	75
3.2.2. <i>Dilution des antigènes dans les fèces</i>	76
3.2.3. <i>Problèmes d'extraction des antigènes des fèces (solubilité)</i>	76
3.2.4. <i>Problème lié au test ELISA lui-même</i>	77
3.2.5. <i>La conservation des antigènes</i>	77

CONCLUSION	79
BIBLIOGRAPHIE	83
ANNEXES	91

PREAMBULE

Pendant longtemps, les cestodes ont été considérés comme inoffensifs pour le cheval. Des études récentes suggèrent cependant que ces parasites ont un réel pouvoir pathogène.

Ces parasites causeraient des dommages intestinaux à l'origine de maladies voire de mortalité (Barclay *et al.* 1982, Beroza *et al.* 1983,1986, Owen *et al.* 1988, Proudman *et al.* 1993).

Certains auteurs ont montré que le changement des conditions climatiques a provoqué une recrudescence du téniasis en relation directe avec la pullulation des acariens oribatidés, hôtes intermédiaires des cestodes (Geering *et al.* 1990), et que l'utilisation des endectocides comme anti-parasitaires était à l'origine d'une augmentation du téniasis par levée de compétition avec les espèces sensibles aux endectocides (Edwards 1986).

Le diagnostic des infestations par les Anoplocéphales du vivant de l'animal se fait par des méthodes de détection de segments de parasite ou d'œufs dans les matières fécales.

Ces techniques conventionnelles de détection sont peu fiables car elles présentent une faible sensibilité (Slocombe *et al.* 1979, French *et al.* 1994).

Des techniques sérologiques mises au point à partir des antigènes sécrétés (Proudman *et al.* 1996), ou à partir du scolex de cestodes (Höglund *et al.* 1995) ont été développées mais ne donnent pas des valeurs de sensibilité beaucoup plus élevées (Se = 68%) que les méthodes classiques de coproscopie (Se = 61%)(Proudman *et al.* 1996).

Chez d'autres cestodes, des méthodes immunologiques de détection de copro-antigènes se sont révélées fiables.

De la même façon, il serait intéressant de développer une telle méthode pour *Anoplocephala perfoliata*.

Ainsi notre travail se scindera en deux grandes parties :

- une partie relative aux techniques de coproscopie,
- une autre partie relative à la mise au point d'un test de détection de copro-antigènes d'*Anoplocephala perfoliata*.

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

I. ETUDE DU PARASITE : *ANOPLOCEPHALA PERFOLIATA*

Le téniasis est une helminthose due à la présence de cestodes adultes dans le tube digestif d'un hôte. Les parasites responsables appartiennent majoritairement à la famille des anoplocéphalidés dont le développement nécessite un hôte intermédiaire ; un acarien de la famille des Oribatidés (Bussi ras & Chermette 1995)

Les anoplocéphalidés se retrouvent d'une part chez les ruminants (surtout les ovins) et chez les  quid s. Ces parasites sont très spécifiques de leur hôte et par conséquent ne sont pas responsables de zoonoses.

Chez les équidés, on connaît trois espèces cosmopolites, la plus fréquente et la plus pathogène étant *Anoplocephala perfoliata*.

On retrouve aussi *Anoplocephala magna* et *Paranoplocephala mamillana*.

1.1 Taxinomie

Embranchement :	Plathelminthes
Classe :	Cestodes
Ordre :	Cyclophyllidea
Famille :	Anoploc�phalid�s
Sous-famille :	Anoploc�phalin�s
Genre :	<i>Anoplocephala</i>

1.2 Morphologie

1.2.1 Morphologie du parasite adulte

Anoplocephala perfoliata

C'est un vers plat de couleur blanchâtre. Les anneaux sont plus larges que longs. En arrière de chacune des 4 ventouses, on note la présence d'un petit appendice ou lobe céphalique (figure 1).

Taille :

Leur taille est variable : elle dépend de la quantité de parasites présents dans l'intestin (effet « foule »). On peut citer en moyenne les valeurs suivantes :

- longueur : 40 à 80 mm
- largeur : 10 à 20 mm

Le parasite adulte est présent dans l'intestin grêle ou le cæcum, très souvent à la valvule iléo-cæcale.

Figure 1 : *Anoplocephala perfoliata* sur la muqueuse caecale (Jonville)



Conséquence :

Les parasites adultes sont visibles à l'œil nu et leur localisation est très spécifique. Il est donc relativement facile de les dénombrer avec précision .

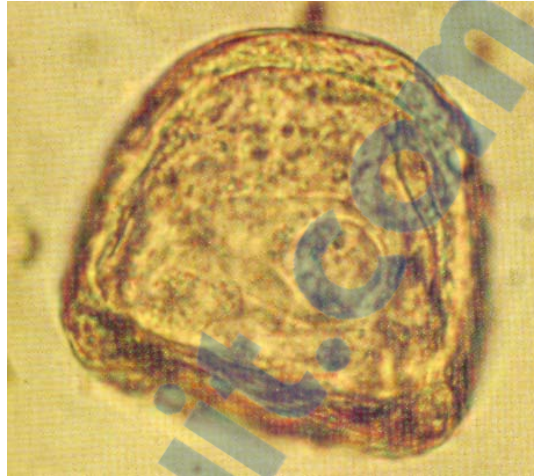
1.2.2 Morphologie de l'œuf

Sa taille est de 65 à 80 µm de diamètre, on le voit donc au microscope à l'objectif X10.

Sa structure est plus ou moins arrondie, en forme de « D » et présente une coque épaisse. Il contient un embryon hexacanthé (figure 2).

La densité de l'œuf d'*Anoplocephala* est élevée ce qui nécessite l'utilisation d'un liquide très dense lors de la réalisation de coproscopie après enrichissement par flottation.

Figure 2 : l'œuf d'*Anoplocephala perfoliata*
X800 (Thienpont *et al.* 1998)



Conséquence :

Les œufs sont embryonnés et d'aspect caractéristique, donc assez faciles à identifier à l'examen microscopique.

1.3. Cycle biologique

Cycle d'*Anoplocephala perfoliata*

Les anoplocéphalidés sont des parasites obligatoires dont le cycle évolutif est hétéroxène.

Le cestode adulte vit dans le tube digestif et se nourrit par pinocytose au travers du tégument.

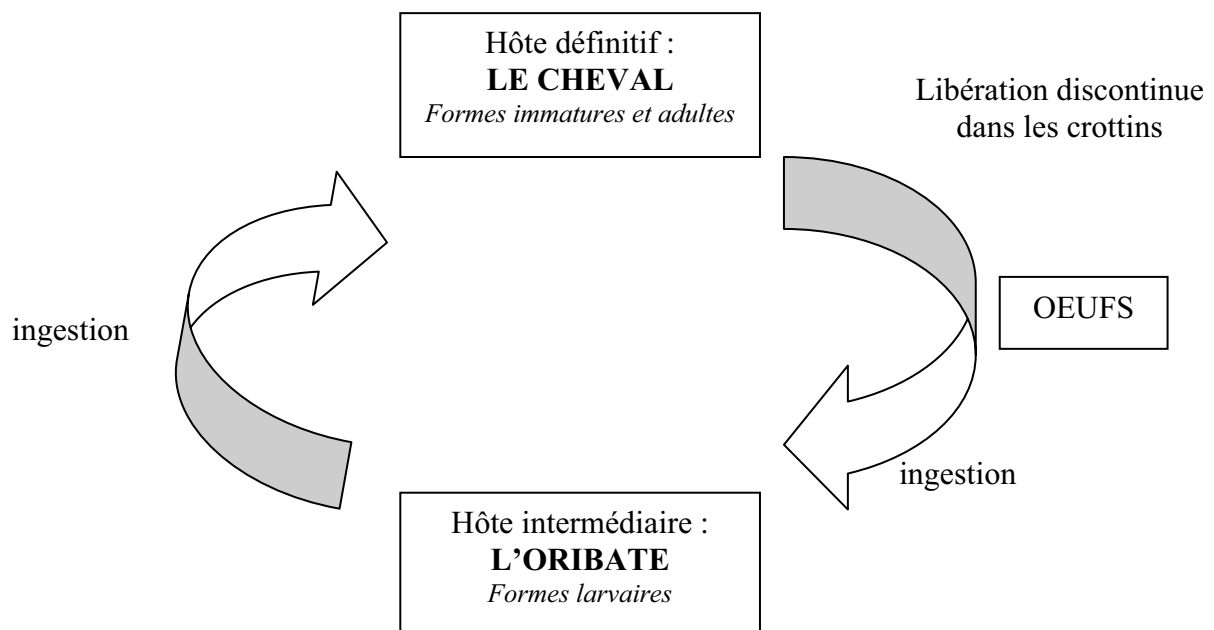
La reproduction est sexuée. La fécondation a lieu généralement entre deux segments différents d'un même strobile ou entre deux vers différents, exceptionnellement par autofécondation au sein d'un même segment mûr. Elle aboutit à la formation d'œufs qui remplissent les segments ovigères.

Les anneaux ovigères ou même des œufs libres sont rejetés avec les fèces du cheval. Le cycle met en jeu un hôte intermédiaire obligatoire : un acarien des pâturages, abondant (20000 individus / m²) surtout dans les zones ombragées, riches en mousses, à sols acides : l'oribate. Différentes espèces d'oribates peuvent être hôtes intermédiaires. Ce qui leur permet de jouer ce rôle est, d'une part leur habitude alimentaire et d'autre part leur taille. En effet, l'acarien doit être suffisamment gros pour ingérer l'œuf du cestode et permettre le développement larvaire des Anoplocéphalidés dont *Anoplocephala perfoliata*.

L'acarien ingère l'œuf qui éclot et donne en quelques mois (8 à 20 semaines) une larve cysticercoïde dans la cavité générale (on trouve en général deux larves par acarien infesté)

L'infestation de l'hôte définitif se fait par ingestion de végétaux porteurs d'acariens infestés.

Chaque larve se transforme en un ver adulte dans l'intestin du cheval, la période pré-patente étant de 6 à 16 semaines.



1.4. Épidémiologie

1.4.1. Épidémiologie Descriptive

1.4.1.1. Prévalence

Une étude multicentrique réalisée en France en 1997 dans quatre régions distinctes a montré que 62 % des chevaux examinés post-mortem étaient infestés par des cestodes de la famille des Anoplocephalidés (Collobert *et al.* 1997).

Ce pourcentage d'infestation est proche de celui des autres pays : 69% en Grande-Bretagne (Owen *et al.* 1988) de 50 à 54% au Kentucky (Lyons *et al.* 1994), 65% en Suède (Nilsson *et al.* 1995). La prévalence se situerait autour de 40% en Normandie (Collobert *et al.* 1997). Depuis ces études, des anti-parasitaires à base de praziquantel ont reçu une

Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), si bien que la prévalence du téniasis chez le cheval est probablement moindre en 2003.

En France, 62% des chevaux hébergeraient *Anoplocephala perfoliata* et les charges parasitaires varient de 1 à plus de mille individus (Collobert *et al.* 1997).

Anoplocephala magna et *Paranoplocephala mamillana* ont été identifiés exclusivement en Normandie avec des prévalences d'infestation faibles 4,4 et 3% respectivement. Les charges parasitaires étaient limitées : maximum une vingtaine de vers (Collobert *et al.* 1997).

1.4.1.2. Variations de prévalence

1.4.1.2.1. Variations régionales

Les variations régionales ont été observées en France où les chevaux des régions d'Aquitaine et Pays de Loire seraient plus fréquemment infestés. Ces différences peuvent être expliquées par la biologie des oribatidés, hôtes intermédiaires (Collobert *et al.* 1997).

1.4.1.2.2 Variations saisonnières

Les caractéristiques biologiques des oribatidés seraient également à l'origine des variations saisonnières de prévalence observées par différents auteurs. Le pourcentage de chevaux infestés et/ou la charge parasitaire augmentent en automne et en hiver quel que soit l'hémisphère (Bain *et al.* 1977, Collobert *et al.* 1990, Lyons *et al.* 1994).

1.4.1.2.3. Variation liées aux caractéristiques individuelles (âge, race, sexe)

Il n'existerait aucune immunité acquise liée à l'âge vis-à-vis de l'infestation par les Anoplocéphales et l'âge n'influe ni sur la fréquence, ni sur le degré d'infestation.

Au contraire, la prévalence augmenterait avec l'âge. Des infestations sont détectées dès l'âge de cinq mois.

La race et le sexe n'induisent pas de variations de prévalence.

(Bain *et al.* 1977, Benton *et al.* 1994, Collobert *et al.* 1997, Fogarty *et al.* 1994, Nilsson *et al.* 1995, Imrie *et al.* 1987).

4.1.3.4. Variations liées au mode de vie et aux conditions de logement.

Le rôle du mode de vie a été souligné par Mfittilodze *et al.* 1989 : les chevaux hébergés en écurie sont moins souvent infestés que ceux maintenus sur des herbages (Mfittilodze *et al.* 1989, Collobert *et al.* 1990).

1.4.2. Epidémiologie analytique

1.4.2.1 Sources

La source de parasites directe est l' Oribate.

Les sources indirectes sont les autres chevaux atteints.

1.4.2.2 Résistance du parasite

Chez le cheval, le parasite peut vivre quelques mois à un an au maximum.

Les œufs libres dans le milieu extérieur peuvent survivre 1 à 2 mois.

Chez l'oribate, la larve cysticercoïde peut survivre pendant toute la vie de l'acarien soit 10 à 12 mois. Mais ces acariens sont très sensibles aux conditions extérieures, notamment à la dessiccation.

1.4.2.3 Modes d'infestation

L'infestation du cheval se fait uniquement par voie buccale par ingestion des hôtes intermédiaires.

La principale cause favorisante est la vie au pâturage.

1.5. Pathologie

1.5.1. Symptômes

Le téniasis provoque chez le cheval des troubles digestifs peu caractéristiques : poussées diarrhéiques, petites coliques, coliques iléo-cæcales (Proudman & Edwards 1993). Il peut y avoir des retentissements sur l'état général : amaigrissement, anémie.

Les complications sont exceptionnellement la mort par occlusion ou après péritonite consécutive à une perforation.

1.5.2 Lésions

Figure 3 : Lésions sur la valvule iléo-cæcale.
(Jonville)



Les lésions générales sont anémie et maigreur.

Les lésions locales sont inflammation de l'intestin, ponctuations hémorragiques aux points de fixation (figure 3).

On retrouve très facilement à l'autopsie la présence de vers.

Parfois avec *Anoplocephala perfoliata*, on peut retrouver au voisinage de la valvule iléo-cæcale des productions tumorales bénignes en particulier léiomyomes avec jabot intestinal, des petits ulcères ou petits abcès au point de fixation, des ulcères plus importants avec des risques de perforation si plusieurs parasites sont fixés au même point et enfin un risque d'invagination avec occlusion.

1.5.3 Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène d'*Anoplocephala perfoliata* et notamment son rôle dans l'apparition de coliques demeurent des sujets de controverse.

L'infestation massive s'accompagne d'un mauvais état général, de retard de croissance chez les jeunes, de coliques sourdes dans le flanc droit, d'un ramollissement des crottins ou de diarrhées lorsque les populations de vers sont localisées dans l'intestin grêle (Collobert *et al.* 1997, Drudge *et al.* 1986).

Divers rapports cliniques associent au téniasis des cas d'invaginations iléales, iléo-cæcales, cæco-cæcales, et cæco-coliques (Barclay *et al.* 1982, Beroza *et al.* 1983, Edwards, 1986), des épaissements et des obstructions de l'iléum, (Bello, 1999) des torsions coliques et caecales (Beroza *et al.* 1986). Les deux études françaises (Collobert *et al.* 1990, Collobert *et al.* 1997) ont mis en évidence des invaginations cæco-caecales et cæco-coliques associées à une infestation par les anoplocéphales.

Pour d'autres auteurs, le cestode n'est pas pathogène (Beroza *et al.* 1986) et son association avec des troubles du transit digestif ne relève que de la coïncidence du fait de sa prévalence élevée (Owen *et al.* 1988).

Néanmoins, les travaux de Proudman & Edwards (1993), portant sur un effectif contrôlé de 231 chevaux, ont montré que le risque de colique localisée à la jonction iléo-caecale était accru en présence d'une cestodose imaginaire.

De plus, la nature et la gravité des lésions identifiées aux sites de fixation des parasites lors d'infestation élevée ne permet pas d'écarter la possibilité de perturbation de la motricité intestinale et justifie la prise en compte de ces parasites dans les programmes de prophylaxie anti-parasitaire.

II. Méthodes diagnostiques

2.1. Diagnostic ante-mortem

2.1.1. Diagnostic épidémiologique et clinique

Aucun signe clinique ne permet de diagnostiquer le téniasis chez le cheval.

La prévalence étant élevée, on peut considérer que tout cheval ayant accès au pâturage présente un risque d'infestation non négligeable.

2.1.2. Diagnostic coproscopique

En routine, actuellement seule la coproscopie permet de mettre en évidence la présence de parasites adultes en cherchant leur production (les œufs).

C'est une méthode très spécifique puisque la morphologie des œufs d'*Anoplocephala perfoliata* est caractéristique.

Toutefois la découverte des œufs est aléatoire à cause d'une libération discontinue de ceux-ci. La sensibilité de toutes les techniques coproscopiques confondues ne dépasse pas 61% (Proudman *et al.* 1996).

2.1.3. Diagnostic sérologique

Des techniques sérologiques de détection d'*Anoplocephala perfoliata* mises au point à partir des antigènes excrétés / sécrétés (Proudman *et al.* 1996), ou à partir du scolex (Höglund *et al.* 1995) ont été développées mais ne donnent pas des valeurs de sensibilité beaucoup plus élevées que les méthodes de coproscopie classiques.

Ces méthodes de diagnostic sérologique sont développées pour de nombreux cestodes aussi bien chez l'Homme que chez l'animal. Le test ELISA a été mis en œuvre pour le diagnostic sérologique de l'infestation par *Taenia ovis*, *Taenia hydatigena*, *Taenia pisiformis*, *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*. Toutes ces méthodes permettent de déceler la présence d'anticorps sériques dirigés contre le parasite.

Ces études sur la mise au point de test ELISA ont utilisé des antigènes de cestodes de diverses origines : antigènes somatiques ou antigènes excrétés / sécrétés (E / S).

Gasser *et al.* (1988) ont comparé les performances des tests ELISA avec antigènes excrétés / sécrétés et ceux issus du proto-scolex. Ils ont trouvé que les antigènes E/S donnaient une meilleur sensibilité.

Le défaut de détection de la réponse immunitaire est due à un problème de présentation de l'antigène somatique au système immunitaire de l'hôte. Bien que les protéines E/S soient présentes dans les antigènes somatiques car sécrétées par le soma, celles-ci peuvent être masquées par d'autres protéines présentant une forte affinité ou présentes en plus grand nombre.

La production des antigènes E/S pose aussi un problème. En effet les parasites sont de petite taille ce qui conduit à une faible production d'antigènes dans la lumière de l'intestin. De

plus des antigènes non souhaités sont produits : il s'agit des antigènes libérés par les segments gravides et les antigènes des parasites morts.

2.1.4. Diagnostic par détection de copro-antigènes

Des méthodes de diagnostic basées sur la mise en évidence de copro-antigènes existent pour d'autres espèces que le cheval. La majorité d'entre elles sont des méthodes ELISA basées sur la production de sérums hyper immuns de lapins obtenus à partir d'antigènes somatiques (Allan *et al.* 1990 / Allan *et al.* 1992) ou à partir d'antigènes excrétés / sécrétés (Deplazes *et al.* 1990). Divers cestodes sont testés ; les tests montrent des sensibilités élevées : par exemple pour *Echinococcus granulosus*, la sensibilité est de 87,5% (Allan *et al.* 1993).

Aucun test basé sur la détection des copro-antigènes n'existe chez les herbivores pour le diagnostic d'infestation par les Anoplocephalidés. Cette méthode est particulièrement intéressante car elle met en évidence des témoins d'une infestation : les antigènes parasitaires. Alors que le diagnostic sérologique détecte une infestation par des témoins indirects : les anticorps.

2.2. Diagnostic post-mortem

Sur animal mort, l'autopsie permet de mettre en évidence les parasites fixés sur la paroi intestinale et les lésions associées.

MATERIEL
ET
METHODES

Objectifs

Il semble que le pouvoir pathogène des anoplocéphales n'est aujourd'hui pas contestable lors de fortes infestations.

De nombreuses études ont évalué les tests de coproscopie classique, mais les résultats donnent une sensibilité limitée pour un bon dépistage.

La recherche d'infestation par analyse sérologique a été mise au point par Proudman *et al.* (1996), mais les résultats de sensibilité ne sont pas ceux escomptés. De plus ces tests sérologiques témoignent d'une immunité vis-à-vis d'*Anoplocephala perfoliata* mais ne distinguent pas un animal infesté d'un animal ayant été infesté par le passé mais indemne lors du prélèvement. La mise en place de l'immunité nécessite aussi quelques semaines pendant lesquelles le taux en anticorps augmente progressivement.

Une autre méthode déjà mise en œuvre pour d'autres espèces de cestode semble particulièrement séduisante. Il s'agit de détecter la présence d'antigènes parasitaires dans les fèces grâce à une technique ELISA. C'est cette dernière technique qui fera le principal objet de notre étude. Cette technique de détection de copro-antigènes présente un intérêt double : d'une part la présence d'antigènes dans les fèces est directement corrélée à une infestation (forme adulte ou immature), d'autre part elle permet de suivre l'efficacité d'un traitement.

L'objectif est de mettre au point un test de détection de copro-antigènes par méthode ELISA indirecte. Ensuite il sera intéressant de comparer les caractéristiques de ce test aux méthodes de coproscopie classiques réalisées en parallèle.

Première partie :

ECHANTILLONNAGE DES FECES

1.1. Nature des échantillons

Les fèces de chevaux sont recueillies dans le rectum de manière à se rapprocher au maximum des conditions de prélèvement sur le terrain (vétérinaire praticien désirant connaître le statut parasitaire du cheval).

1.2. Recrutement des échantillons

Les échantillons sont prélevés sur des chevaux morts, de toutes races et de tous âges (décès naturel ou abattage).

Les sites de prélèvement sont les suivant :

- AFSSA Dozulé Institut du cheval (C. Collobert, N. Hamet)
- Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon : service des autopsies (C. Fleury)
- Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort : service d'anatomie (N. Crevier-Denoix)
- Abattoir de Valenciennes (P. Bausier).

1.3. Récolte des échantillons

Environ 200 grammes de fèces sont récupérés dans le rectum puis répartis dans plusieurs pots à prélèvement préalablement identifiés.

1.4. Conservation, transport

Les échantillons sont conservés à 4°C jusqu'à acheminement au laboratoire de Parasitologie de l'ENVA par colis postal. Les échantillons sont envoyés le plus rapidement possible.

Une fois parvenus au laboratoire, les échantillons sont séparés en deux lots :

- un lot destiné à l'examen coproscopique (conservé à 4°C)
- un lot destiné aux tests de détection des copro-antigènes (conservé à -80°C).

1.5. Informations complémentaires

Chaque échantillon est accompagné des informations suivantes :

- date du prélèvement
- sexe du cheval
- race
- âge
- quantité de parasites retrouvés au niveau de la valvule iléo-caecale.

<p style="text-align: center;">Deuxième partie : REALISATION DE COPROSCOPIES SUR FECES DE CHEVAL</p>

I. Principe de l'examen coproscopique

Le but d'un examen coproscopique est de mettre en évidence par des méthodes simples, rapides et peu coûteuses la présence d'éléments parasitaires dans les fèces.

La coproscopie ne prétend pas mettre en évidence tous les parasites du tube digestif ; elle permet juste de montrer la présence de témoins du parasitisme, les œufs, dans le cas d'*Anoplocephala perfoliata*. Il conviendra alors d'interpréter les résultats négatifs avec la plus grande prudence.

1.1. Principe de la méthode par flottation

Le principe de cette méthode est de diluer le prélèvement dans une solution de densité élevée afin de concentrer les éléments parasitaires de densité inférieure à la surface du liquide.

1.2. Principe de la méthode de Proudman & Edwards (1992)

Cette méthode associe le principe de la centrifugation où les œufs plus denses que le liquide sont amenés par gravité au fond du tube et le principe de la flottation détaillé plus haut.

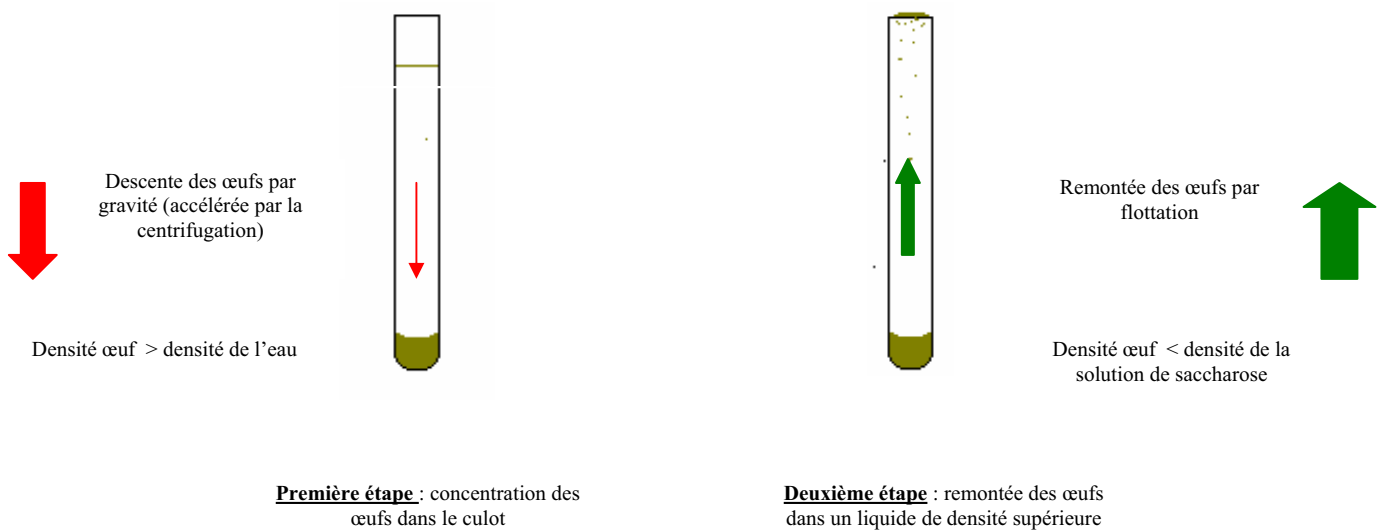


Figure 4 : schématisation de la méthode centrifugation / flottation

II. Méthodes simples : méthode de flottation qualitative et quantitative

2.1. Matériel

- gants (obligatoire)
- éprouvette
- becher
- agitateur
- passoire à thé
- sulfate de magnésium saturé $\text{MgSO}_4 \text{ sat}$
- tubes à essais
- lames porte-objet
- lamelles couvre-objet
- pasteurette plastique
- petits tubes à essais

- cellules de Mac Master

2.2. Procédure

- peser 5 g de fèces dans l'éprouvette
 - ajouter 75 ml de $Mg\ SO_4$ saturé
 - bien mélanger avec l'agitateur
 - mettre un tamis sur le bécher
 - verser dans le tamis
 - broyer
 - prélever avec une pasteurette du liquide de broyat
 - remplir la cellule de Mac Master en évitant de faire des bulles (méthode quantitative)
 - attendre 5 minutes avant de faire la lecture
- pendant ce temps,
- dans un petit tube à essais, verser du liquide broyat jusqu'à former un dôme (méthode qualitative),
 - déposer une lamelle,
 - effectuer la lecture (objectif 10).

III. Méthode de centrifugation / flottation

Cette technique a été mise au point et validée par Proudman & Edwards (1992)

1.1. Matériel

- Gants (obligatoire)
- Epprouvette
- Becher
- Agitateur
- Passoire à thé
- Tubes à essais
- Lames porte-objet

- Lamelles couvre-objet
- Pipette Pasteur plastique
- Tubes à essais de 10 ml
- Solution de saccharose à saturation
- Centrifugeuse

1.2. Procédure

- Prélever 40 g de fèces, mélanger dans 5 à 10 ml d'eau pour obtenir une consistance pâteuse
- Filtrer au travers d'un tamis grossier
- Transférer le liquide dans deux tubes à centrifuger de 10 ml
- Centrifuger 10 minutes à 1200 g
- Eliminer le surnageant
- Récupérer le culot de centrifugation et le remettre en suspension dans de l'eau
- Centrifuger 10 minutes à 1200 g
- Eliminer le surnageant
- Récupérer le culot de centrifugation et le remettre en suspension dans une solution de sucre saturée (450g de saccharose dans 350 ml d'eau tiède) → densité = 1,3 à 20°C
- Centrifuger 10 minutes à 1200 g
- Remplir les tubes avec la solution sucrée jusqu'à l'obtention d'un ménisque
- Appliquer une lamelle sur chaque tube
- Attendre 2 heures
- Lire au microscope la lamelle objectif X10

<p style="text-align: center;">Troisième partie : MISE AU POINT D'UN TEST ELISA POUR LA DETECTION DE COPRO-ANTIGENES</p>

I. Principe du test ELISA (Enzyme Linked immunosorbent Assay)

L'ELISA est une méthode de détection d'anticorps ou d'antigènes par utilisation d'immunoglobulines couplées à une enzyme. Un ELISA indirect est structuré autour de deux phases réactionnelles : la formation de complexes immuns et la révélation de ces complexes. La première phase est la phase immunologique, la seconde est la phase enzymatique : c'est une réaction chimique catalysée par une enzyme, entraînant la formation d'un composé coloré.

L'enzyme est introduite dans la réaction sous la forme d'un sérum conjugué, qui se lie à l'immun complexe formé dans la première phase. Ce conjugué sert de lien entre la phase immunologique et la phase enzymatique. La densité optique (D.O) du produit (quantification de sa coloration), est mesurée par un densitomètre à une longueur d'onde adéquate.

La quantité d'antigènes ou d'anticorps titrables est proportionnelle

- à la quantité de conjugué fixé,
- à la quantité de produit formé en un temps donné,
- et donc à la mesure de la densité optique obtenue. Cette mesure est ainsi fonction du titre en antigènes ou d'anticorps de l'échantillon.

Nous utilisons un test ELISA indirect dont le principe est le suivant :

L'antigène à doser est fixé au fond d'un puits en plastique d'une plaque à micro-titration. Il s'agit du « coating ».

Les zones non recouvertes par cet antigène sont ensuite saturées au moyen d'une solution de protéines (albumine).

Après lavage, les anticorps dirigés contre l'antigène à doser sont déposés et mis à incuber afin de permettre une bonne combinaison antigène / anticorps.

Un nouveau lavage est effectué, suivi du dépôt d'anticorps spécifiques (anticorps anti-Ig G 1) marqués par une enzyme.

Après une incubation, l'anticorps marqué en excès est éliminé par lavage et la solution du substrat pour l'enzyme est alors ajoutée.

La réaction est révélée par le virage de couleur du substrat chromogène de l'enzyme, ou par la mesure de la densité optique du substrat coloré au spectrophotomètre.

La qualité des résultats dépend de :

- la bonne fixation de l'antigène au fond du puits
- la régularité des lavages d'un puits à l'autre
- l'exactitude des volumes de réactifs distribués
- la nature et du pH de la solution tampon utilisée
- la précision des temps d'incubation.

Il est nécessaire d'effectuer des contrôles de validité des réactions en utilisant des contrôles négatifs (puits sans anticorps et puits sans antigènes).

La figure 5 de la page suivante permet d'illustrer les différentes étapes de l'ELISA indirect.

L'ensemble des travaux est réalisé en collaboration avec le laboratoire de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort et la SEPPIC, laboratoire de recherche rattaché à l'UMR Bipar (Biologie moléculaire et Immunologie Parasitaires et fongiques) au sein de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

Le laboratoire de parasitologie participe au stockage et à la préparation des échantillons de fèces.

La SEPPIC s'occupe de la partie ELISA en fournissant le matériel (plaques, réactifs, pipettes...) et met à notre disposition centrifugeuses, étuve, spectrophotomètre...

Les souris productrices d'anticorps sont élevées dans l'animalerie de l'AFSSA Alfort.

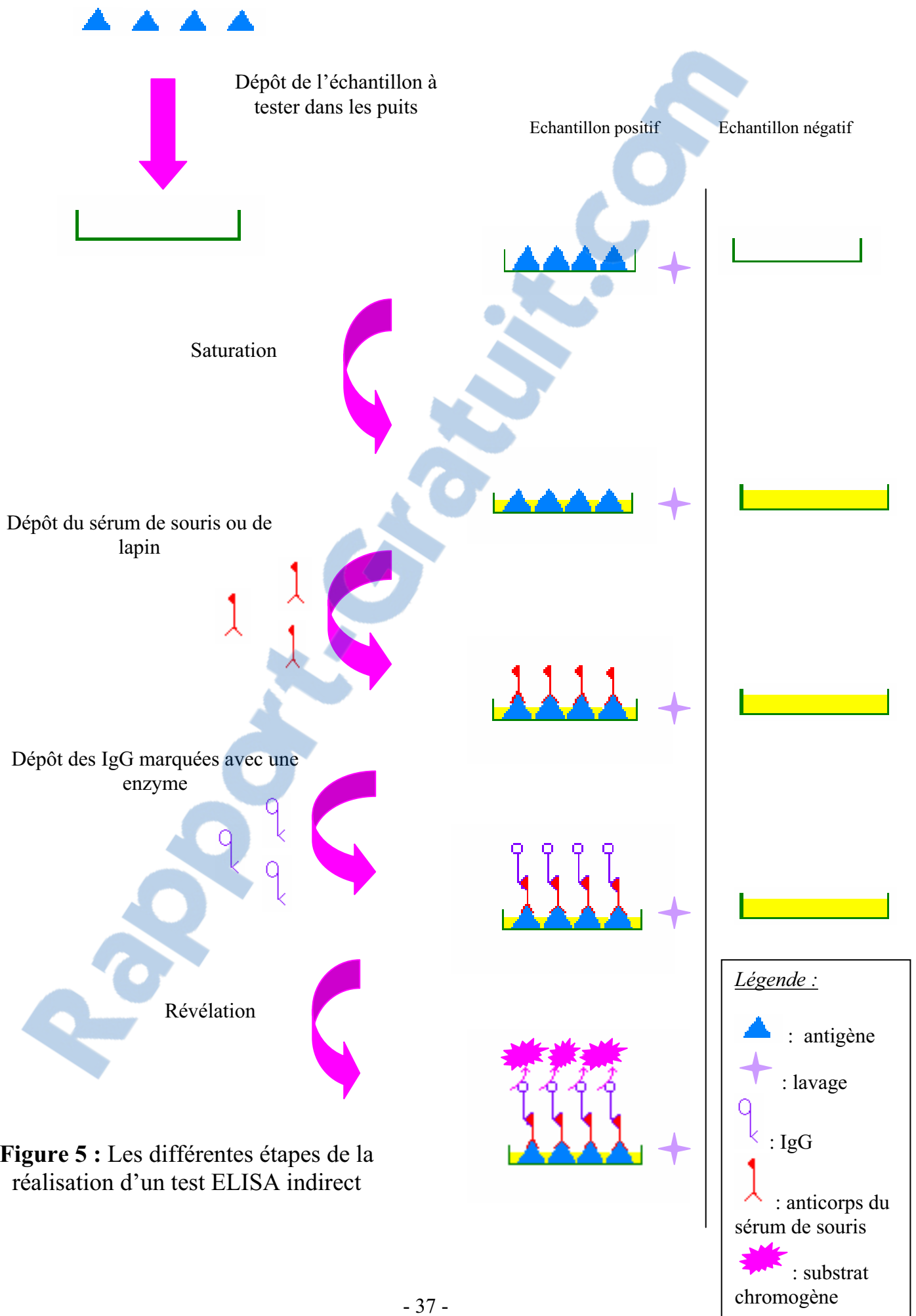


Figure 5 : Les différentes étapes de la réalisation d'un test ELISA indirect

II. Production des antigènes parasitaires

2.1. Production d'antigènes à partir des parasites entiers

Des vers adultes d'*Anoplocephala perfoliata* sont prélevés puis immédiatement congelés sur le site de l'AFSSA Dozulé. Une fois parvenus au laboratoire de Parasitologie de l'ENVA, les parasites sont lavés et examinés à la loupe binoculaire afin de retirer d'éventuels fragments de muqueuse intestinale de cheval restés fixés sur les ventouses. Il est en effet important de ne pas avoir d'antigènes de l'hôte dans la solution qui est inoculée aux souris.

Les différentes études (Allan *et al.* 1990 / Allan *et al.* 1992) sur la recherche de copro-antigènes de cestodes chez de nombreuses espèces utilisent des antigènes provenant du scolex plutôt que ceux provenant des segments ovigères. Deux types de solutions antigéniques sont donc préparées pour notre étude :

- une solution antigénique à base de scolex uniquement (solution S)
- une solution antigénique à base de parasites entiers (scolex + premiers segments : solution P).

1) Huit scolex sont prélevés et placés dans un tube à hémolyse afin d'effectuer 4 rinçages successifs avec la solution de rinçage.

2) Dans un autre tube à hémolyse, quatre parties antérieures (scolex + premiers segments) subissent les mêmes rinçages.

Composition de la solution de rinçage :

- PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,2
- 200 UI/ml de pénicilline
- 100 µg/ml de gentamicine

Une fois ces rinçages effectués, les deux extraits de parasites sont broyés séparément dans un mortier en présence d'un tampon de lyse.

Composition du tampon de lyse :

- Saccharose 0,25M
- EDTA disodique 1 mM
- Acide nitrolo-triacétique 40mM

Afin d'obtenir une lyse totale des cellules et la libération des antigènes, chaque solution subit :

- plusieurs chocs thermiques : 20 minutes à -80°C puis 30 minutes à 37°C et enfin 20 minutes à 4°C
- un passage au sonificateur pendant 5 minutes.

Pour éliminer les débris cellulaires, les deux solutions sont ultra-centrifugées :

- 15 minutes à 10000 tours / min
- 15 minutes à 100000 tours / min

On récupère enfin le surnageant qui constituera la solution antigénique d'immunisation.

2.2. Production d'antigènes excrétés / sécrétés

2.2.1. Premier essai de production d'antigènes excrétés / sécrétés

Des parasites adultes sont prélevés sur trois chevaux (juste après abattage) au niveau de la valvule iléo-cæcale. Ils ont ensuite été acheminés au laboratoire dans du contenu cæcal afin de les maintenir à température de 38°C (Proudman *et al.* 1996).

Deux cent parasites sont ainsi prélevés et maintenus en vie. Les mouvements de péristaltisme et leur capacité d'attachement sont les témoins de la survie des vers.

Les parasites sont ensuite lavés plusieurs fois de la manière suivante :

- 1) Premier lavage avec une solution de chlorure de sodium à 0,9%.
- 2) Puis trois lavages avec la solution de lavage n°1
- 3) Puis deux lavages avec du chlorure de sodium à 0,9%.

solution n°1 : (Proudman et al. 1996)

- NaCl 0,9%
- 2.5 mg/ml de glucose
- 200 UI de pénicilline
- 200 µg/ml de gentamicine

L'ensemble de ces opérations de lavage dure environ une heure. Toutes les solutions sont maintenues à 38°C de manière à garder les parasites vivants. Les parasites de ce prélèvement sont de taille très hétérogène : 0,5 à 4 centimètres de long (formes matures et immatures).

Les 200 parasites sont ensuite mis en incubation pendant 18 heures à 38°C dans la solution n°2 stérile.

Solution n°2 (100ml)

- NaCl 0,9% 95ml
- glucose 5 % 5ml

Au bout des 18 heures d'incubation, les parasites sont tous morts et un examen au microscope montre la présence de très nombreuses bactéries. Il est alors décidé de reprendre la culture des parasites en diminuant le temps d'incubation et en ajoutant des antibiotiques à la solution n°2.

2.2.2. Deuxième essai de production d'antigènes excrétés / sécrétés

De nouveaux prélèvements de parasites sont effectués à l'abattoir. Cette fois-ci, les parasites sont transportés dans le cæcum et son contenu afin d'optimiser les chances de survie. En effet il semble que les mouvements de péristaltisme soient plus nombreux lorsque les vers restent attachés à la muqueuse intestinale pendant le transport.

Cinquante cinq parasites sont ainsi prélevés sur trois chevaux infestés.

Une fois arrivés au laboratoire, les parasites sont lavés pendant 40 minutes tout en les maintenant à 38°C.

Etapas des lavages :

- 1) Premier lavage avec une solution de chlorure de sodium à 0,9%.
- 2) Puis six lavages avec la solution de lavage n°3

Solution n°3 (Proudman & Trees, 1996) :

- *NaCl 0,9%*
- *2.5 mg/ml de glucose*
- *200 UI/ml de pénicilline*
- *200 µg/ml de gentamicine*
- *streptomycine 200 µg/ml*

Les 55 parasites sont ensuite mis à incuber dans une solution n°4 stérile pendant 5 heures.

Solution n°4 : (100ml)

- *PBS pH 7,2*
- *Pénicilline 200 UI/ml*
- *Streptomycine 200 µg/ml*
- *Gentamicine 200 µg/ml*

Une fois l'incubation terminée, les parasites sont éliminés et la solution est filtrée :

- Premier passage dans un filtre à 0,45 µm
- Deuxième passage dans un filtre à 0,2 µm.

La solution filtrée est ensuite recueillie dans un tube stérile et mis au congélateur à -18°C.

Cette dernière solution constituera notre solution antigénique .

2.3. Dosage des solutions antigéniques

Le dosage des solutions antigéniques est réalisé grâce à une gamme étalon à l'ovalbumine et à un kit de dosage : MICRO BC ASSAY (UPTIMA).

III. Production de sérums

3.1. Immunisation des souris

La production des sérums immuns est réalisée en deux étapes :

- 1) un premier essai avec les solutions antigéniques S et P
- 2) un deuxième essai avec la solution antigénique E/S

Le protocole d'immunisation est le même pour les trois lots de souris.

Les trois solutions d'antigènes préparées sont inoculées aux souris de type OF1. Les solutions sont injectées par voie sous-cutanées à trois lots de 25 souris OF1 femelles de 18 à 20 g.

Afin de déterminer la quantité de solution à injecter, il est nécessaire de connaître la concentration des solutions antigéniques S, P et E/S. On suppose que la majorité des antigènes sont des protéines.

Par ailleurs, un adjuvant, permettant d'émulsionner les solutions S, P et E/S, est ajouté afin d'augmenter le pouvoir immunogène des solutions. L'adjuvant (MONTANIDE IAS 70^R) nous est fourni par la société SEPPIC.

3.2. Evaluation de l'immunisation

A J₀₊₁₈ un premier prélèvement sanguin sur les deux lots de souris S et P permet de titrer les anticorps sécrétés. Le sérum est récupéré après deux centrifugations successives à 3500 tours/min.

A J₀₊₂₁, les lots de souris S et P sont immunisées à nouveau avec les solutions antigéniques S et P afin de relancer la réponse immunitaire.

Les souris du groupe E/S ne seront pas immunisées une nouvelle fois à J₂₁.

Les trois lots de souris feront l'objet d'une prise de sang finale à J₃₀ pour évaluer leur réponse immunitaire.

Dosage des anticorps :

Ce dosage des anticorps est réalisé grâce à une technique ELISA. Le protocole utilisé est le suivant :

1) fixation des antigènes des solutions S, P et E/S.

Les solutions antigéniques diluées au centième sont déposées dans chaque puits de 100µl puis mis en incubation pendant 2 heures à 37°C

2) 5 rinçages successifs avec un tampon eau distillée-tween

3) dépôt dans chaque puits de 200 µl d'une solution de saturation pendant 30 minutes à 37°C.

4) préparation des sérums supposés contenir les anticorps spécifiques.

Les dilutions de sérum au 1/10, 1/100 et 1/1000 sont effectuées avec le tampon de saturation. Ceci permet de connaître le seuil de détection de notre test ELISA.

5) dépôt de 20 µl de solution de saturation dans les puits A1, A5 et A9 qui servent de « blanc ».

Dépôt de 100 µl de tampon de saturation dans les lignes B, C, D, E, F, G, H pour la préparation de dilutions en série des sérums (Tableau I).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blanc	SérumP 1/10	SérumP 1/100	Sérum P 1/1000	blanc	SérumS 1/10	SérumS 1/100	Sérum S 1/1000	blanc	Ovalb 1/10	Ovalb 1/100	Ovalb 1/1000
B	“	1/20	1/200	1/2000	“	1/20	1/200	1/2000	“	1/20	1/200	1/2000
C	“	1/40	1/400	1/4000	“	1/40	1/400	1/4000	“	1/40	1/400	1/4000
D	“	1/80	1/800	1/8000	“	1/80	1/800	1/8000	“	1/80	1/800	1/8000
E	“	1/160	1/1600	1/16000	“	1/160	1/1600	1/16000	“	1/160	1/1600	1/16000
F	“	1/360	1/3600	1/36000	“	1/360	1/3600	1/36000	“	1/360	1/3600	1/36000
G	“	1/640	1/6400	1/64000	“	1/640	1/6400	1/64000	“	1/640	1/6400	1/64000
H	“	1/1280	1/12800	1/128000	“	1/1280	1/12800	1/128000	“	1/1280	1/12800	1/128000

Tableau I : dépôt de sérum immun de souris des lots S et P (Plan de plaque)

- 6) 5 rinçages successifs avec un tampon eau distillée-tween ;
- 7) révélation avec de l'o.p.d (SIGMA) ;

Dépôt de 100µl d'anticorps anti-IgG1 sur une plaque et dépôt de 100µl d'anticorps anti-IgG2a sur la seconde plaque (dilution au 1/6000 de la solution mère de chacune des deux IgG).

Incubation pendant 1 heure à 37°C.

Remarque : les IgG1 permettent d'évaluer la réponse humorale et les IgG2, la réponse cellulaire de la réaction immunitaire.

- 5 rinçages successifs avec un tampon eau distillée-tween
- dépôt de tampon de révélation : 200µl par puits
- puis arrêt de la réaction enzymatique par l'acide sulfurique à 12,5 %

La densité optique de chaque puits est ensuite mesurée et comparée à la densité de la solution d'ovalbumine. Ceci permet de déterminer le titre en anticorps des sérums S, P et E/S.

IV. Utilisation des techniques avec des fèces de cheval

Un premier essai du test est réalisé à partir de fèces d'un cheval très fortement parasité (D1127) et d'un autre cheval non parasité (D1128) ; liste des échantillons page 61.

.

4.1. Traitement des échantillons de fèces

4.1.1. Premier essai de traitement des fèces

Ce premier essai de traitement des fèces est utilisé pour les tests ELISA avec les antigènes totaux et les antigènes excrétés / sécrétés.

Les fèces (échantillons D1127 pour le positif et échantillon D1128 pour le négatif) sont décongelés à 4°C.

On utilise deux solutions de nature physico-chimique différente ne connaissant pas la solubilité des copro-antigènes :

- Phase aqueuse : 10 g de fèces sont placés dans 10 ml de tampon de prélèvement aqueux
- Phase hydrophobe : 10 g de fèces pour 10 ml de tampon de prélèvement SM04974

- a) écraser les fèces dans les tampons
- b) centrifuger à 13000 t/min pendant 5 minutes et récupérer le maximum de surnageant
- c) centrifuger à 13000 t/min pendant 5 minutes et récupérer le surnageant

4.1.2. Deuxième essai de traitement des fèces.

Cette deuxième technique de traitement des fèces est appliquée pour l'ELISA mis au point à partir des antigènes excrétés / sécrétés.

Les fèces (échantillons D1258 pour le positif et échantillon D1247 pour le négatif) sont décongelés à 4°C.

On utilise trois solutions de dilution des fèces différentes :

- 1. le tampon de fixation
- 2. un tampon hydrophobe
- 3. un tampon hydrophile (Tween-NaCl)

On prélève 10g de fèces pour 15ml de tampon.

- a) écraser les fèces dans les tampons
- b) centrifuger 10 minutes à 3000 tours /min
- c) récupérer le surnageant
- d) centrifuger 10 minutes à 3000 tours /min
- e) récupérer le surnageant
- f) centrifuger 1ml de surnageant 10 minutes à 13000 tours /min
- g) récupérer le surnageant (on retrouve environ 3,5 ml par tampon)
- h) concentration sur colonne « minicon » pour concentrer 10 fois (on retrouve 200µl par tampon)

4.2. Dosage ELISA des antigènes contenus dans le surnageant

On utilise une plaque pour l'échantillon positif et une plaque pour l'échantillon négatif.

- a) Fixation des surnageants : diluer au $\frac{1}{2}$ les échantillons en tampon de fixation et réaliser des dilutions sériées au demi. Réaliser une fixation de l'antigène scolex (dilution de l'antigène en tampon de fixation 1/100) et une fixation antigène total (dilution de l'antigène en tampon de fixation 1/100) et une fixation de l'antigène E / S. Déposer 100 μ l dans chaque puits, incuber 2 heures à 37°C.
- b) lavage des plaques : 5 lavages en tampon de lavage.
- c) Saturation des plaques : déposer 200 μ l de tampon de saturation dans chaque puits. Incuber 30 minutes à 37°C.
- d) Dépôts des sérums immuns de souris dilués en tampon de saturation. Sérum anti-scolex (dilué au 1/1000) et sérum anti-parasite total (dilué au 1/500), on dépose 100 μ l de tampon de saturation dans les blancs ; incuber 1 heure à 37°C.
- e) lavage des plaques : 5 lavages en tampon de lavage.
- f) dépôt des anticorps anti-Ig G1 dilués au 1/6000 en tampon de saturation. Incuber 1 heure à 37°C.
- g) lavage des plaques : 5 lavages en tampon de lavage.
- h) Révélation (opd SIGMA).

Voir en annexe I la composition des solutions tampons.

4.3. Modification de différents paramètres

4.3.1. Action sur la température

La température d'incubation est modifiée, on travaille à 4°C. La température joue un rôle sur la conformation des protéines. Ainsi on agit sur la conformation des antigènes et des anticorps pour modifier la réaction antigène / anticorps.

4.3.2. Action sur les supports de plaque

Les tests ELISA sont effectués sur deux types de plaque :

- sur plaque « Maxisorp » qui sont les plaques classiquement utilisées.
- sur plaque « Immulon » qui sont des plaques spécifiques de molécules hydrophobes.

4.3.3. Changement du type de révélation

Le type de révélation est modifié pour le deuxième essai de traitement des fèces. Il s'agit du TMB Single solution ZIMED 00-2023.

Cette révélation est moins dangereuse pour les manipulateurs et un peu plus sensible que celle utilisant l'o.p.d SIGMA.

RESULTATS

Première partie : ECHANTILLONNAGE

I. Caractéristique de l'échantillon des chevaux de l'étude :

Notre protocole inclut 49 chevaux dont on connaît l'âge, le sexe, la race et le niveau d'infestation.

2.1. Répartition des animaux

2.1.1. Répartition suivant leur âge

Nombre	3	2	6	4	2	4	7	4	1	1	3	2	1	2	2			1		1	2			1
âges	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

Tableau II : répartition des classes d'âge (Les âges sont donnés en années.)

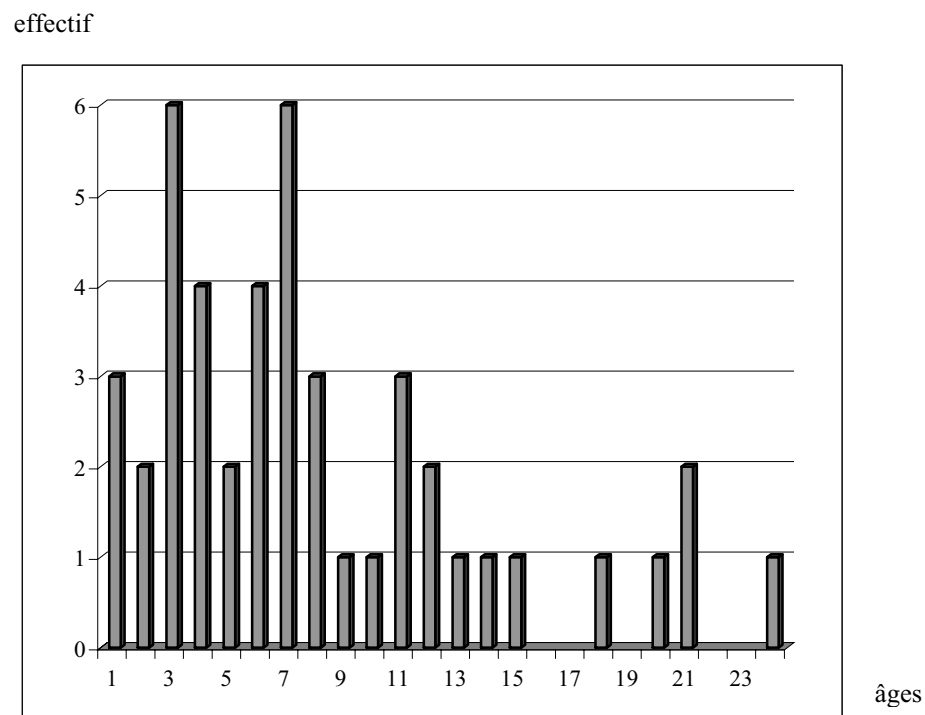


Figure 6 : Répartition en fonction de l'âge

Mâle	Hongre	Femelle
3	16	30

Tableau III : répartition en fonction du sexe

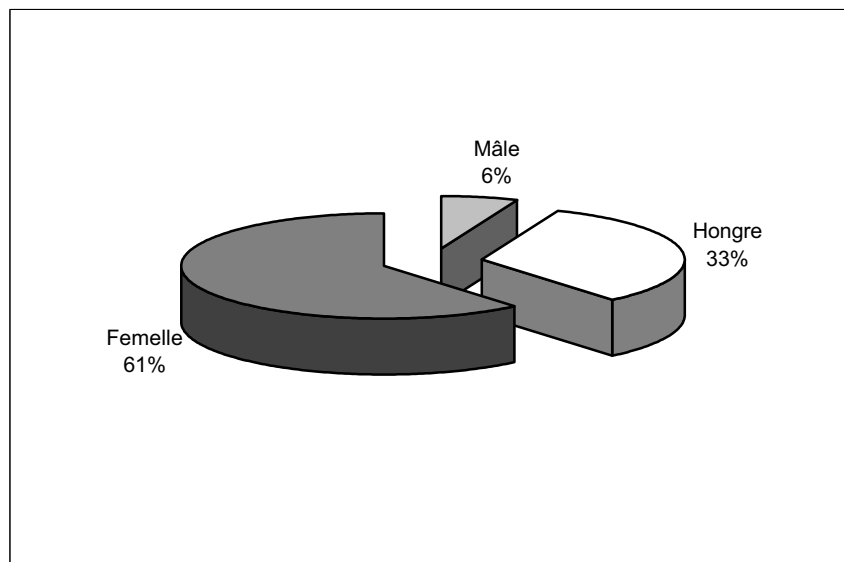


Figure 7 : Répartition en fonction du sexe

2.1.3. Répartition suivant la race

Races	Effectif
Selle français (SF)	17
Cheval de selle (CS)	10
Cheval de trait	2
poney	8
andalou	1
Pur sang anglais (PS)	3
Pur sang arabe (PSA)	1
Trotteur français (TF)	4
Quater horse (QH)	1
Paint horse (PH)	1
frison	1

Tableau IV : répartition en fonction de la race

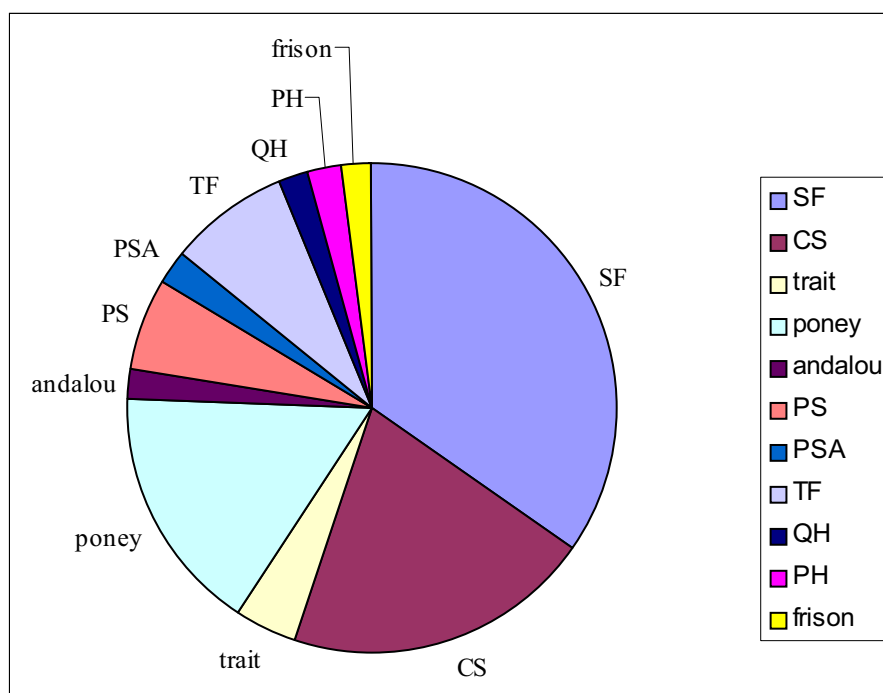


Figure 8 : Répartition en fonction de la race

2.1.4. Répartition en fonction du degré d'infestation

Nombre de parasite	0	1<n<20	21<n<100	101<n<500	n>501
Répartition	24	4	5	12	1

Tableau V: répartition en fonction du niveau d'infestation

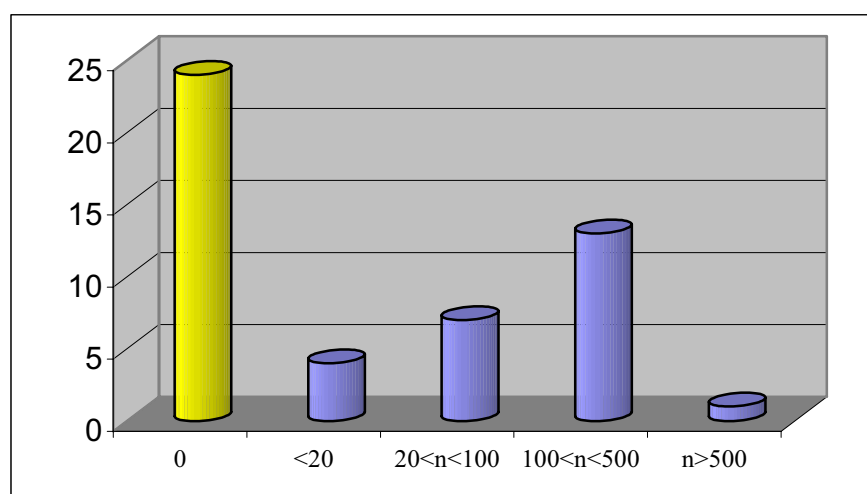


Figure 9 : Répartition en fonction du niveau d'infestation

2.1.5. Répartition en fonction des dates de prélèvement

janvier	février	mars	avril	mai	juin	juillet	août	septembre	octobre	novembre	décembre
3	7	7	8	1			1	3	9	5	5

Tableau VI : répartition des prélèvements en fonction de la date

Les prélèvements ont lieu en automne et hiver, au moment où nous avons le plus de chance de trouver des animaux parasités. Un des principaux objectifs de l'étude était de trouver suffisamment d'échantillon pour pouvoir dégager une conclusion.

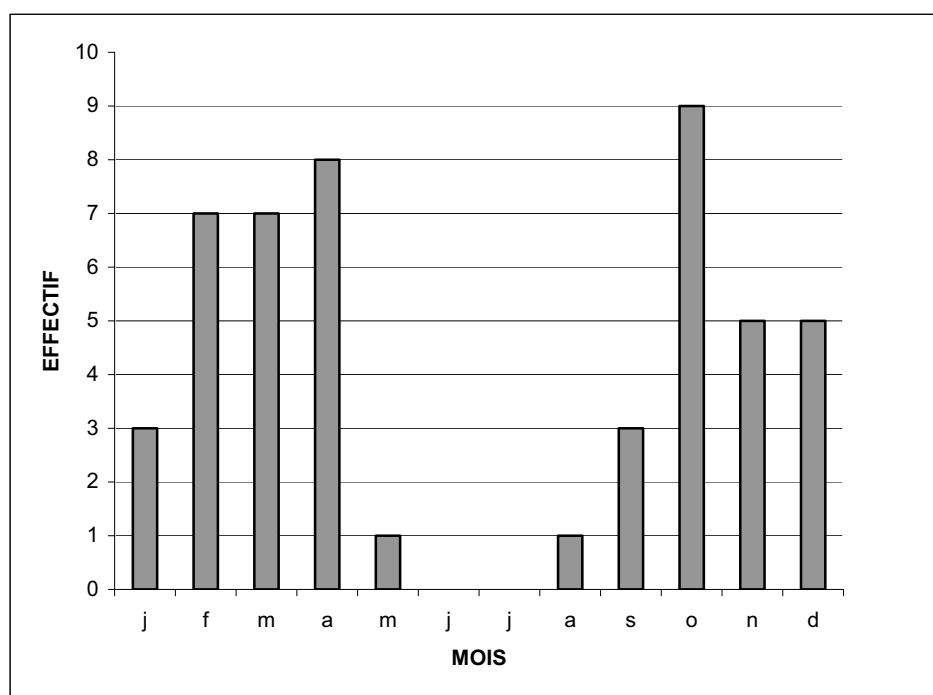


Figure 10 : Répartition en fonction des dates de prélèvement

Deuxième partie : REALISATION DE COPROSCOPIES SUR FECES DE CHEVAL

I. Résultats des différentes méthodes

L'ensemble des résultats des analyses coproscopiques est donné dans le tableau suivant :

N°	Date	commémoratifs	nombre de ténias	Mac Master	Flottation	Proudman
1	02/08/2002	F TF 1an	38	-	+	+
2	27/09/2002	M QH 20 ans	296	+	+	-
3	21/10/2002	F PSA 18 mois	>100	-	-	-
4	21/10/2002	H PH 2 ans	20 à 30	-	-	-
5	22/10/2002	F CS 21 ans	>500	-	-	-
6	24/10/2002	F PS 3 ans	2	-	-	-
7	29/10/2002	F poney 7 ans	16	-	-	-
8	03/11/2002	H SF 11 ans	348	+	+	+
9	10/12/2002	M andalou 6 ans	>100	-	-	-
10	17/01/2003	F PS 18 mois	30	-	-	-
11	30/01/2003	H CS 4 ans	454	+	+	+
12	05/02/2003	F CS 11 ans	20	-	-	-
13	05/02/2003	F trait 3 ans	>100	-	-	+
14	18/02/2003	F SF 8 ans	>100	+	+	+
15	18/02/2003	F poney 6 ans	>150	-	-	+
16	17/03/2003	F SF 3ans	13	-	-	-
17	18/03/2003	H PS 7ans	>100	-	-	+
18	25/03/2003	F poney 11ans	15	-	-	+
19	25/03/2003	F CS 4ans	>100	+	-	+
20	25/03/2003	F CS 14 ans	52	+	-	-
21	01/04/2003	H poney 7ans	20	+	+	+
22	01/04/2003	F SF 4ans	>100	+	+	+
23	08/04/2003	F SF 8 ans	>100	-	-	+
24	24/04/2003	F CS 15 ans	35	-	-	+
25	05/05/2003	F poney 14 ans	250	-	-	+
26	27/09/2002	F SF 3 ans	0	-	-	+
27	27/09/2002	H SF 3 ans	0	-	-	-
28	21/10/2002	F SF 9 ans	0	-	-	-
29	21/10/2002	F SF 7 ans	0	-	-	-
30	22/10/2002	H SF 6 ans	0	-	-	-
31	21/10/2002	H SF 24 ans	0	-	-	-
32	03/11/2002	H SF21 ans	0	-	-	-
33	03/11/2002	H TF 15 ans	0	-	-	-
34	03/11/2002	H frison 5 ans	0	-	-	-
35	20/11/2002	F SF 8 ans	0	-	-	-
36	03/12/2002	M poney 7 ans	0	-	-	-

N°	Date	commémoratifs	quantité de ténias	Mac Master	Flottation	Proudman
37	03/12/2002	H CS 4 ans	0	-	-	-
38	03/12/2002	F TF 6 ans	0	-	-	-
39	10/12/2002	F poney 12 ans	0	-	-	-
40	30/01/2003	F TF 21 mois	0	-	-	-
41	18/02/2003	F SF 7 ans	0	-	-	-
42	18/02/2003	F trait 3 ans	0	-	-	-
43	18/02/2003	F CS 13 ans	0	-	-	-
44	25/03/2003	H SF8ans	0	-	-	-
45	25/03/2003	H CS 18ans	0	-	-	-
46	01/04/2003	H SF 5ans	0	-	-	-
47	01/04/2003	F CS 12 ans	0	-	-	-
48	01/04/2003	H poney 10ans	0	-	-	-
49	08/04/2003	F SF 7 ans	0	-	-	-

Tableau VII : résultats des examens de la valvule iléo-cæcale et des analyses coproscopiques

Abréviations :

Selle français	SF
Cheval de selle	CS
Cheval de trait	Trait
Pur sang anglais	PS
Pur sang arabe	PSA
Trotteur français	TF
Quarter horse	QH
Paint horse	PH
femelle	F
Hongre	H
entier	M

II. Etude de la sensibilité, spécificité des méthodes d'analyse coproscopique

2.1. Définitions

2.1.1. Sensibilité

C'est l'aptitude d'un test à fournir une réponse positive chez un individu infesté. Elle s'estime par la proportion d'individus infestés fournissant une réponse positive au test.

On la calcule de la façon suivante :

$$\text{Sensibilité} = \frac{\text{Vrais positifs}}{\text{Vrais positifs} + \text{faux négatifs}}$$

2.1.2. Spécificité

C'est l'aptitude d'un test à fournir une réponse négative chez un individu indemne. Elle s'estime par la proportion d'individus indemnes fournissant une réponse négative au test.

On la calcule de la façon suivante :

$$\text{Sensibilité} = \frac{\text{Vrais négatifs}}{\text{Vrais négatifs} + \text{faux positifs}}$$

2.2. Résultats des analyses coproscopiques

2.2.1. Méthode de flottation simple

	infectés	indemnes	
+	8	0	8
-	17	24	41
	25	24	

Sensibilité 32,00%
Spécificité 100,00%

Tableau VIII : Calcul de la sensibilité, de la spécificité

2.2.2. Méthode de flottation quantitative : « Mac Master »

	infectés	indemnes	
+	7	0	7
-	18	24	42
	25	24	

Sensibilité 28,00%
Spécificité 100,00%

Tableau IX : Calcul de la sensibilité, de la spécificité

2.2.3. Méthode de flottation centrifugation de « Proudman » (1992)

	infectés	indemnes	
+	14	0	15
-	11	24	34
	25	24	

Sensibilité 56,00%
Spécificité 100,00%

Tableau X : Calcul de la sensibilité, de la spécificité

La figure 11 permet de récapituler ces valeurs.

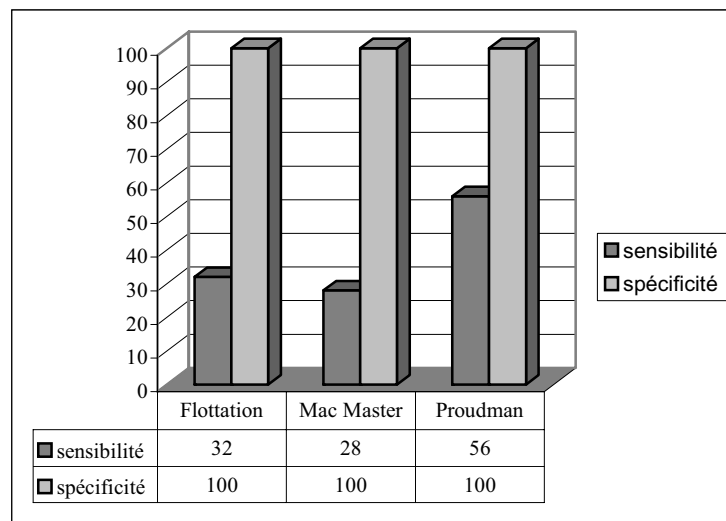


Figure 11 : Sensibilité et spécificité en fonction des diverses méthodes

III. Etude des valeurs prédictives

3.1 Définitions

3.1.1. Valeur prédictive positive

La valeur prédictive d'un résultat positif peut se définir comme : la proportion des vrais positifs parmi l'ensemble des réponses positives fournies par un test de dépistage,

Ou bien

La probabilité qu'une réponse positive à un test de dépistage corresponde bien à un organisme infesté.

On la calcule de la manière suivante :

$$VPP = \frac{\text{Vrais positifs}}{\text{Vrais positifs} + \text{faux positifs}}$$

3.1.2. Valeur prédictive négative

La valeur prédictive d'un résultat négatif peut se définir comme : la proportion des vrais négatifs parmi l'ensemble des réponses négatives fournies par un test de dépistage,

Ou bien

La probabilité qu'une réponse négative à un test de dépistage corresponde bien à un organisme indemne.

On la calcule de la manière suivante :

$$VPP = \frac{\text{Vrais négatifs}}{\text{Vrais négatifs} + \text{faux négatifs}}$$

3.2 Résultats des analyses coproscopiques :

	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
Méthode de flottation simple	1	0,58
Méthode de flottation quantitative : Mac Master	1	0,57
Méthode de flottation centrifugation de Proudman	1	0,67

Tableau XI: Valeurs prédictives des diverses méthodes

La figure 12 permet de récapituler les valeurs prédictives des différentes méthodes.

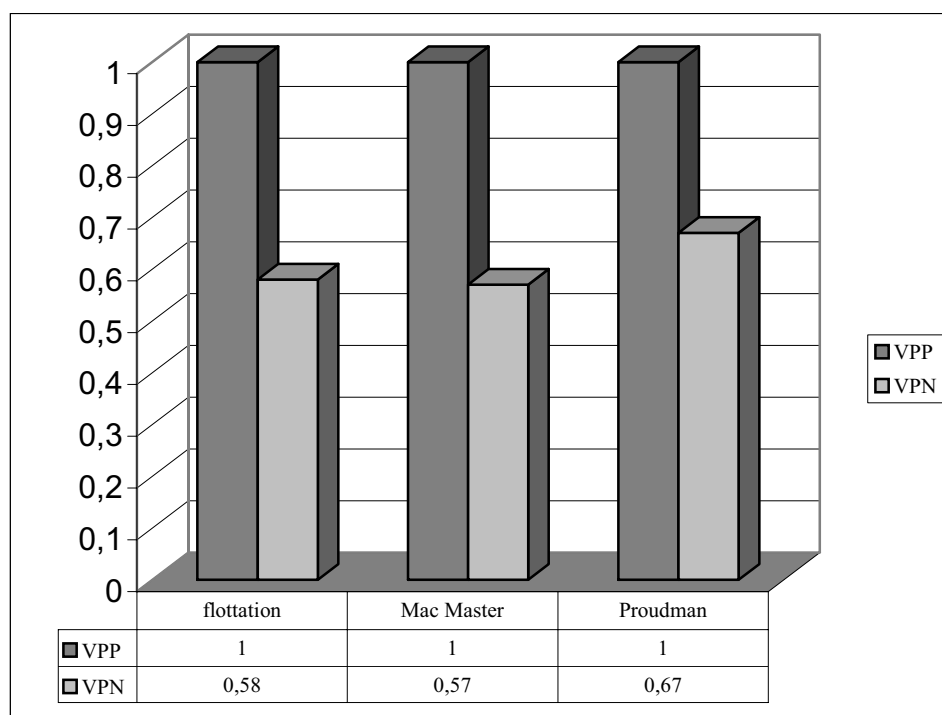


Figure12 : Comparaison des valeurs prédictives des différentes techniques coproscopiques

Troisième partie : MISE AU POINT D'UN TEST ELISA POUR LA DETECTION DE COPRO-ANTIGENES

I. Production des antigènes parasites

1.1. Dosage des solutions antigéniques

Avant d'immuniser les souris avec les solutions antigéniques, il convient de déterminer le titre en protéines de chaque solution afin de calculer la dose à injecter aux souris.

La détermination de la concentration des solutions antigéniques est établie à partir d'une gamme étalon à l'ovalbumine et du kit de dosage.

Concentration en mg/ml	1	0,5	0,25	0,1	0,005	0,001	0
Densité optique	1,174	0,662	0,348	0,162	0,08	0,008	0,002

Tableau XII : gamme étalon à l'ovalbumine (pour les solutions S et P)

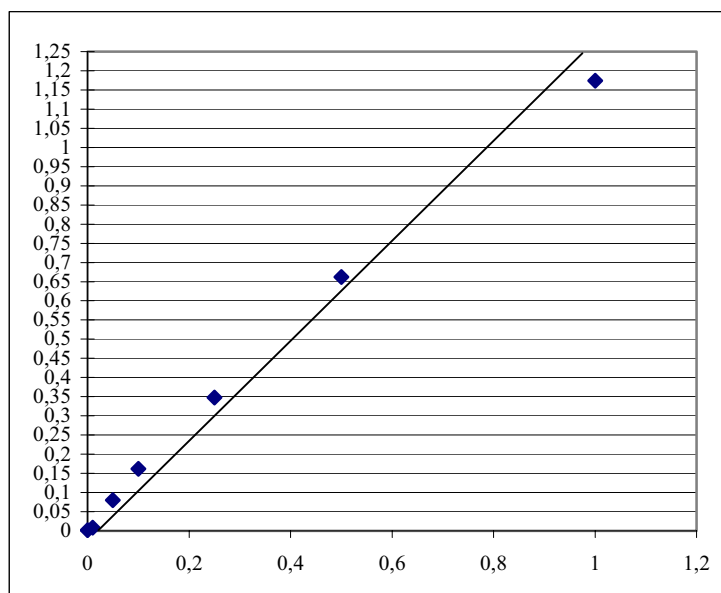


Figure13 : Gamme étalon à l'ovalbumine pour le dosage des solutions antigéniques S et P

Equation de la droite de régression : $Y_{S \text{ et } P} = 1.3196X + 0.0102$.

Coefficient de corrélation = 0,999.

Concentration en mg/ml	2	1	0,75	0,5	0,25	0,1	0,02	0
Densité optique	1,922	1,319	0,953	0,654	0,259	0,154	0,103	0,06

Tableau XIII : gamme étalon à l'ovalbumine (pour la solution E/S)

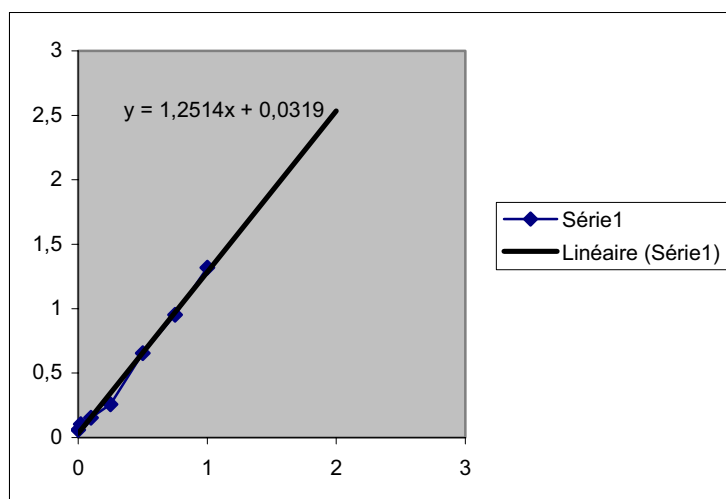


Figure 14 : Gamme étalon à l'ovalbumine pour le dosage de la solution antigénique E/S

Equation de la droite de régression : $Y_{E/S} = 1.2514X + 0.0319$.

Coefficient de corrélation = 0,999.

La valeur de la densité optique lue nous permet d'obtenir directement la concentration de la solution.

	Densité optique	Concentration de la solution
Solution S	0,665	0,54 mg/ml
Solution P	1,664	1,95 mg/ml
Solution E/S	0,697	0,904 mg/ml

Tableau XIV : Concentration des solutions antigéniques

1.2. Calcul des doses à injecter aux souris

Solution S (concentration = 0,54 mg/ml) :

On injecte 50 µg d'antigènes par souris. La solution d'immunisation a un volume de 100µl et comprend 70% d'adjuvant MONTANIDE ISA 70^R.

Solution P (concentration = 1,95 mg/ml) :

On injecte 15 µg d'antigènes par souris. La solution vaccinale a un volume de 100µl et comprend 70% d'adjuvant MONTANIDE ISA 70^R.

Solution E/S (concentration = 0,904 mg/ml) :

On injecte 10 µg d'antigènes par souris. La solution vaccinale a un volume de 100µl et comprend 70% d'adjuvant MONTANIDE ISA 70^R.

II. Production de sérums

2.1. Résultats de la production de sérums à partir des solutions antigéniques S et P

2.1.1. Résultats de la première immunisation (Jo₊₁₈)

Afin de connaître l'efficacité de l'immunisation initiale, on réalise un dosage des protéines des sérums prélevés sur les souris. Ces protéines correspondent aux albumines et aux immunoglobulines.

Le dosage de ces immunoglobulines se fait grâce à une technique ELISA dont le protocole est décrit dans la partie matériel et méthodes.

La révélation avec les IgG1 est plus intense que celle avec les IgG2a. On utilise donc les IgG1 pour l'étude.

dilution au 1/X	do du sérum P	do du sérum S	do standard à l'ovalbumine	do de référence
100	0,925	2,071	3,584	0,4
200	0,666	1,281	3,549	0,4
400	0,457	0,833	3,733	0,4
800	0,434	0,629	3,564	0,4
1600	0,387	0,591	3,384	0,4
3200	0,408	0,431	3,117	0,4
6400	0,377	0,373	2,664	0,4
12800	0,358	0,406	2,04	0,4

Tableau XV : Densités optiques des sérums

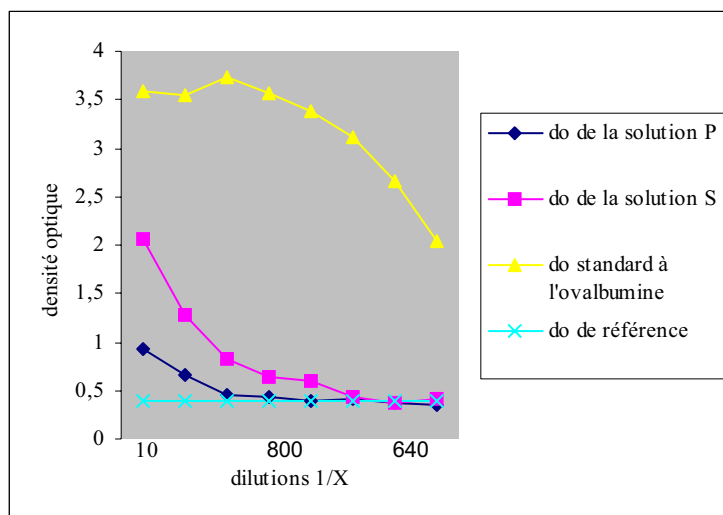


Figure15 : densité optique des sérums de souris en fonction de la dilution à Jo₊₁₈

2.1.1.1. Courbe obtenue avec la solution standard à l'ovalbumine

La courbe des densités optiques obtenues à partir du standard à l'ovalbumine sert de témoin positif. En effet on réalise une fixation avec de l'ovalbumine puis on dépose des anticorps anti-ovalbumine. Dans le cas présent les densités optiques sont élevées, ce qui montre que la manipulation s'est bien déroulée.

La courbe de référence permet d'exclure les valeurs inférieures à 0,4 de densité qui correspondent au bruit de fond.

2.1.1.2. Courbe obtenue avec la solution antigénique P

Le titrage des anticorps commence à la dilution 1/800. Il y a donc eu production d'anticorps par les souris. Cependant les densités optiques sont faibles. La concentration en anticorps dans le sérum est donc faible.

2.1.1.3. Courbe obtenue avec la solution antigénique S

Le titrage des anticorps commence à la dilution 1/3200. il y a donc eu production d'anticorps, mais cette fois-ci en plus grande quantité.

Toutefois, les titres en anticorps sont très faibles si on compare aux valeurs de densité optique de l'ovalbumine. Une production plus importante d'anticorps est nécessaire pour la réalisation des tests ultérieurs. Pour cela, une nouvelle injection d'antigènes parasitaires a dû

être effectuée. Cette dernière a pour but d'activer une réponse immunitaire secondaire d'intensité plus élevée que la première.

2.1.2. Résultats de la seconde immunisation (Jo₊₃₄)

dilution au 1/X	do du sérum P	do du sérum S	do standard à l'ovalbumine	do de référence
1000	1,146	1,257	3,073	0,4
2000	0,674	0,826	3,011	0,4
4000	0,397	0,518	2,805	0,4
8000	0,26	0,302	2,647	0,4
16000	0,201	0,229	2,32	0,4
32000	0,153	0,152	2,139	0,4
64000	0,121	0,139	1,8	0,4
128000	0,127	0,129	1,437	0,4

Tableau XVI : Densités optiques des sérums à Jo₊₃₄

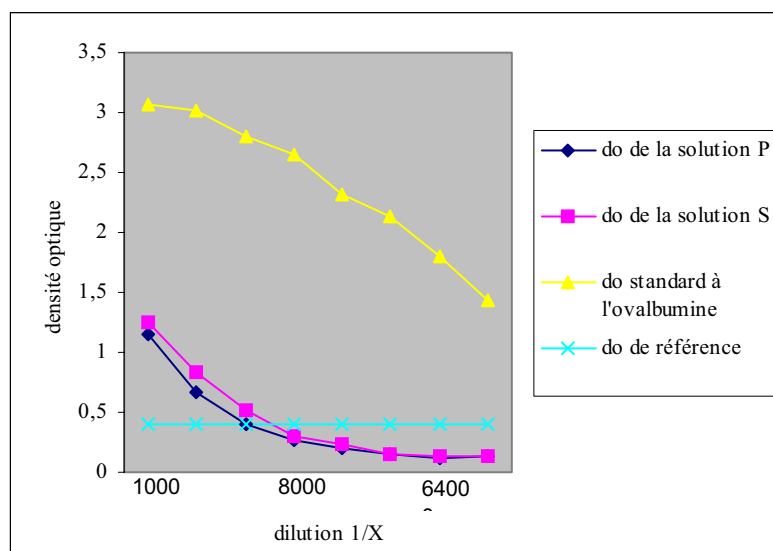


Figure 16 : densité optique des sérums de souris en fonction de la dilution à Jo₊₃₄

2.1.2.1. Courbe obtenue avec la solution antigénique P

Le titrage des anticorps commence à partir de la dilution 1/3000. La deuxième immunisation a donc permis d'augmenter la production d'anticorps.

2.1.2.2. Courbe obtenue avec la solution antigénique S

Le titrage des anticorps commence pour une dilution de 1/4000. Le taux d'anticorps a donc faiblement augmenté après la seconde immunisation.

2.2. Résultats de la production de sérums à partir la solution antigénique E/S

Nous décidons de ne pas réaliser de dosage intermédiaire à J_{0+18} . Les souris sont directement prélevées à J_{0+30} . Le dosage des anticorps est réalisé comme précédemment.

	dilution au 1/X	do du sérum E/S	do standard à l'ovalbumine	do de référence
1	2000	1.544	1.566	0.076
2	4000	1.532	1.521	0.064
3	8000	1.415	1.326	0.070
4	16000	1.270	1.162	0.062
5	32000	1.173	0.927	0.065
6	64000	1.063	0.693	0.063
7	128000	0.878	0.505	0.068
8	254000	0.818	0.360	0.076

Tableau XVII: Densités optiques des sérums

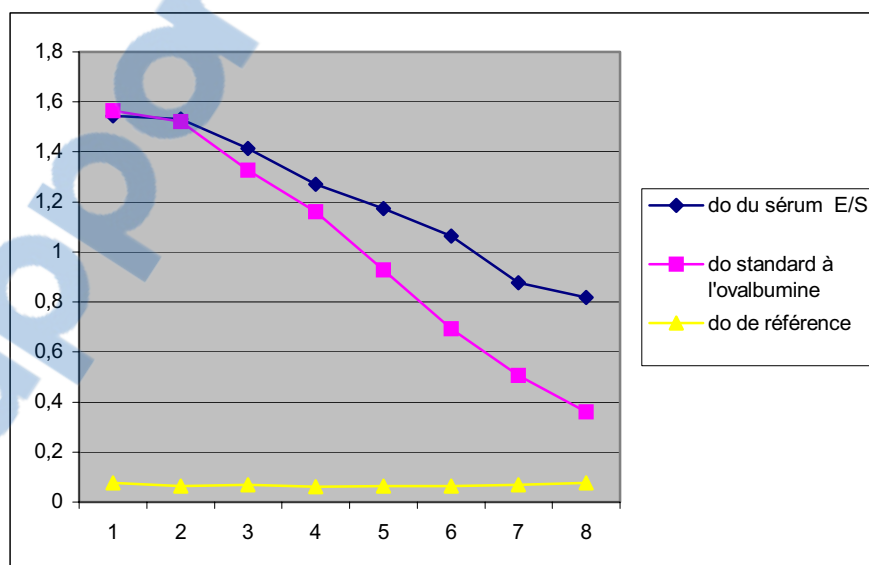


Figure 17: densité optique des sérums de souris en fonction de la dilution à J_{0+34}

Quelle que soit la dilution, on repère les anticorps. L'immunisation a donc bien fonctionné.

III.Utilisation des techniques avec des fèces de cheval

3.1. Résultats à partir des sérums S et P

Plusieurs séries du même test ELISA sont réalisées, mais elles ne permettent pas de distinguer l'échantillon positif de l'échantillon négatif. Quelle que soit la dilution, aucun signal n'est observé (ANNEXE III).

De nouvelles séries de test sont réalisées en faisant varier la température d'incubation (une série de dilution à 4°C et une série à 37°C).

Quelle que soit la dilution, aucun signal n'est observé (ANNEXE IV).

Un troisième et dernier essai est tenté en faisant varier le type de plaque et la température. On utilise des plaques « Immulon » ou « Maxisorb » à 4°C et à 37°C. Par soucis d'économie, seul l'échantillon positif est analysé. S'il apparaît un signal, l'échantillon négatif sera ensuite traité.

Quelle que soit la dilution, aucun signal n'est observé. (ANNEXE V).

3.2. Résultats à partir des sérums E/S

3.2.1. premier essai de traitement des fèces

Quelle que soit la dilution, aucun signal n'est observé.

3.2.2. Deuxième essai de traitement des fèces

Quelle que soit la dilution, aucun signal n'est observé. (ANNEXE VI).

DISCUSSION

I. Première partie : Etude de l'échantillon

Quarante neuf chevaux sont inclus dans notre protocole. Les examens du cæcum et de la valvule iléo-cæcale ont permis de réaliser deux lots :

- un lot de 25 échantillons positifs
- un lot de 24 échantillons négatifs.

Les chevaux de l'étude sont en majorité âgés de moins de 15 ans (90%) et sont représentés en majorité par des femelles (61%). Il s'agit exclusivement de chevaux (94% de chevaux et 6% de poneys). Aucun âne n'a été examiné.

Ces chevaux sont variablement infestés. On retrouve tous les niveaux d'infestation (faible : <20 parasites, moyen et fort : > 100 parasites), ce qui est particulièrement intéressant pour notre étude. Ainsi 60% des chevaux sont parasités par plus de 100 anoplocéphales.

Le nombre d'échantillons analysés est relativement faible en comparaison avec les autres études sur *Anoplocephala perfoliata* (Williason *et al.* 1998 ; Proudman *et al.* 1992 ; Meana *et al.* 1998 ; Höglund *et al.* 1995). En moyenne ces études analysent 80 chevaux.

II. Deuxième partie : réalisation de coproscopies

2.2. Caractéristiques des méthodes

2.2.1. Sensibilité

Les méthodes coproscopiques semblent peu sensibles. Les sensibilités calculées sont proches de 30% sauf pour la méthode de Proudman (Proudman *et al.* 1992) où elle s'élève à 56%.

Les études de Pearson *et al.* (1993) et Fogarty *et al.* (1994) ont montré que l'intensité de l'infestation avait un effet sur la sévérité des lésions. Le plus important pour le clinicien est la détection des chevaux à risque. Proudman & Edwards (1992) ont montré que la sensibilité de leur méthode de sédimentation/flottation passait à 92 % si on ne tient compte que des animaux ayant plus de 20 cestodes.

Nous avons réalisé le même type d'analyse. Lorsque nous ne prenons en compte que les animaux infestés à plus de 20 parasites, la sensibilité augmente à 70 % (voir tableau XVIII) Cette valeur est cependant nettement plus faible que celle rapportée par Proudman (Proudman *et al.* 1992).

	infestés	indemnes	
+	13	0	13
-	6	24	30
	18	24	

Sensibilité 70%
Spécificité 100%

Tableau XVIII : Calcul des sensibilités/spécificités

Nous avons ensuite étudié la valeur de la sensibilité en fonction du niveau d'infestation : cette valeur augmente quelle que soit la méthode mais plafonne avec la méthode de Proudman à 70 % (Proudman *et al.* 1992). (Voir figure 18).

Ainsi quel que soit le niveau d'infestation parasitaire, on n'est jamais certain de détecter un cheval infesté par une méthode d'analyse coproscopique.

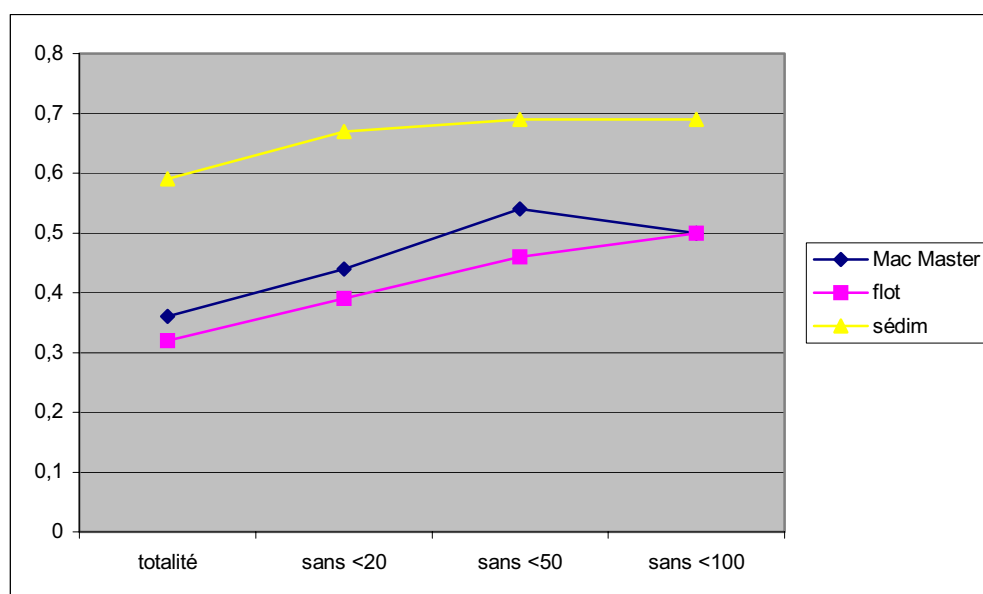


Figure18 : Evolution de la sensibilité des techniques coproscopiques en fonction du degré d'infestation parasitaire

Diverses raisons peuvent être avancées pour expliquer les faibles valeurs de sensibilité.

1) Les œufs d'anoplocéphales sont contenus dans les proglottis gravides et ne sont libérés que lorsque les proglottis dégénèrent. Il y a donc un re-largage sporadique des œufs de cestode dans les matières fécales. Ceci est d'autant plus vrai lors de faible infestation (Bello *et al.* 1999)

2) Une autre cause possible est la présence de forme immatures qui ne libèrent pas d'œufs. Ces formes immatures sont plus petites car ne possédant pas de proglottis gravidé. Notre étude n'a pas pris en compte le repérage des formes immatures.

3) La présence de nombreux débris dans les échantillons à analyser est une gêne à la détection des œufs.

4) Enfin le nombre de manipulations (multiples centrifugations et re-solubilisations) est une cause possible de perte d'œufs.

La méthode de centrifugation / flottation de Proudman (Proudman *et al.* 1992) est une technique simple ne nécessitant pas de matériel ni de réactifs coûteux. Son principal inconvénient est le temps passé pour traiter un échantillon : 2 heures 30 minutes.

La valeur de la sensibilité pour cette méthode est inférieure à celle obtenue par Proudman lui-même : 56% au lieu de 62%.

D'autres auteurs (Meana *et al.* 1998) ont étudié la technique de Proudman (Proudman *et al.* 1992) et ont trouvé des résultats de sensibilité beaucoup plus faibles (42 %).

Ceci pose le problème de la reproductibilité de la technique.

La méthode par simple flottation pose un problème de visualisation des œufs. En effet les échantillons provenant de chevaux qui mangent de l'herbe en grande proportion ont des particules et des petites fibres qui peuvent cacher les œufs des parasites.

Nos résultats comme ceux d'autres chercheurs, montrent que les méthodes coproscopiques ont une faible sensibilité et une reproductibilité limitée pour la détection des œufs d'*Anoplocephala perfoliata*.

2.2.2. Spécificité

Les valeurs de spécificité sont toutes très bonnes quel que soit le test. Elles sont toutes égales à 100%. Ainsi un animal indemne ne pourra jamais être positif à aucun test de détection coproscopique.

2.2.3. Valeurs prédictives

Les valeurs prédictives positives sont de 100 % quel que soit le test. Ainsi un résultat positif doit s'interpréter comme une infestation certaine.

Les valeurs prédictives négatives sont de l'ordre de 60%, si bien que lorsqu'on a un résultat négatif, on a 40 % de risque d'avoir un faux négatif.

III. Troisième partie : mise au point du test ELISA

Lors des expériences réalisées pour la mise au point d'un test ELISA nous avons rencontré un certain nombre de difficultés.

3.1. Production des sérums

La production de sérums contenant des anticorps anti-anophocéphales est obtenue avec succès en inoculant des antigènes (parasites entiers ou excrétés / sécrétés) à des souris.

Dans les études sur la détection de copro-antigènes pour d'autres espèces de cestodes, les anticorps polyclonaux ont été obtenus à partir de lapins hyper immunisés (Allan *et al.* 1990, Allan *et al.* 1992). Les anticorps produits par les souris ont la même efficacité que ceux produits par des lapins.

Le type d'antigène utilisé est variable. Ainsi, pour la détection des copro-antigènes de *Taenia saginata* et *Taenia solium* chez l'Homme, les chercheurs ont utilisé des antigènes somatiques (Allan *et al.* 1990). Pour la détection de *Taenia hydatigena* chez le chien, les chercheurs ont utilisé des antigènes excrétés/sécrétés (Deplazes *et al.* 1990).

3.2. Causes de l'absence de détection des copro-antigènes

3.2.1. Sélection des antigènes

Une première hypothèse concernant cet échec peut être avancée. La première étape de préparation des antigènes parasitaires pourrait être la source de l'échec. Il est possible que les antigènes sélectionnés ne correspondent pas à ceux retrouvés au niveau du rectum.

Toutefois cette hypothèse reste peu probable car nous avons repris les travaux d'autres chercheurs en réalisant les mêmes étapes d'extraction antigénique.

La préparation des antigènes excrétés/sécrétés est décrite par Proudman *et al.* (1996). La préparation des antigènes somatiques est tirée des travaux de Allan *et al.* 1990.

Nous avons été confrontés au problème concernant la culture des parasites. Ceci meurent en effet rapidement. Nous avons donc réduit la durée de l'incubation à 5 heures. Nous avons également ajouté des antibiotiques afin d'empêcher la pullulation bactérienne (risquant d'interférer pour la production de sérum anti-anoplocéphale).

3.2.2. Dilution des antigènes dans les fèces

Les travaux concernant la détection de copro-antigènes chez d'autres espèces (Homme, Chien, Rat...) n'étaient pas confrontés au problème de la dilution des antigènes. En effet les autres cestodes que *Anoplocephala perfoliata* sont de grande taille. A l'état adulte, *Anoplocephala perfoliata* mesure 6 à 8 cm, alors que *Taenia solium* par exemple en mesure trois à cinq mètres ! Ceci implique une libération d'antigènes dans les fèces plus importante.

Toutefois cette hypothèse n'explique pas totalement l'échec du test puisque certains anoplocéphales peuvent être présents en très grand nombre et par conséquent libérer une grande quantité d'antigène.

D'autre part la quantité de fèces produite par les espèces autres que le cheval est beaucoup plus faible.

Cette hypothèse liée à la dilution des antigènes dans les fèces n'est donc pas à négliger. Les tests ELISA que nous avons produits ne seraient alors pas assez sensibles pour détecter une très faible quantité d'antigènes.

3.2.3. Problèmes d'extraction des antigènes des fèces (solubilité).

La première étape de préparation des fèces vise à solubiliser les copro-antigènes dans un tampon de manière à ce qu'ils puissent se fixer sur la plaque ELISA.

Face aux échecs du test ELISA, différents paramètres ont été modifiés afin d'améliorer l'extraction antigénique. Tout d'abord, nous avons utilisé différents types de tampons : des tampons hydrophobes et hydrophiles. Les fèces ont aussi été préparées directement dans le tampon de fixation (hydrophile).

Plusieurs essais ont aussi conduits à augmenter le nombre de centrifugation de la solution contenant les fèces afin d'éliminer un maximum de particules.

Enfin une concentration des copro-antigènes est tentée en utilisant des colonnes à concentration (colonne « Minicon »).

3.2.4. Problème lié au test ELISA lui-même

Les différentes étapes de la méthode ELISA peuvent être la source de l'échec.

Tout d'abord, on peut citer la première étape qui correspond à la fixation. En effet, les copro-antigènes peuvent présenter un défaut de fixation dans les puits. Nous avons modifié le type de plaque afin de voir si la fixation est meilleure sur des plaques « Maxisorp » qui sont les plaques classiquement utilisées ou plaques « Immulon » qui sont des plaques spécifiques de molécules hydrophobes.

La température des diverses incubations a aussi été modifiée. Les tests ELISA ont été entrepris à 37°C et à 4°C. Ceci permet d'agir sur la réaction de fixation antigène / anticorps par action sur la conformation spatiale des molécules.

Le type de révélation est modifié pour le deuxième essai de traitement des fèces. Il s'agit du TMB Single solution ZIMED 00-2023.

3.2.5. La conservation des antigènes

Les échantillons de matière fécales sont conservés à -80°C en attendant leur analyse par le test ELISA.

Il faut s'interroger sur la conservation de ceux-ci. En effet les antigènes peuvent s'être dégradés. Certains articles rapportent que les antigènes de ténias sont détectables par ELISA et restent immunologiquement stables à -20°C pendant 5 jours (Deplazes *et al.* 1990). D'autres décrivent une conservation dans une solution formolée à 4°C pendant 6 mois (Allan *et al* 1992).

Les travaux sur les autres cestodes ont décrit l'utilisation de sérum fœtal de veau inactivé par la chaleur incorporé aux copro-antigènes afin de lutter contre l'activité protéase. L'utilisation de ce sérum permet d'augmenter la sensibilité du test ELISA (Viscidi *et al.* 1984). Toutefois ce type de réactif est particulièrement coûteux, et n'est pas utilisé par notre laboratoire.

CONCLUSION

Les moyens diagnostiques dont nous disposons actuellement pour détecter une infestation par *Anoplocephala perfoliata* chez le cheval sont limités et peu fiables.

Notre étude a d'ailleurs permis de confirmer les résultats d'autres chercheurs en montrant que la sensibilité des techniques coproscopiques demeure limitée. Parmi les techniques étudiées, c'est la méthode de centrifugation / flottation de Proudman (Proudman *et al.* 1992) qui a donné la sensibilité la plus élevée (56%).

La mise au point d'un test ELISA pour la détection de copro-antigènes, comme il en existe pour d'autres espèces aurait été particulièrement intéressante compte tenu de la prévalence de ce parasite chez le cheval et des lésions qu'il génère dans l'intestin.

Malheureusement, aucun résultat n'a permis de distinguer un animal infesté d'un animal indemne.

Des essais similaires chez les bovins infestés par les Paramphistomes, parasites du rumen, ont été menés en parallèle et n'ont pas été concluants.

Une hypothèse quant à la technique ELISA elle-même peut être avancée. L'outil ELISA n'est peut-être pas à l'heure actuelle assez puissant pour détecter une faible quantité de copro-antigènes diluée dans un grand volume de fèces.

BIBLIOGRAPHIE

ALLAN JC, AVILA G, GARCIA J, FLISSER A. (1990) Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection, *Parasitology*, **101**, 473-477.

ALLAN JC, CRAIG PS, GARCIA J. (1992) Copro-antigens detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans, *Parasitology* **104**, 347-355.

ALLAN JC, MENCOS F, GARCIA J, FLISSER A. (1993) Dipstick dot ELISA for detection of taenia coproantigens in humans, *Parasitology*, **107**, 79-85.

BAIN SA, KELLY JD. (1977) Prevalence and pathogenicity of *Anoplocephala perfoliata* in a horse population in South Auckland, *New Zealand Veterinary Journal*, **25**, 27-28.

BARCLAY WP, PHILLIPS TN, FOERNER JJ. (1982) Intussuseption associated with *Anoplocephala perfoliata* Infection in five horses, *American Veterinary Medicine Association*, **180**, 752, 753.

BELLO TR. (1999) Are equine tapeworms an emerging disease? A retrospective study, *Journal of Equine Veterinary Science*, **19**, 723-726.

BEROZA GA, BARCLAY WP, PHILLIPS TN, FOERNER JJ. (1983) Caecal perforation and peritonitis associated with *Anoplocephala perfoliata* infestation in three horses, *American Veterinary Medicine Association*, **183**, 804-806.

BEROZA GA, WILLIAMS R, MARCUSL.C, MILLE P. (1986) Prevalence of tapeworm infection and association with large bowel disease in the horses, *Equine Colic symposium Athens*, 21-25.

BUSSIERAS J, CHERMETTE R (1995) *Parasitologie Vétérinaire, helminthologie*. 2nd éd. Service de Parasitologie de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort Tome III, 299p.

COLLOBERT-LAUGIER C, COLLOBERT JF, TARIEL G, LETONDEUR S. (1990) Etude du téniasis des équidés en Normandie, *CEREOPA, 16ème journée d'étude*, 198-205.

COLLOBERT C, FLEURY C, VALOGNES A, PEDAILLE F. (1997) Prévalence du téniasis chez les équidés en France. Etude multicentrique à partir de chevaux examinés post-mortem. *Pratique Vétérinaire Equine*, **29**, 149-158.

CRAIG P.S, GASSER R.B, PARADA L, et al. (1995) Diagnosis of canine echinoccosis: comparaison of coproantigen and serum antibody tests with arecoline purgation in Uruguay. *Veterinary Parasitology*. **56**, 293-301.

DEPLAZES P, GOTTSTEIN B, STINGELIN C, ECKERT T. (1990) Detection of *Taenia hydatigena* copro-antigens ELISA in dogs, *Veterinary Parasitology*. **36**, 91-103.

DRUDGE JH, LYONS ET. (1986) Internal parasites of equids with emphasis on treatment and control. *Hoechst-Roussel Agri-Vet Company, Sommerville, New Jersey* 19-20.

EDWARDS G.B. (1986) Surgical management of intussuception in the horses. *Equine Veterinary Journal*. **18**, 313-321.

FRENCH P, CHAPMAN IL, KLEI K. (1994) Effects of treatment with ivermectin for five years of prevalence of *Anoplocephala perfoliata* in three Louisiana pony herds. *Veterinary record*, **135**, 63-65.

FOGARTY U, DEL PIERRO F, PURNELL RE, MOSURSKI KR. (1994) Incidence of *Anoplocephala perfoliata* in horses examined at irish abattoir. *Veterinary Record*, **134** , 515-518.

GASSER RB, LIGHTOXLERS MW, OBENDORF DL, JENKINS DJ, RICKARD MD. (1988) Evaluation of a serological test system for the diagnostis of natural *Ecchinococcus granulosus* infection in dogs using *E. granulosus* protoscolex and oncosphere antigens. *Australian Veterinary Journal*, **20**, 431-456.

GEERING et al. (1990) Equine tapeworm. *Equine Veterinary Journal*, **23**, 81.

HÖGLUND J, NILSSON O, LJUNGSTRÖM B.L, LUNDQUIST H, UGGLA A. (1995) *Anoplocephala* in horses in Sweeden. *Acta vet scand*, **36**, 319-328.

HÖGLUND J, LJUNGSTRÖM B.L, NILSSON O. (1995) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anoplocephala perfoliata* in horses sera. *Veterinary Parasitology*, **59**, 97-106.

IMRIE H, JACOBS DE. (1987) Prevalence of horse tapeworm in north London and Hertfordshire, *Veterinary Record*, **120**, 304.

JENKINS DJ, FRASER RD, BRADSHAW HL, CRAIG PS. (2000) Detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in australan canids with natural or experimental infection. *Parasitology*, **86**, 140-145.

LYONS ET, BENTON N. (1994) Survey in central Kentucky for prevalence of *Anoplocephala perfoliata* in horses at necropsy in 1992. *Veterinary Parasitology*, **55**, 81-86.

LYONS ET, TOLLIVER SC, D MEANA A, LUZON M, CORCHERO J, GOMEZ M. (1998) Reability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. *Veterinary Parasitology*, **74**, 79-83.

MENEA A, LUZON M, CORCHERO MG. (1998) Reability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. *Veterinary Parasitology* , **74**, 79-83.

MFITTILODZE MW, HUTCHINSON GW. (1989) Prevalence and intensity of non-strongle intestinal parasites of horses in Northern Queensland. *Australian Veterinary*, **66**, 23-26.

NILSSON O, LJUNGSTRÖM B.L, HÖGLUND J, LUNDQUIST H, UGGLA A. (1995) ELISA for the detection of antibodies to *Anoplocephala perfoliata* in horses sera. *Veterinary Parasitology*, **59**, 97-106.

OWEN R, JAGGER D.W, QUAN-TAYLOR R. (1988) Prevalence of *Anoplocephala perfoliata* in horses and ponies. *Veterinary Record*, **123**, 562-563.

PEARSON GR, DAVIES LW, WHITE AL, O'BRIEN JK. (1993) Pathological lesions associated with *Anoplocephala perfoliata* at the ileo-caecal junction of horses. *Veterinary Record*, **20**, 179-182.

PROUDMAN CJ, EDWARDS GB. (1992) Validation of a centrifugation/Flotation technique for diagnosis of equine cestodiasis. *Veterinary Record*, **131**, 71-72.

PROUDMAN CJ, EDWARDS GB. (1993) Are tapeworms associated with equine colic? *Equine Veterinary Journal*, **25**, 224-226.

PROUDMAN CJ, TREES AJ. (1996) Use of excretory/secretory antigens for serodiagnosis of *Anoplocephala perfoliata* cestodosis. *Veterinary Parasitology*, **61**, 239-247.

PROUDMAN CJ, MATTHEWS S. (2000) Control of intestinal parasites in horses. *Equine Practice*, **46**, 90-95.

SLOCOMBE JOD. (1979) Prevalence and treatment of tapeworms in horses, *Canadian Veterinary Journal*, **20**, 136-140.

THIENPONT D, ROCHETTE F, VANPARIJS O. (1998) *Diagnostic de verminoses par examen coprologique*. Maloine, 203 p.

VISCIDI R, LAUGHON BE, HANVANICH M, BARTLETT JG, YOLKEN RH. (1984) Improve enzyme immunoassays for detection of antigens in fecal specimens. Investigation and correction for interfering factors. *Journal of Immunological Methods*. **67**, 129-43.

WILLIAMSON RMC, BEVERRIDGE I, GASSER RB. (1998) Coprological methods for the diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection of horse. *Australian Veterinary Journal*, **76**, vol 9.

ANNEXES

ANNEXE I

Tampons :

Tampon de prélèvement phase hydrophobe

Essai SM 04974 30% du volume final de NaCl

NaCl 1M 50ml

Tampon de prélèvement phase aqueuse

NaCl 1 M 50ml

Tween 20 25 μ l

Tampon de fixation :

Na₂HCO₃ 1.59g

NaHCO₃ 2.93g

H₂O distillée qsp 1 litre

PH 9.6 à ajuster

Tampon de lavage

Tween 20

H₂O distillée qsp 1 litre

Tampon de saturation

Gélatine 5% 100ml

Tween 20 250 μ l

NaCl 1 M qsp 500 ml

Tampon de révélation : tampon citrate-phosphate

Tampon A acide citrique 10.5g/500ml H ₂ O	2.49ml	4.98ml	9.96ml	12.45ml
Tampon B Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 17.8g/500ml H ₂ O	2.57ml	5.14ml	10.28ml	12.85ml
H ₂ O distillée qsp	50ml	100ml	200ml	250ml

ANNEXE II

Résultats ELISA obtenu avec les sérums « S et P » (valeurs des densités optiques) :

Echantillon positif (D1258)

blanc	Ag aqueux	Ag aqueux	Ag aqueux	Ag aqueux	blanc	Ag hydrophobe	Ag hydrophobe	Ag hydrophobe	Ag hydrophobe	scolex	P total
0,38	0,294	0,3	0,339	0,326	0,183	0,27	0,275	0,306	0,309	3,669	3,803
0,295	0,265	0,255	0,251	0,253	0,157	0,233	0,229	0,271	0,262	2,638	3,546
0,302	0,243	0,245	0,249	0,268	0,176	0,231	0,218	0,252	0,263	1,943	3,345
0,215	0,263	0,247	0,244	0,252	0,152	0,24	0,217	0,245	0,237	1,316	2,749
0,277	0,249	0,206	0,238	0,244	0,166	0,207	0,213	0,225	0,235	0,848	2,075
0,242	0,232	0,204	0,214	0,208	0,165	0,195	0,202	0,204	0,214	0,565	1,44
0,285	0,228	0,218	0,203	0,204	0,159	0,195	0,188	0,199	0,205	0,395	0,924
0,271	0,246	0,253	0,222	0,214	0,163	0,196	0,201	0,254	0,296	0,383	0,647

Echantillon négatif (D1247)

blanc	Ag aqueux	Ag aqueux	Ag aqueux	Ag aqueux	blanc	Ag hydrophobe	Ag hydrophobe	Ag hydrophobe	Ag hydrophobe	scolex	P total
0,333	0,299	0,281	0,303	0,28	0,172	0,272	0,261	0,354	0,34	3,542	3,698
0,284	0,275	0,244	0,246	0,248	0,161	0,223	0,232	0,269	0,281	2,402	3,676
0,288	0,244	0,238	0,239	0,232	0,152	0,218	0,227	0,241	0,266	1,776	3,297
0,237	0,234	0,225	0,237	0,232	0,155	0,219	0,216	0,226	0,246	1,193	2,785
0,22	0,226	0,205	0,221	0,212	0,153	0,209	0,205	0,214	0,228	0,792	2,168
0,227	0,219	0,22	0,212	0,202	0,161	0,201	0,215	0,215	0,224	0,517	1,51
0,291	0,206	0,188	0,194	0,189	0,162	0,202	0,202	0,19	0,2	0,353	1,026
0,244	0,216	0,206	0,216	0,2	0,184	0,22	0,212	0,239	0,245	0,357	0,694

Ag aqueux : Antigènes de fèces dilués en tampon hydrophile (Tween - NaCl)

Ag hydrophobe : Antigènes de fèces dilués en tampon hydrophobe (Essai SM04974)

Scolex : Antigènes du scolex d'*Anoplocephala perfoliata*

P total : Antigènes du parasite total

Entre la ligne n et la ligne n+1, une dilution au 1 / 2 a été réalisée.

ANNEXE III

Résultats ELISA en changeant la température (valeurs des densités optiques) :

positif 4°C

Blanc	Ag aqueux	Ag aqueux	Ag aqueux	Ag aqueux	blanc	Ag hydro	Ag hydro	Ag hydro	Ag hydro	scolex	P total
0,11	0,12	0,135	0,149	0,156	0,133	0,151	0,15	0,149	0,15	2,255	1,707
0,103	0,145	0,137	0,138	0,179	0,144	0,161	0,152	0,184	0,15	1,592	1,652
0,089	0,12	0,137	0,125	0,14	0,107	0,124	0,123	0,122	0,139	1,206	1,446
0,113	0,139	0,144	0,15	0,148	0,114	0,133	0,163	0,153	0,141	0,853	1,098
0,085	0,122	0,123	0,129	0,118	0,104	0,12	0,149	0,137	0,121	0,568	0,831
0,106	0,121	0,119	0,124	0,143	0,127	0,136	0,118	0,108	0,121	0,377	0,521
0,089	0,124	0,11	0,11	0,125	0,102	0,111	0,115	0,106	0,102	0,219	0,319
0,124	0,117	0,112	0,105	0,114	0,103	0,111	0,123	0,113	0,121	0,151	0,245

négatif 4°C

Blanc	Ag aqueux	Ag aqueux	Ag aqueux	Ag aqueux	blanc	Ag hydro	Ag hydro	Ag hydro	Ag hydro	scolex	P total
0,136	0,16	0,189	0,184	0,185	0,153	0,2	0,16	0,164	0,157	2,441	1,786
0,126	0,217	0,223	0,192	0,195	0,167	0,205	0,214	0,188	0,188	1,89	1,684
0,121	0,189	0,214	0,203	0,2	0,175	0,199	0,193	0,203	0,199	1,579	1,534
0,113	0,185	0,2	0,193	0,179	0,161	0,168	0,179	0,167	0,15	1,185	1,205
0,106	0,165	0,207	0,193	0,177	0,142	0,175	0,165	0,14	0,148	0,822	0,941
0,115	0,13	0,129	0,141	0,127	0,132	0,128	0,146	0,133	0,12	0,506	0,592
0,122	0,129	0,135	0,139	0,132	0,115	0,115	0,138	0,13	0,125	0,328	0,377
0,097	0,128	0,133	0,16	0,135	0,117	0,126	0,121	0,149	0,154	0,225	0,229

Ag aqueux : Antigènes de fèces dilués en tampon hydrophile (Tween - NaCl)

Ag hydrophobe : Antigènes de fèces dilués en tampon hydrophobe (Essai SM04974)

Scolex : Antigènes du scolex *d'Anoplocephala perfoliata*

P total : Antigènes du parasite total

Entre la ligne n et la ligne n+1, une dilution au 1 / 2 a été réalisée.

Résultats ELISA en changeant la température (valeurs des densités optiques) :

positif 37°C

Blanc	Ag aqueux	Ag aqueux	Ag aqueux	Ag aqueux	blanc	Ag hydro	Ag hydro	Ag hydro	Ag hydro	scolex	P total
0,209	0,201	0,199	0,205	0,179	0,146	0,234	0,206	0,225	0,256	3,179	3,018
0,16	0,225	0,204	0,21	0,195	0,138	0,192	0,202	0,192	0,187	2,133	2,664
0,165	0,191	0,209	0,209	0,211	0,144	0,197	0,196	0,212	0,207	1,778	2,621
0,156	0,195	0,181	0,22	0,205	0,156	0,184	0,193	0,194	0,219	1,241	2,119
0,161	0,205	0,194	0,209	0,202	0,161	0,193	0,218	0,224	0,206	0,776	1,418
0,161	0,216	0,179	0,205	0,186	0,131	0,197	0,189	0,193	0,192	0,476	0,89
0,152	0,192	0,172	0,194	0,199	0,146	0,194	0,197	0,201	0,19	0,298	0,525
0,122	0,162	0,18	0,17	0,197	0,149	0,175	0,17	0,165	0,195	0,22	0,394

Négatif 37°C

Blanc	Ag aqueux	Ag aqueux	Ag aqueux	Ag aqueux	blanc	Ag hydro	Ag hydro	Ag hydro	Ag hydro	scolex	P total
0,212	0,265	0,259	0,252	0,243	0,173	0,302	0,268	0,259	0,273	3,059	3,082
0,177	0,265	0,256	0,335	0,25	0,194	0,217	0,203	0,213	0,208	2,166	2,679
0,16	0,222	0,213	0,225	0,202	0,157	0,226	0,215	0,217	0,221	1,696	2,502
0,172	0,199	0,22	0,21	0,188	0,151	0,195	0,18	0,218	0,197	1,215	2,024
0,15	0,189	0,175	0,191	0,192	0,141	0,184	0,186	0,199	0,208	0,784	1,434
0,178	0,196	0,182	0,175	0,17	0,15	0,184	0,184	0,194	0,189	0,547	0,926
0,18	0,168	0,173	0,179	0,194	0,136	0,177	0,185	0,185	0,177	0,304	0,523
0,224	0,191	0,185	0,189	0,174	0,163	0,219	0,302	0,213	0,215	0,285	0,417

Ag aqueux : Antigènes de fèces dilués en tampon hydrophile (Tween - NaCl)

Ag hydrophobe : Antigènes de fèces dilués en tampon hydrophobe (Essai SM04974)

Scolex : Antigènes du scolex *d'Anoplocephala perfoliata*

P total : Antigènes du parasite total

Entre la ligne n et la ligne n+1, une dilution au 1 / 2 a été réalisée.

ANNEXE IV

Résultats ELISA en changeant de type de plaque (valeurs des densités optiques) :

Immulon 37°C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,259	0,243	0,255	0,217	0,214	0,219	0,288	0,231	0,292	0,245	2,8	2,942
B	0,231	0,231	0,209	0,199	0,212	0,216	0,243	0,203	0,271	0,211	2,045	2,751
C	0,222	0,243	0,233	0,232	0,231	0,204	0,246	0,183	0,253	0,206	1,324	2,382
D	0,206	0,224	0,22	0,229	0,214	0,172	0,227	0,175	0,252	0,204	0,909	1,979
E	0,228	0,216	0,201	0,206	0,22	0,201	0,223	0,193	0,246	0,203	0,586	1,311
F	0,224	0,234	0,232	0,207	0,23	0,186	0,215	0,174	0,232	0,188	0,404	0,912
G	0,216	0,235	0,23	0,209	0,214	0,191	0,219	0,164	0,212	0,197	0,33	0,602
H	0,241	0,228	0,215	0,215	0,215	0,2	0,232	0,199	0,223	0,263	0,321	0,502

Immulon 4°C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,194	0,175	0,164	0,159	0,167	0,157	0,177	0,158	0,199	0,175	2,447	2,502
B	0,195	0,197	0,199	0,231	0,232	0,149	0,233	0,159	0,27	0,176	2,443	2,757
C	0,186	0,21	0,202	0,221	0,235	0,154	0,237	0,165	0,279	0,176	1,841	2,387
D	0,189	0,198	0,196	0,212	0,219	0,156	0,21	0,167	0,262	0,178	1,389	2,102
E	0,172	0,201	0,186	0,203	0,191	0,174	0,231	0,169	0,259	0,179	0,849	1,632
F	0,168	0,182	0,174	0,194	0,196	0,152	0,215	0,156	0,252	0,175	0,539	1,13
G	0,169	0,164	0,176	0,194	0,181	0,15	0,213	0,171	0,226	0,176	0,394	0,803
H	0,176	0,173	0,185	0,2	0,198	0,168	0,208	0,171	0,23	0,2	0,334	0,51

Colonnes	« Coating »
1	Blanc
2 ;3 ;4 ;5	Antigène dans tampon aqueux
6	Blanc
7 ;8 ;9 ;10	Antigène dans tampon hydrophobe
11	Antigène S (scolex)
12	Antigène P (parasite total)

Entre la ligne n et la ligne n+1, une dilution au 1 / 2 a été réalisée.

Résultats des ELISA en changeant de type de plaque (valeurs des densités optiques) :

Maxisorp 37°C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,186	0,238	0,215	0,216	0,213	0,155	0,258	0,165	0,268	0,154	2,678	2,792
B	0,2	0,196	0,18	0,172	0,179	0,141	0,205	0,145	0,211	0,144	1,857	2,601
C	0,192	0,181	0,185	0,173	0,176	0,14	0,211	0,15	0,216	0,151	1,325	2,358
D	0,173	0,178	0,175	0,167	0,178	0,144	0,204	0,158	0,2	0,16	0,93	1,985
E	0,165	0,192	0,184	0,172	0,172	0,131	0,197	0,148	0,196	0,16	0,622	1,539
F	0,19	0,183	0,193	0,194	0,2	0,132	0,188	0,142	0,196	0,152	0,409	1,041
G	0,185	0,206	0,196	0,183	0,168	0,145	0,199	0,144	0,203	0,155	0,311	0,672
H	0,194	0,217	0,201	0,222	0,202	0,151	0,205	0,155	0,199	0,184	0,294	0,465

Maxisorp 4°C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,206	0,208	0,184	0,174	0,154	0,14	0,174	0,157	0,165	0,15	2,633	2,648
B	0,179	0,223	0,219	0,218	0,219	0,13	0,234	0,162	0,245	0,154	2,111	2,839
C	0,189	0,208	0,187	0,179	0,189	0,141	0,209	0,146	0,223	0,144	1,383	2,599
D	0,183	0,197	0,178	0,172	0,18	0,119	0,204	0,144	0,207	0,146	0,955	1,994
E	0,187	0,192	0,179	0,174	0,173	0,123	0,191	0,142	0,206	0,14	0,634	1,437
F	0,193	0,199	0,175	0,181	0,176	0,137	0,198	0,151	0,201	0,142	0,416	0,931
G	0,195	0,196	0,192	0,186	0,183	0,126	0,191	0,143	0,195	0,134	0,277	0,587
H	0,19	0,196	0,197	0,253	0,208	0,143	0,195	0,163	0,201	0,167	0,26	0,434

Colonnes	« Coating »
1	Blanc
2 ;3 ;4 ;5	Antigène dans tampon aqueux
6	Blanc
7 ;8 ;9 ;10	Antigène dans tampon hydrophobe
11	Antigène S (scolex)
12	Antigène P (parasite total)

Entre la ligne n et la ligne n+1, une dilution au 1 / 2 a été réalisée.

ANNEXE V

Résultats ELISA obtenu avec les sérums «E / S» (valeurs des densités optiques) :

Les manipulations sont réalisées sur des plaques « Maxisorp » à 37°C.

Dilution	10	20	40	80	160	320	640	1280
ST	0.744	0.939	1.029	1.056	1	1.331	1.966	2.275
FORM+	0.567	0.512	0.459	0.468	0.47	0.499	0.525	0.556
TWEEN +	0.489	0.484	0.406	0.356	0.347	0.338	0.305	0.327
COAT+	0.604	0.54	0.442	0.431	0.457	0.473	0.498	0.505
FORM-	0.535	0.433	0.426	0.459	0.419	0.427	0.414	0.412
TWEEN -	0.551	0.463	0.392	0.365	0.327	0.311	0.324	0.331
COAT-	0.614	0.513	0.496	0.485	0.482	0.467	0.485	0.489
BL	0.553	0.612	0.48	0.512	0.491	0.478	0.506	0.477
concentré								
Dilution	10	20	40	80	160	320	640	1280
ST	1.513	1.66	1.231	1.732	1.216	1.855	2.396	2.548
FORM+	0.625	0.463	0.416	0.426	0.418	0.446	0.418	0.445
TWEEN +	0.584	0.373	0.349	0.337	0.3	0.297	0.281	0.287
COAT+	0.49	0.37	0.36	0.36	0.368	0.344	0.359	0.369
FORM-	0.586	0.462	0.43	0.406	0.401	0.349	0.361	0.341
TWEEN -	0.486	0.345	0.328	0.321	0.302	0.295	0.279	0.288
COAT-	0.512	0.406	0.35	0.338	0.327	0.354	0.333	0.318
BL	0.404	0.345	0.335	0.319	0.307	0.316	0.316	0.335

ST : Standard (antigènes E/S dilué au 1/5 ; 0.7 mg/ml)

FORM: Antigènes de fèces dilués en tampon hydrophobe (« formulation »)

TWEEN: Antigènes de fèces dilués en tampon hydrophile (Tween - NaCl)

COAT : Antigènes de fèces dilués en tampon de fixation (« coating »)

BL: Blanc

+: échantillon positif

-: échantillon négatif