



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 15140

To cite this version :

Sochat, Fanny. *Évaluation d'un nouveau liquide dense pour le diagnostic coproscopique des infestations des ruminants par les trématodes*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2015, 118 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

EVALUATION D'UN NOUVEAU LIQUIDE DENSE POUR LE DIAGNOSTIC COPROSCOPIQUE DES INFESTATIONS DES RUMINANTS PAR LES TREMATODES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

SOCHAT Fanny

Née, le 14 octobre 1989 à Limoges (87)

Directeur de thèse : M. Emmanuel LIENARD

JURY

PRESIDENT :

M. Alexis VALENTIN

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Emmanuel LIENARD

M. Philippe JACQUIET

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

Mise à jour au 01/03/2015

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **DAHAN Julien**, *Médecine Interne*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
M. **TANIS Jean-Benoît**, *Anatomie – Imagerie Médicale*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur A. Valentin,

Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur E. Liénard,

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse.
Pour son accompagnement, son encadrement, ses conseils, sa disponibilité et sa sympathie
tout au long de ces années d'études et de thèse,
Pour la confiance accordée dans ce travail,
Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur P. Jacquet,

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Pour avoir contribué à l'élaboration de ce sujet, et m'avoir fait l'honneur de participer à ce
jury de thèse,
Sincères remerciements.

Aux membres de l'unité de Parasitologie de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Pour m'avoir accueillie au sein de votre service et pour votre gentillesse,
Sincères remerciements.

Aux vétérinaires et éleveurs qui ont collaboré à la réalisation de ce travail,
Pour votre disponibilité et votre accueil,
Sincères remerciements.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	7
TABLE DES FIGURES.....	11
TABLE DES TABLEAUX.....	13
INTRODUCTION.....	15
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
I. Présentation des parasites gastro-intestinaux recherchés par coproscopie.....	17
A. Les trématodes.....	17
1. <i>Fasciola hepatica</i>	17
a) Présentation du parasite et espèces cibles.....	17
b) Cycle évolutif.....	17
c) Morphologie de l'œuf.....	19
2. <i>Calicophoron daubneyi</i>	20
a) Présentation du parasite et espèces cibles.....	20
b) Cycle évolutif.....	20
c) Morphologie de l'œuf.....	21
3. <i>Dicrocoelium lanceolatum</i>	21
a) Présentation du parasite et espèces cibles.....	21
b) Cycle évolutif.....	21
c) Morphologie de l'œuf.....	23
B. Les nématodes.....	24
1. Présentation des nématodes et espèces cibles.....	24
2. Les strongles gastro-intestinaux des ruminants.....	24
a. Cycle évolutif.....	24
b. Principales espèces.....	25
c. Aspect des œufs en coproscopie.....	26
3. Les trichures.....	27
a. Cycle évolutif.....	27
b. Principales espèces.....	28
c. Aspect des œufs en coproscopie.....	28
4. <i>Strongyloides papillosus</i>	28
a. Cycle évolutif.....	28
b. Aspect des œufs en coproscopie.....	29
5. <i>Toxocara vitulorum</i>	29
a. Cycle évolutif.....	29
b. Aspect des œufs en coproscopie.....	30

C.	Les cestodes.....	31
1.	Présentation des cestodes et espèces cibles.....	31
2.	Cycle évolutif.....	31
3.	Morphologie des segments ovigères et des œufs.....	32
D.	Les protozoaires digestifs.....	33
1.	Présentation et espèces cibles.....	33
2.	Cycle évolutif.....	34
a.	Les coccidies.....	34
b.	<i>Cryptosporidium parvum</i>	35
c.	<i>Giardia intestinalis</i>	36
3.	Diagnostic coproscopique.....	36
a.	Les coccidies.....	36
b.	<i>Cryptosporidium parvum</i> et <i>C. andersoni</i>	37
c.	<i>Giardia intestinalis</i>	37
II.	Importance économique et médicale des infestations par les trématodes... 38	
A.	La Fasciolose.....	38
1.	Prévalence d'infestation.....	38
2.	Signes cliniques.....	39
3.	Diagnostic.....	39
a)	Diagnostic expérimental.....	39
b)	Diagnostic nécropsique.....	40
B.	Les Paramphistomoses.....	41
1.	Prévalence d'infestation.....	41
2.	Signes cliniques.....	42
3.	Diagnostic.....	42
a)	Diagnostic expérimental.....	42
b)	Diagnostic nécropsique.....	42
C.	La Dicrocoélie.....	42
1.	Prévalence d'infestation.....	42
2.	Signes cliniques.....	43
3.	Diagnostic.....	43
a)	Diagnostic expérimental.....	43
b)	Diagnostic nécropsique.....	43
D.	Contrôle et prévention.....	44
1.	Lutte thérapeutique.....	44
2.	Lutte agronomique.....	45
E.	Importance économique du parasitisme par les trématodes.....	45
III.	Outils de diagnostic coproscopiques.....	47
A.	Indications de la coprologie chez les ruminants.....	47
B.	Matériel et prélèvements.....	48
1.	Matériel.....	48

2.	Prélèvements.....	48
C.	Les différentes méthodes coproscopiques quantitatives.....	48
1.	La concentration par flottation.....	49
a)	Méthode.....	49
b)	Les différents liquides utilisés pour la flottation.....	49
c)	La technique de McMaster.....	51
d)	Avantages et inconvénients de la flottation.....	52
2.	La concentration par sédimentation.....	53
a)	Méthode.....	53
b)	Avantages et inconvénients de la sédimentation.....	54
 PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE.....		55
I.	Introduction.....	55
II.	Matériel et méthodes.....	57
1.	Les animaux et les prélèvements.....	57
a.	Origine géographique des animaux.....	57
b.	Âge et utilisation des animaux prélevés.....	57
c.	Prélèvements.....	57
i.	Volume requis et identification des prélèvements.....	57
ii.	Transport et conservation avant analyse.....	58
2.	Méthodes de diagnostic coproscopique.....	58
a.	Méthode de McMaster modifiée utilisant le Polytungstate de Sodium (PTS) comme liquide de flottation.....	58
i.	Caractéristiques du PTS.....	58
ii.	Ajustement de la densité de PTS à 1,43g/mL.....	62
iii.	Application à la méthode de McMaster.....	62
iv.	Lecture des réseaux et dénombrement des œufs.....	63
v.	Flottation totale.....	63
b.	Seconde méthode : sédimentation par la méthode de Stoll.....	64
i.	Préparation de la solution de soude.....	64
ii.	Méthode.....	64
iii.	Lecture des lames et dénombrement des œufs.....	65
iv.	Sédimentation totale.....	65
3.	Comparaison des deux méthodes.....	66
4.	Coproscopies de mélange.....	68
5.	Analyses statistiques.....	69
III.	Résultats.....	70
A.	Comparaison des méthodes : flottation au PTS et sédimentation de Stoll... 70	70
1.	Comparaison de l'aspect des œufs de trématodes avec le PTS et avec la méthode de Stoll.....	70

a. <i>Calicophoron daubneyi</i>	70
b. <i>Fasciola hepatica</i>	70
c. <i>Dicrocoelium lanceolatum</i>	71
2. Analyse statistique.....	71
a. Prévalence et taux de mauvaise classification.....	71
b. Agrément.....	73
c. Comptage des œufs et classification.....	80
d. Sensibilité et valeur prédictive négative.....	86
B. Corrélation entre les coproscopies de mélange et les coproscopies individuelles.....	88
C. Comparaison de la mise en pratique des différentes techniques.....	93
1. Comparaison selon le temps nécessaire.....	93
2. Comparaison selon le coût.....	94
3. Facilité de lecture.....	95
IV. Discussion.....	97
A. Matériel et méthodes.....	97
1. Choix des méthodes.....	97
2. Echantillonnage.....	98
B. Résultats.....	98
C. Biais de l'étude.....	101
1. Echantillonnage.....	101
2. Homogénéité de la technique.....	102
3. Recyclage du produit de flottation.....	102
 CONCLUSION.....	 105
 BIBLIOGRAPHIE.....	 111

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : cycle évolutif de <i>Fasciola hepatica</i>	19
Figure 2 : œuf de <i>Fasciola hepatica</i> observé au microscope (×400).....	19
Figure 3 : cycle évolutif de <i>Calicophoron Daubneyi</i>	20
Figure 4 : œuf de <i>Calicophoron daubneyi</i> observé au microscope (× 400).....	21
Figure 5 : cycle évolutif de <i>Dicrocoelium lanceolatum</i>	23
Figure 6 : œuf de <i>Dicrocoelium lanceolatum</i> observé au microscope (×400).....	23
Figure 7 : cycle évolutif général des strongles digestifs des ruminants.....	25
Figure 8 : œuf de strongle observé au microscope (×400).....	26
Figure 9 : œuf de <i>Nematodirus</i> sp observé au microscope (×400).....	27
Figure 10 : cycle évolutif des trichures des ruminants.....	27
Figure 11 : œuf de <i>Trichuris</i> sp observé au microscope (×400).....	28
Figure 12 : cycle évolutif de <i>Strongyloides papillosus</i>	29
Figure 13 : œuf de <i>Strongyloides papillosus</i> observé au microscope (×400).....	29
Figure 14 : cycle évolutif de <i>Toxocara vitulorum</i>	30
Figure 15 : œuf de <i>Toxocara vitulorum</i> observé au microscope (×400).....	30
Figure 16 : cycle évolutif des cestodes.....	31
Figure 17 : œuf de <i>Moniezia expansa</i> observé au microscope (×400).....	32
Figure 18 : cycle évolutif d' <i>Eimeria bovis</i>	35
Figure 19 : cycle évolutif de <i>Cryptosporidium parvum</i>	35
Figure 20 : cycle évolutif de <i>Giardia intestinalis</i>	36
Figure 21 : ookystes d' <i>Eimeria</i> sp en cours de sporulation observés au microscope (× 400).....	37
Figure 22 : ookystes de <i>Cryptosporidium parvum</i> observés au microscope (× 400) après coloration de Ziehl-Neelsen modifiée.....	37
Figure 23 : kystes de <i>Giardia intestinalis</i> observés au microscope (× 400) après coloration au Lugol.....	37
Figure 24 : carte de distribution (en rouge) dans le monde des cas humains de Fasciolose à <i>Fasciola</i> sp.	38
Figure 25 : pourcentage de résultats positifs en coproscopies et observations d'abattoir pour la recherche du paramphistome (Blanc = aucune donnée)	41
Figures 26 et 27 : cellule de McMaster.....	51
Figure 28 : pictogrammes de sécurité.....	59
Figure 29 : densité d'une solution aqueuse de PTS en fonction de la masse de PTS à 25°C... 60	60
Figure 30 : viscosité d'une solution aqueuse de PTS en fonction de la densité de PTS à 25°C.....	61
Figure 31 : déroulement de la méthode de coproscopie par la méthode de McMaster utilisant le PTS.....	63
Figure 32 : déroulement de l'étape d'enrichissement.....	64
Figure 33 : déroulement de la méthode de Stoll.....	65

Figure 34 : réalisation des coproscopies de mélange.....	68
Figure 35 : aspect de l'œuf de <i>Calicophoron Daubneyi</i> au microscope (×400) avec la sédimentation de Stoll (à gauche) et avec la flottation au PTS (à droite).....	70
Figure 36 : aspect de l'œuf de <i>Fasciola hepatica</i> au microscope (×400) avec la sédimentation de Stoll (à gauche) et avec la flottation au PTS (à droite).....	70
Figure 37 : aspect de l'œuf de <i>Dicrocoelium lanceolatum</i> au microscope (×400) quelle que soit la méthode utilisée.....	71
Figure 38 : comparaison des prévalences obtenues avec les différentes méthodes chez les ovins.....	72
Figure 39 : comparaison des prévalences obtenues avec les différentes méthodes chez les bovins.....	73
Figure 40 : moyennes géométriques (\pm écarts-types géométriques) du nombre d'opg des différentes espèces de parasites gastro-intestinaux déterminées par les deux méthodes (PTS et Stoll) des ovins infestés.....	81
Figure 41 : moyennes géométriques (\pm écarts-types géométriques) du nombre d'opg des différentes espèces de parasites gastro-intestinaux déterminées par les deux méthodes (PTS et Stoll) des bovins infestés.....	82
Figure 42 : déroulement comparé des expériences en fonction de la méthode utilisée (flottation au PTS, sédimentation de Stoll)	94
Figure 43 : différentes étape de l'adsorption réalisée dans un filtre à charbon actif.....	104

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : les différentes espèces et assemblages génétiques de <i>Giardia</i> sp.	34
Tableau 2 : tableau récapitulatif des avantages et inconvénients des techniques de flottation et de sédimentation.....	54
Tableau 3 : déroulement des expériences.....	67
Tableau 4 : moyennes et écarts types arithmétiques et géométriques selon la méthode employée pour la détection des œufs de trématodes chez les ovins.....	74
Tableau 5 : moyennes et écarts types arithmétiques et géométriques selon la méthode employée pour la détection des œufs des autres parasites gastro-intestinaux chez les ovins.....	75
Tableau 6 : test exact de permutation, coefficient de corrélation de Pearson, p-value de McNemar et leur interprétation (S = significatif, N S = non significatif) obtenus avec les résultats des ovins.....	76
Tableau 7 : moyennes et écarts types arithmétiques et géométriques selon la méthode employée pour la détection des œufs de trématodes chez les bovins.....	77
Tableau 8 : moyennes et écarts types arithmétiques et géométriques selon la méthode employée pour la détection des œufs des autres parasites gastro-intestinaux chez les bovins.....	78
Tableau 9 : test exact de permutation, coefficient de corrélation de Pearson, p-value de McNemar et leur interprétation (S = significatif, N S = non significatif) obtenus avec les résultats des bovins.....	78
Tableau 10 : détermination du degré d'accord grâce au coefficient Kappa de Cohen (κ) chez les ovins.....	79
Tableau 11 : détermination du degré d'accord grâce au coefficient Kappa de Cohen (κ) chez les bovins.....	80
Tableau 12 : légende des couleurs des tableaux de détermination d'erreurs de classification.....	82
Tableau 13 : détermination d'erreurs de classification des œufs de <i>C. daubneyi</i> chez les ovins.....	83
Tableau 14 : détermination d'erreurs de classification des œufs de <i>D. lanceolatum</i> chez les ovins.....	83
Tableau 15 : détermination d'erreurs de classification des œufs de <i>F. hepatica</i> chez les ovins.....	84
Tableau 16 : détermination d'erreurs de classification des œufs de strongles digestifs chez les ovins.....	84
Tableau 17 : détermination d'erreurs de classification des œufs de <i>C. daubneyi</i> chez les bovins.....	85
Tableau 18 : détermination d'erreurs de classification des œufs de <i>D. lanceolatum</i> chez les bovins.....	85

Tableau 19 : détermination d'erreurs de classification des œufs de strongles digestifs chez les bovins.....	86
Tableau 20 : sensibilité et valeur prédictive négative (VPN) et les intervalles de confiance à 95% (IC) des méthodes de flottation au PTS et de sédimentation de Stoll pour la détection des parasites gastro-intestinaux des ovins.....	88
Tableau 21 : sensibilité et valeur prédictive négative (VPN) et les intervalles de confiance à 95% (IC) des méthodes de flottation au PTS et de sédimentation de Stoll pour la détection des parasites gastro-intestinaux des bovins.....	89
Tableau 22 : comparaison des moyennes individuelles et des moyennes des mélanges (en opg) dans la détection d'œufs de <i>C. daubneyi</i>	90
Tableau 23 : comparaison des moyennes individuelles et des moyennes des mélanges (en opg) dans la détection d'œufs de <i>D. lanceolatum</i>	90
Tableau 24 : comparaison des moyennes individuelles et des moyennes des mélanges dans la détection d'œufs de <i>F. hepatica</i>	91
Tableau 25 : comparaison des moyennes individuelles et des moyennes des mélanges dans la détection d'œufs de strongles digestifs.....	91
Tableau 26 : comparaison des deux mélanges répétés par troupeau (T1 à T4) et par espèce parasitaire.....	92
Tableau 27 : calcul des coefficients de variation de mélange (en %).....	92
Tableau 28 : comparaison des coûts des deux techniques utilisées (flottation au PTS ou sédimentation de Stoll)	95
Tableau 29 : comparaison des prix des coproscopies en fonction de la technique utilisée (flottation au PTS ou sédimentation de Stoll)	96
Tableau 30 : estimation des recettes en fonction de la technique utilisée (flottation au PTS ou sédimentation de Stoll)	96

INTRODUCTION

Les affections parasitaires des animaux de production, telles que les trématodoses, ont de nombreuses répercussions économiques et médicales. En effet, elles impactent la santé et le bien-être des animaux, ainsi que l'économie de l'élevage, par mortalité, retard de sa croissance, diminution de la qualité et de la quantité de lait par exemple. Des saisies peuvent également avoir lieu lors de l'abattage, ce qui représente un manque à gagner pour l'éleveur.

La prévention du parasitisme joue donc un rôle très important dans les élevages. Celle-ci passe par la mise en place de schémas de traitement raisonnés et adaptés spécifiquement à chaque élevage. Il s'agit en effet d'identifier les espèces parasitaires en jeu, ainsi que leurs traits épidémiologiques, c'est-à-dire les périodes à risque et les moments-clés de traitement permettant de rompre les cycles évolutifs. Il est important de noter que la valeur de ces traitements est infime si une bonne gestion sanitaire (notamment la gestion des pâtures) n'est pas envisagée dans le même temps.

La coproscopie est une méthode de diagnostic rapide et simple, qui rassemble de nombreuses techniques que nous évoquerons dans la première partie de ce travail. Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés à la fois aux méthodes de sédimentation et aux méthodes de flottation, puisque dans la deuxième partie, nous avons comparé ces deux techniques.

Les œufs de trématodes, dits « lourds » en raison de leur densité élevée, nécessitent l'élaboration de protocoles coproscopiques particuliers. Lors d'un enrichissement par flottation, le liquide utilisé doit être assez dense pour faire remonter ces œufs (sinon la sensibilité de la technique sera médiocre voire nulle), et nous nous heurtons aujourd'hui à des risques sanitaires et environnementaux, en raison de la toxicité des liquides denses utilisés jusqu'ici, notamment celle du iodomercurate de potassium.

Une autre méthode, celle de l'enrichissement par sédimentation peut être utilisée, mais cette technique requiert un temps conséquent pour l'identification et le comptage des œufs en raison de la quantité de débris présents sur les lames qui ralentissent l'observation minutieuse des œufs. En outre elle semble peu sensible pour la mise en évidence des œufs de trématodes, surtout lorsque le niveau d'infestation ou d'excrétion fécale est faible.

Devant ce constat, il est apparu nécessaire de rechercher une alternative, combinant à la fois la rapidité et la praticité des techniques de flottation, une grande sensibilité et une reconnaissance aisée des œufs. Pour envisager une technique mettant en œuvre la flottation, un liquide dense est donc nécessaire pour la détection des œufs de trématodes.

C'est pourquoi nous avons choisi le Polytungstate de sodium (appelé PTS par la suite), utilisé à l'origine comme liquide de haute densité pour effectuer des séparations minérales, puis en archéologie, paléontologie, et palynologie (ou étude des grains de pollen). Ce liquide dense nous est donc apparu comme idéal pour la détection coproscopique des œufs de trématodes, car il est très soluble dans l'eau, ce qui permet l'élaboration de solutions elles aussi très denses.

Dans le cadre de l'étude expérimentale, il a donc été décidé d'utiliser le PTS (combiné avec la méthode de McMaster), afin d'évaluer l'application possible de ce sel dans le diagnostic coproscopique des infestations intestinale des ruminants, en mettant l'accent sur les

principaux trématodes (*Fasciola hepatica*, *Calicophoron daubneyi* et *Dicrocoelium lanceolatum*) présents en France métropolitaine, et de comparer ses performances à la méthode classique de Stoll (qui est la technique utilisée au laboratoire de l'ENVT aujourd'hui pour la détection des œufs de trématodes).

Notre étude a certes pour objet la validation d'une nouvelle technique de détection coproscopique des œufs de trématodes chez les ruminants, mais nous n'avons pas pour autant occulté les autres parasites du système digestif. Ainsi, tous les parasites ont été recherchés lors des examens coproscopiques, et les études statistiques ont été réalisées sur l'ensemble des parasites gastro-intestinaux des ruminants.

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Présentation des parasites gastro-intestinaux recherchés par coproscopie

Nous détaillerons dans cette partie plus particulièrement les éléments importants du cycle évolutif des trématodes, qui sont les espèces d'intérêt dans le développement de notre partie expérimentale. Les autres parasites gastro-intestinaux des ruminants sont présentés plus brièvement, car ils ne sont pas les objets spécifiques de nos travaux. Les techniques de mise en évidence dans les matières fécales des éléments parasitaires des espèces autres que les trématodes utilisent des solutions classiques avec une densité inférieure à 1,4, comme par exemple la solution de Willis (solution de NaCl à saturation, avec une densité de 1,2).

A. Les trématodes

La classe des trématodes appartient à l'embranchement des plathelminthes, et se caractérise morphologiquement par une cuticule non ciliée au stade adulte, et par un tube digestif incomplet (absence d'anus), pourvu de cæcums. Ils sont généralement hermaphrodites. Trois sous-classes composent la classe des trématodes, mais seule celle des *Digenea* nous intéresse dans le cadre de cette étude.

En France métropolitaine, les principales maladies dues à des infestations par les trématodes sont la Fasciolose (due à *Fasciola hepatica*), les Paramphistomoses (avec comme espèce principale *Calicophoron daubneyi*) et la Dicrocoeliose (résultant d'une infestation par *Dicrocoelium lanceolatum*).

1. *Fasciola hepatica*

a) Présentation du parasite et espèces cibles

Fasciola hepatica, également appelé « Grande Douve » est un trématode digène (à deux ventouses, l'une ventrale, dans la moitié antérieure du corps, et l'autre buccale, au fond de laquelle est présente la bouche) au corps foliacé qui mesure 2 à 2,5 cm de long à l'état adulte (Euzéby 2008).

La Fasciolose est une helminthose hépatobiliaire, cosmopolite et saisonnière, due à la migration dans le parenchyme hépatique des formes immatures histophages, et à l'installation dans les canaux biliaires du ver adulte, hématoophage. Ce parasite peut survivre jusqu'à une dizaine d'années chez les ovins contre 18 mois chez les bovins.

Cette helminthose touche les ruminants essentiellement, mais aussi de nombreux autres mammifères tels que les équidés, les suidés, les cervidés, les rongeurs et l'homme.

b) Cycle évolutif (figure 1)

Le cycle de ce parasite a une durée moyenne d'environ 6 mois, caractérisé par une partie exogène, allant de l'œuf jusqu'aux métacercaires, et par une partie endogène, allant de l'ingestion des métacercaires jusqu'à la présence de douves adultes dans le parenchyme hépatique. Ce cycle de type dixène a pour hôtes définitifs essentiellement les ruminants, et plus mineure les autres espèces évoquées, et pour hôte intermédiaire obligatoire principalement la Limnée tronquée, *Galba truncatula*. La Limnée tronquée est un gastéropode pulmoné amphibiotique à coquille spiralée mesurant en moyenne 12 mm, vivant dans les

zones humides (prairies marécageuses, fossés les bordant et berges en pente douce des cours d'eau), et se nourrissant d'algues microscopiques et de bactéries.

Après fécondation croisée ou autofécondation, les œufs de *F. hepatica* sont expulsés dans le milieu extérieur avec les matières fécales. Ils ont besoin d'eau en nature (jusqu'à 10 cm de profondeur en moyenne) pour évoluer en miracidium. En trois semaines (dans les conditions optimales), l'œuf éclot et le miracidium s'échappe par l'opercule ouvert. Cette larve nageuse au tégument cilié présente un chimiotactisme positif pour la Limnée tronquée, dans laquelle elle pénètre de manière active, et se transforme alors en sporocyste dans la chambre pulmonaire. Le miracidium contient de nombreuses cellules germinatives donnant des rédies qui migrent vers l'hépatopancréas. Ces dernières donnent naissance à des cercaires par multiplication asexuée. Des rédies de deuxième génération peuvent être produites si les conditions environnementales sont mauvaises. Pour un miracidium qui pénètre dans la limnée, jusqu'à 300 cercaires clonales peuvent être produites. Les cercaires pourvues d'une queue sortent du mollusque après 45 j. en moyenne pendant la belle saison. L'émission cercarienne est induite par des changements de température (température supérieure à 10°C), d'humidité et d'hygrométrie. Après une nage brève (2 h), elles se fixent au collet des plantes et se transforment en métacercaires dépourvues de queue et qui sont la forme quiescente (jusqu'à 6 mois). Les métacercaires, éléments infestants, sont à l'origine, une fois ingérées par l'animal, de la libération des formes immatures de *Fasciola hepatica* ou *adoloscarias* qui éclosent dans le duodénum, après l'action notamment des sucs gastriques. Après une traversée rapide de la paroi de l'intestin grêle en moins de 24h, les formes immatures migrent librement dans le péritoine jusque dans le parenchyme hépatique, qu'elles atteignent en une quinzaine de jours. Elles circulent dans le parenchyme hépatique pendant environ 7 à 8 semaines avant de pénétrer dans les canaux biliaires où elles atteignent la maturité sexuelle en 10 à 12 semaines (Dorchies et al., 2012 ; Dalton, 1998).

Le degré d'infestation des ruminants au cours de l'année est dépendant du nombre de métacercaires libérés par les limnées, donc de l'activité de ces dernières, qui est maximale au printemps et à l'automne.

Il est important de prendre ce cycle dixène en considération, notamment en ce qui concerne la prévention de l'infestation. En effet, la prophylaxie de la Fasciolose implique de combiner à la fois des mesures thérapeutiques et agronomiques.

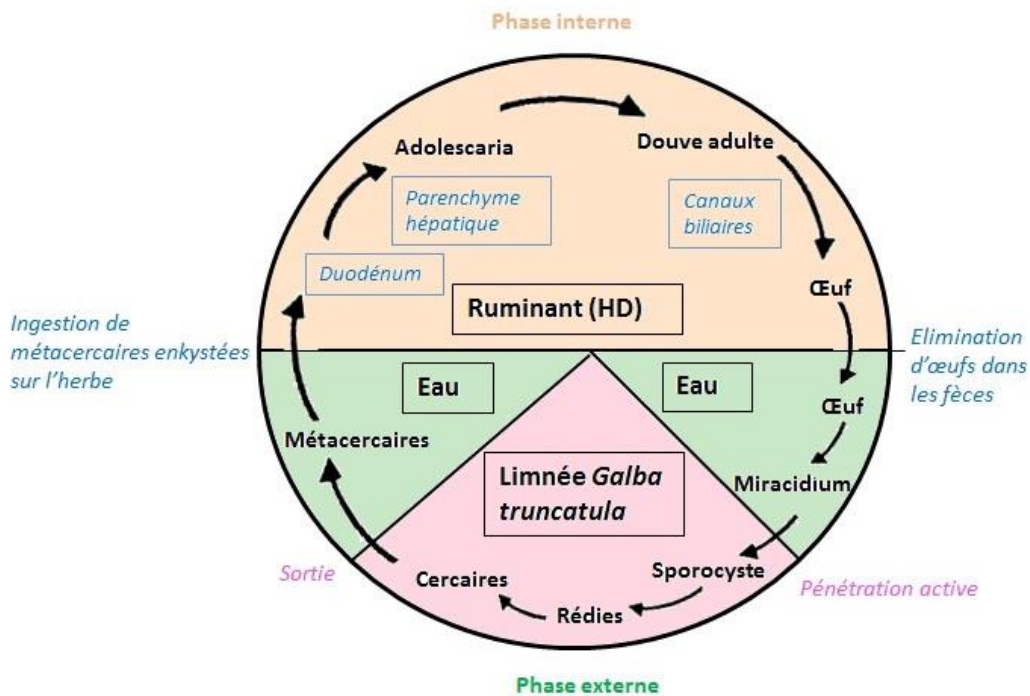


Figure 1 : cycle évolutif de *Fasciola hepatica* (d'après Kassai, 1999)

c) Morphologie de l'œuf

L'excrétion des œufs dans les fèces débute environ 3 mois après l'infestation (durée de la période prépatente). Il n'y a pas de relation entre l'infestation parasitaire et le nombre d'œufs présents dans les matières fécales, car la ponte des douves est peu abondante, et très irrégulière.

Ainsi, l'examen coproscopique des fèces est utilisé pour connaître le statut sanitaire vis-à-vis de la grande douve dans un élevage : la mise en évidence d'un œuf chez un animal du cheptel conduit à considérer ce cheptel comme infesté. Il est utile également lors de Fasciolose chronique, mais totalement inutile lors de Fasciolose aiguë, observée le plus souvent chez les petits ruminants, et due aux adolescarias en migration dans le parenchyme hépatique (Mage 2008).

Les œufs de *Fasciola hepatica* sont ellipsoïdes, de grande taille (80 µm × 140 µm), à paroi fine et lisse, operculés à une extrémité, marron-jaunâtres et non-embryonnés (figure 2). Ce sont des œufs lourds, ce qui implique l'emploi de techniques particulières pour leur détection coproscopique.



Figure 2 : œuf de *Fasciola hepatica* observé au microscope (×400)

2. *Calicophoron daubneyi*

a) Présentation du parasite et espèces cibles

L'espèce de paramphistomidés la plus prévalente chez les ruminants domestiques en France est *Calicophoron daubneyi*. Il vit dans leur réticulo-rumen, fixé en colonies de tailles variables (allant de quelques individus à des centaines). Exception parmi les trématodes, ce parasite a un corps conoïde, de couleur rouge bien que non hématophage au stade adulte, et mesure entre 6 et 10 mm de longueur (Dorchies et al., 2012). La bouche est au fond de la ventouse buccale et en avant du corps tandis que la ventouse ventrale est repoussée à l'extrémité distale. Il a une durée de vie de 5 ans.

b) Cycle évolutif (figure 3)

Le cycle de ce parasite, de type dixène, est très semblable à celui de *Fasciola hepatica*, du moins dans sa phase exogène. Les éléments infestants pour l'hôte définitif sont les métacercaires. L'hôte intermédiaire obligatoire est un mollusque gastéropode pulmoné dulçaquicole, le plus souvent la Limnée tronquée, mais parfois aussi des Bulins et Planorbes. La phase endogène débute par l'ingestion des métacercaires. Ensuite a lieu la libération des formes immatures dans la caillette. Elles s'enfoncent alors dans la sous-muqueuse du duodénum (dans sa partie proximale). Hématophages à ce stade, elles s'y développent pendant une dizaine de jours. Une migration rétrograde de 20 à 40 jours les amène jusqu'au réseau et au rumen, où elles vont se fixer grâce à leur ventouse postérieure (acétabulum). Elles acquièrent leur maturité sexuelle dans la panse en 40 jours. La durée de la période prépatente est en moyenne de 3 mois (Mage, 2008).

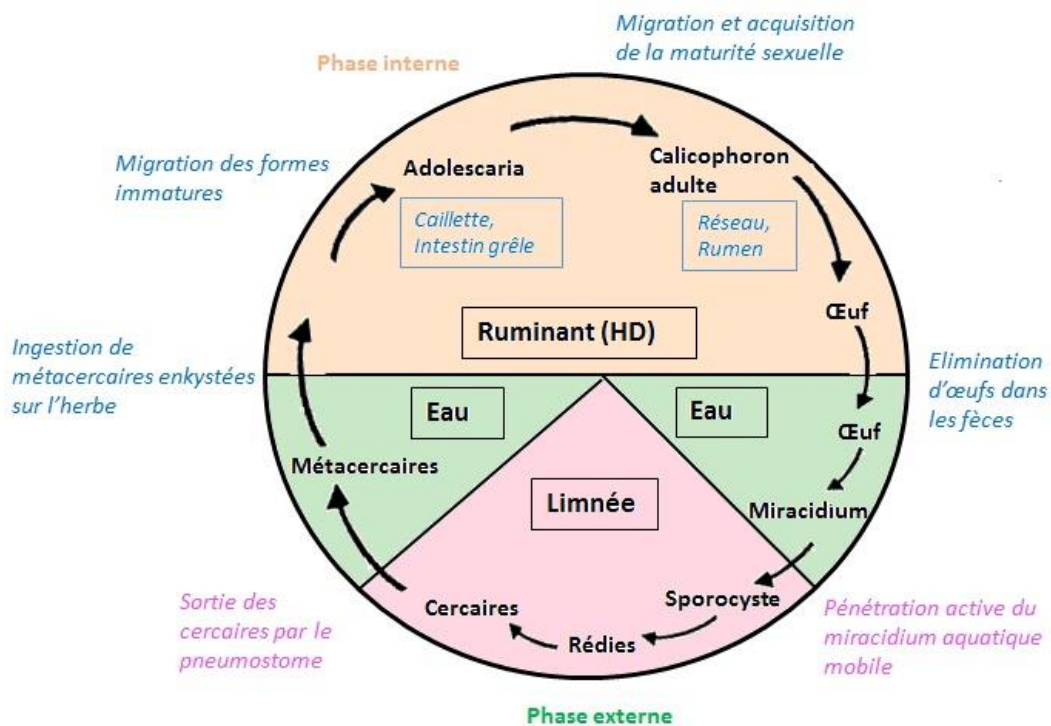


Figure 3 : cycle évolutif de *Calicophoron Daubneyi* (d'après Kassai, 1999)

c) Morphologie de l'œuf

Les œufs de *Calicophoron daubneyi* sont ellipsoïdes, à coque mince et lisse, non embryonnés, operculés à une extrémité, de couleur grisâtre à légèrement verdâtre et de grande taille également, en moyenne 80 µm × 160 µm (figure 4). Ils sont donc très similaires aux œufs de *Fasciola hepatica*, à cela près qu'ils sont de couleur différente, et qu'ils sont à pôle inégaux (tandis que les œufs de *Fasciola hepatica* présentent des pôles subégaux) (Bowman, 1999). Contrairement à *Fasciola hepatica*, l'excrétion des œufs est massive, bien que non constante dans le temps. Ce sont des œufs lourds requérant des techniques de mise en évidence identiques à ceux de la grande douve.



Figure 4 : œuf de *Calicophoron daubneyi* observé au microscope (× 400)

3. *Dicrocoelium lanceolatum*

a) Présentation du parasite et espèces cibles

Dicrocoelium lanceolatum ou *Dicrocoelium dendriticum*, également appelé « Petite Douve », est un trématode digène plat qui mesure à l'état adulte 6 mm de long sur 2 mm de large, pourvu de deux ventouses (une buccale et une ventrale). La ventouse ventrale est située dans la moitié antérieure du ver, comme *F. hepatica*. Le parasite adulte se situe dans les canaux biliaires de petit diamètre des ruminants essentiellement, mais il peut infester également d'autres mammifères herbivores comme les équidés ou les lagomorphes et rongeurs, ainsi que diverses espèces omnivores (porcins, homme) ou carnivores (Euzéby, 2008).

b) Cycle évolutif (figure 5)

Son cycle, complexe, dit tri-hétéroxène, fait intervenir deux hôtes intermédiaires obligatoires et un hôte définitif. Le premier hôte intermédiaire est un mollusque terrestre xérophile. Plus de 90 espèces appartenant à différents genres comme *Cochlicopa* sp, *Helicella* sp ou *Zebrina* sp. ont été décrites à travers le monde. Le second hôte intermédiaire est une fourmi du genre *Formica* (*Formica fusca*, *F. pratensis*, *F. rufibarbis* et *F. nigricans*).

Après fécondation croisée ou autofécondation, les petites douves pondent des œufs déjà embryonnés contenant un miracidium. Ils sont entraînés par la bile et le contenu intestinal et expulsés dans le milieu extérieur avec les matières fécales. La ponte est peu importante et très irrégulière. À la différence de *F. hepatica* et de *C. daubneyi*, les œufs n'éclosent pas dans l'environnement mais dans l'intestin du mollusque après ingestion, par l'ouverture de leur opercule. Cette éclosion libérant le miracidium cilié est initiée par la réaction intestinale des mollusques, et le pH local. Cette larve atteint l'hépatopancréas du mollusque, et donne alors

deux générations successives de sporocystes. Une température supérieure à 4°C est nécessaire à la maturation des sporocystes, qui contiennent des massifs de cellules germinales, produisant, par multiplication asexuée, les sporocystes de deuxième génération. Pourvus d'un orifice de ponte, ils donnent naissance directement à des cercaires sans stade rédie. Ainsi, chaque miracidium peut engendrer une centaine de cercaires. Dans la chambre pulmonaire du mollusque, elles s'agglomèrent et forment des kystes de 200 à 400 cercaires, d'un diamètre de 1 à 1,5 mm enveloppés d'une sécrétion muqueuse du mollusque. La formation de ces « boules de bave » ou « boules de mucus » est initiée par une baisse de la température (15 à 18°C). Ces boules sont éliminées sur l'herbe par l'escargot parasité, via son pneumostome, par l'action des mouvements respiratoires. Elles peuvent s'agréger et contenir jusqu'à 6 000 cercaires protégées de la dessiccation, et survivent jusqu'à 4 à 6 jours suivant les conditions environnementales. La survie est plus courte lors de sécheresse (déshydratation) ou de pluies importantes (liquéfaction).

Le cycle se poursuit par l'ingestion des grappes de cercaires par une fourmi. Après quelques heures dans le jabot, les cercaires perdent leur queue, traversent la paroi du tube digestif et s'enkystent ensuite sous forme métacercarienne dans la cavité abdominale, voire thoracique ou dans la tête en 24 à 48 heures, où elles se disposent entre les différents organes (tissus adipeux et muscles, jamais dans le tube digestif). Le portage parasitaire d'une fourmi peut dépasser 200 kystes métacercariens. Une métacercarie se localise dans la partie ventrale de leur ganglion nerveux sous-œsophagien, au contact de l'émergence des nerfs moteurs des pièces buccales. L'activité nerveuse des muscles maxillaires et mandibulaires est alors perturbée. Au cours de la journée, la fourmi parasitée conserve une activité normale. Lorsque la température devient inférieure à 15°C (de la fin de journée jusqu'au matin), les fourmis parasitées restent accrochées par une crispation de leurs mandibules, à l'extrémité distale des rameaux végétaux, la tête généralement vers le bas (le spasme n'est levé que lorsque la température dépasse la température critique de 15°C, et la fourmi retrouve alors une activité normale). Cette contraction musculaire accroît donc la probabilité des fourmis d'être ingérées par l'hôte définitif. La fourmi est digérée et les métacercaries sont libérées dans le tube digestif de l'hôte définitif. Sous l'action de la bile et du suc pancréatique se produit le désenkystement des *adolescaris*. Plusieurs voies de migration ont été évoquées pour arriver aux canalicules biliaires. La principale semble la voie rétrograde dans le canal cholédoque depuis son ouverture dans le duodénum, sans passage par le parenchyme hépatique. Les petites douves adultes commencent à pondre 8 à 10 semaines après l'ingestion de la fourmi. La durée de la phase exogène du cycle est de 3 à 6 mois et dépend fortement de la température : l'évolution de l'œuf ingéré jusqu'aux cercaires chez les gastéropodes est de 2 à 5 mois selon leur activité, et la durée d'évolution des cercaires en métacercaries chez la fourmi est de 40 à 60 jours. La période prépatente est d'environ 2 mois (Kassai, 1999).

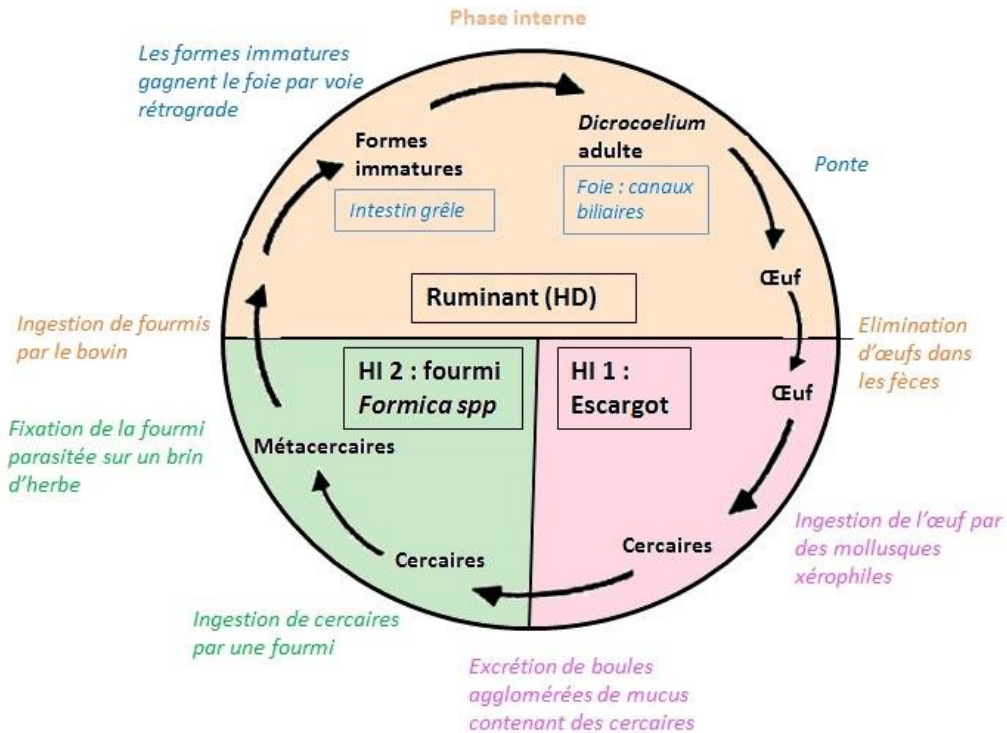


Figure 5 : cycle évolutif de *Dicrocoelium lanceolatum* (d'après Kassai, 1999)

c) Morphologie de l'œuf

L'excrétion des œufs de petite douve chez les ovins est plus importante et moins aléatoire que chez les bovins. Ainsi, chez les bovins, l'examen coproscopique est souvent réalisé sur plusieurs individus du troupeau, afin de détecter la présence ou non du parasite dans le cheptel. C'est un diagnostic qualitatif plus que quantitatif, d'autant plus que les signes cliniques rares, non spécifiques semblent être dus à l'accumulation des parasites au fur et à mesure du temps.

Les œufs de *Dicrocoelium lanceolatum* sont de petite taille ($40 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$), ellipsoïdes, légèrement asymétriques, de couleur sombre, brun-noir à coque épaisse, embryonnés et pourvus d'un opercule peu visible à l'un des pôles (figure 6). Ils contiennent deux masses germinatives très sombres.

Étant eux aussi des œufs lourds comme tous les œufs de trématodes, les techniques de coproscopie utilisées sont les mêmes que pour la Grande douve ou les Paramphistomes (Bowman, 1999).



Figure 6 : œuf de *Dicrocoelium lanceolatum* observé au microscope ($\times 400$)

B. Les nématodes

1. Présentation des nématodes et espèces cibles

Les nématodes sont également appelés « vers ronds ». Ce sont des vers cylindriques, non segmentés, pseudo-coelomates, à tube digestif complet. Leur reproduction est dans la majorité des cas sexuée avec des sexes séparés. Des espèces comme les *Strongyloides* sp. sont capables de parthogénie. Plus de 16000 espèces ont été décrites, la plupart ayant un mode de vie libre, et quelques centaines seulement sont parasites des plantes ou des animaux à tout ou partie de leur cycle évolutif. Parmi les parasites animaux, certains ont un cycle monoxène, mais d'autres ont un cycle hétéroxène. Des espèces ont même une séclusion totale (sans passage par le milieu extérieur) et peuvent être vectorisées par des arthropodes hématophages ou non.

Les strongles gastro-intestinaux (SGI), qui appartiennent à l'ordre des *Strongylida*, à la superfamille des Trichostrongyloidea et à la famille des Trichostrongylidae nous intéressent principalement, car ils sont cosmopolites, et sont pathogènes pour les ruminants. Nous nous intéresserons également à l'ordre des *Trichinellida*, en raison de la fréquence de la trichurose dans nos contrées, à *Strongyloides papillosus* qui infeste les ruminants, et à *Toxocara vitulorum* présent chez les bovins uniquement.

2. Les strongles gastro-intestinaux des ruminants

a. Cycle évolutif (figure 7)

Le polyparasitisme par les strongles gastro-intestinaux (SGI) est fréquent, particulièrement chez les petits ruminants. Leur cycle évolutif est de type monoxène avec une phase libre dans le milieu extérieur et une phase parasitaire (figure 7). Les vers adultes sont localisés dans la caillette, dans l'intestin grêle ou le gros intestin suivant les espèces. Les femelles pondent des œufs dans le tube digestif, qui sont éliminés avec les matières fécales à l'extérieur. Dans la plupart des espèces, l'œuf éclot au sein des fèces et donne une larve au stade 1 (L1) qui mue ensuite en L2. Ce sont des stades fragiles qui se nourrissent de bactéries dans l'environnement, et accumulent des réserves. La L2 donne ensuite une L3 qui est protégée dans l'exuvie de la L2 et qui ne s'alimente pas. C'est le stade infestant et de survie (de plusieurs semaines à plusieurs mois) sur la pâture. Suivant les conditions climatiques, le développement de l'œuf jusqu'au stade L3 requiert 8 à 30 jours. Les L3 sont ingérées avec l'herbe. Il y a alors migration dans la muqueuse de l'organe-cible, passage au stade L4 puis retour dans la lumière de l'organe, le tout en occasionnant des lésions. Une hypobiose (arrêt de développement des L4 pendant plusieurs mois) est possible chez certaines espèces comme *Haemonchus contortus* (ovins) et *Ostertagia ostertagi* (bovins) quand les conditions extérieures sont défavorables, c'est-à-dire en hiver sous nos latitudes. Les L4 donnent des adultes immatures qui, sans mue, deviennent adultes. La période prépatente est de 3 semaines environ (sans hypobiose) (Bussieras, Chermette 1995).

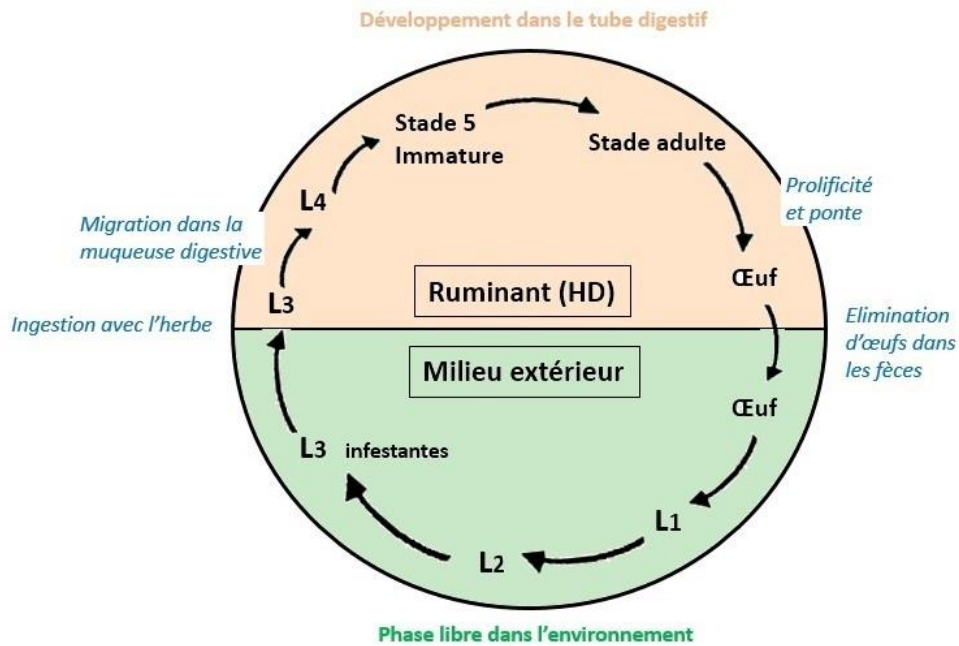


Figure 7 : cycle évolutif général des strongles digestifs des ruminants

b. Principales espèces

Nous pouvons distinguer différentes familles de strongles digestifs, en fonction de leur organe cible (Bowman, 1999) :

- Parasites de la caillette : *Ostertagia ostertagi* représente environ 90% des strongles digestifs retrouvés chez les bovins. C'est un ver de petite taille (8 à 12mm de long), fin, brun rougeâtre, dont l'évolution L3 vers L4 se déroule dans le cul-de-sac formé par les glandes de la caillette, puis ressort dans la lumière pour atteindre le stade adulte. Il faut attendre le mois de juin pour observer des adultes à la levée de l'hypobiose (qui est le « blocage » du développement du parasite au stade L4 lors de l'hiver). Chez les ovins et caprins, les principaux parasites de la caillette sont *Haemonchus contortus* (ver de 2-3cm de long, de couleur rougeâtre liée à son mode d'alimentation hématophage), *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus axei*. Le ver adulte de *T. axei* est difficilement discernable à l'œil nu, d'une longueur généralement inférieure à 7 mm et de faible diamètre. Il est présent également chez les bovins, son spectre d'hôtes est large (Lacroux 2006). Nous noterons également que les jeunes ruminants peuvent être infestés par des nématodes qui ne sont pas des strongles, mais de l'ordre des Rhabditida et du genre *Strongyloides*. Des œufs embryonnés peuvent être retrouvés lors de l'examen coproscopique de matières fécales venant d'être émises.
- Parasites de l'intestin grêle : chez les ruminants, les parasites de l'intestin grêle les plus retrouvés appartiennent aux genres *Trichostrongylus*, *Cooperia* et *Nematodirus*. Adulte, *Nematodirus* est un ver pâle qui mesure de 1 à 2.5cm de long. Les stades L1, L2 et L3 sont des formes de survie car elles sont protégées par la coque de l'œuf. Les

ruminants s'infestent en ingérant des œufs contenant des L3, ou par des L3 ayant éclos sur la pâture.

- Parasites du gros intestin : les principaux strongles retrouvés appartiennent au genre *Oesophagostomum* chez les ruminants et *Chabertia ovina* chez les petits ruminants

Les animaux naïfs, généralement les jeunes, primo-infestés en première saison de pâture, sont les plus sensibles et acquièrent un grand nombre de parasites, qui sont à l'origine d'une ponte massive et donc d'une émission importante d'œufs dans les fèces. Chez les animaux plus âgés, l'excrétion est moindre en raison de l'acquisition d'une immunité protectrice (Jacquiet, 2001).

Au printemps, les animaux contaminent les pâtures avec les parasites acquis l'année précédente, et peuvent se surinfester grâce aux larves L3 présentes. Pendant l'hiver, le froid (et plus précisément les alternances de gel et de dégel) entraîne une diminution du nombre de larves L3 sur les prés mais malheureusement sans assainissement total. Il s'agit de larves transhivernantes.

Lors de la mise à l'herbe au printemps suivant, les jeunes ruminants naïfs assurent le recyclage des larves par l'ingestion des L3 transhivernantes qui commenceront à pondre 3 semaines plus tard. Globalement, à partir de la fin du printemps, l'évolution des œufs est très rapide, ainsi, en été, un pic de larves sur les pâtures est observé. Toutefois, ces éléments d'épidémiologiques très généraux ne définissent pas de plan de prophylaxie applicable sans réflexion et sans adaptation aux conditions propres à chaque élevage. De nombreux éléments déterminants interviennent quant à la survenue des pics d'infestations et des signes cliniques. Il faut définir par exemple quelles sont les espèces parasitaires présentes et dominantes, connaître leurs principaux traits biologiques propres, étudier les modes d'élevage et d'alimentation, tenir compte des conditions météorologiques et des facteurs de résistance et résilience des hôtes : tous ces éléments sont à prendre en compte dans le contrôle des SGI.

c. Aspect des œufs en coproscopie (figures 8 et 9)

Les œufs des différentes espèces de strongles digestifs sont très semblables, et sont donc très peu, voire pas du tout, différenciables en coproscopie, hormis ceux de *Nematodirus* sp qui sont très caractéristiques car beaucoup plus grands.

Les œufs de strongles sont ellipsoïdes, dépourvus de bouchon polaire, et non operculés. La paroi est mince et contient une morula et non une larve (cas de *Strongyloides papillosus*). Ils mesurent en moyenne 80-100 × 40-50 µm.

L'œuf de *Nematodirus* est quant à lui deux fois plus grand.



Figure 8 : œuf de strongle observé au microscope (×400)

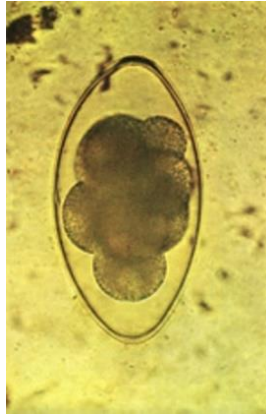


Figure 9 : œuf de *Nematodirus* sp observé au microscope (x400)

3. Les trichures

a. Cycle évolutif (figure 10)

Le cycle parasitaire est de type monoxène. Il comprend 4 stades larvaires, suivi d'un stade pré-adulte puis d'un stade adulte. Les œufs pondus par les femelles sont éliminés avec les matières fécales et s'embryonnent en 3 semaines à 6 mois au sol. Ils sont extrêmement résistants, et peuvent survivre jusqu'à 9 ans lorsque l'humidité est suffisante, dans le cas de *Trichuris suis* chez les porcins. L'infestation débute par l'ingestion de ces œufs embryonnés contenant les larves de stade 1. Certains auteurs évoquent une évolution dans l'œuf jusqu'au stade 2 ou 3. Les œufs éclosent dans la lumière du gros intestin, la larve est alors libérée et pénètre dans la paroi cœcale ou colique. Des mues successives ont lieu jusqu'au stade pré-adulte (il n'y a pas de mue entre le stade adulte immature et le stade adulte), où la partie caudale émerge dans la lumière intestinale du cœcum et du colon dès le stade L2, sans relâcher la fixation pariétale (Bowman, 1999). La période prépatente dure environ 10 semaines.

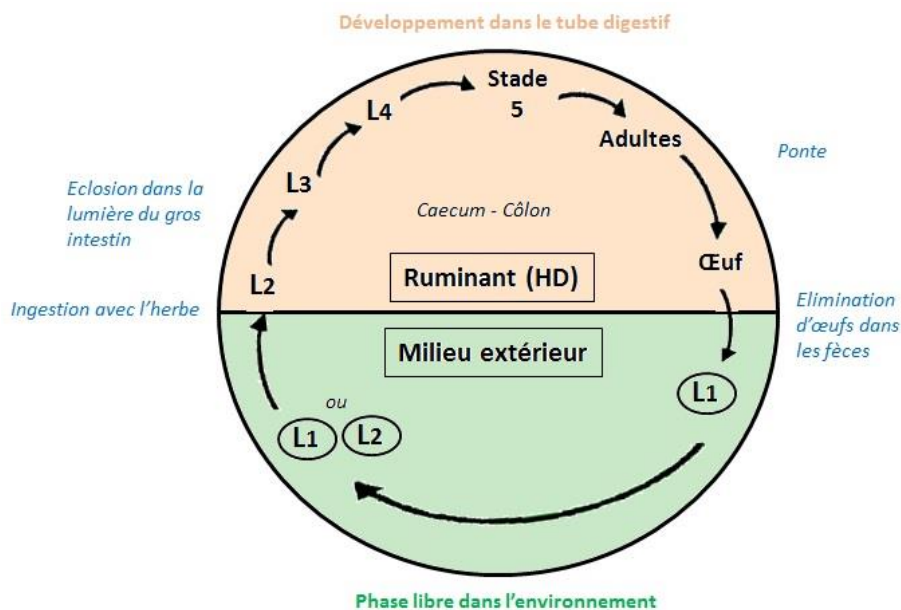


Figure 10 : cycle évolutif des trichures des ruminants

b. Principales espèces

Les espèces parasitant les bovins sont *Trichuris globulosa* et *Trichuris discolor* alors que *Trichuris ovis* affecte les ovins. Les trichuroses sont des parasitoses cosmopolites. Les trichures ont une forme de « fouet », sont blanchâtres et mesurent environ 7 cm pour les femelles, et 3 cm pour les mâles. L'extrémité antérieure est très fine et beaucoup plus longue que l'extrémité postérieure plus large. Ils sont hématophages.

c. Aspect des œufs en coproscopie (figure 11)

Les œufs de *Trichuris* ont une forme cylindrique, amincie aux extrémités, et sont caractérisés par la présence de bouchon translucide à chaque pôle. Ils mesurent en moyenne 70-80 × 30-40 µm.



Figure 11 : œuf de *Trichuris* sp observé au microscope (×400)

4. *Strongyloides papillosus*

a. Cycle évolutif (figure 12)

Il s'agit d'un parasite de l'ordre des Rhabditida (Bussieras, Chermette 1995), appartenant à la famille des Strongyloïdés. Les femelles parthénogénétiques vivent dans la muqueuse de l'intestin grêle et sont hématophages. C'est une parasitose provoquant des signes cliniques chez les jeunes animaux. Le cycle évolutif est relativement complexe, avec une reproduction sexuée s'effectuant dans la litière, où sont présents les mâles et femelles adultes. Le très jeune ruminant s'infeste soit par voie transcutanée, soit par voie buccale lors de la tétée (passage des larves L3 dans le colostrum ou le lait). Les larves L3 pénètrent la plupart du temps par voie transcutanée et gagnent le cœur droit par voie lymphatique et sanguine (*via* la veine cave). Les larves ingérées dans le lait migrent elles aussi au cœur droit, en passant par la muqueuse buccale ou œsophagienne. Ces larves quittent le cœur et atteignent les poumons où a lieu une mue. Les larves L4 sont alors dégluties et se fixent dans l'intestin grêle. Une dernière mue permet l'obtention du stade 5 précédant le stade adulte. Seules les femelles sont présentes chez l'hôte parasité, et donnent, par parthénogénèse, des œufs émis dans le milieu extérieur avec les fèces. Dans le milieu extérieur, la reproduction sexuée est privilégiée si les conditions extérieures sont favorables.

Il s'agit d'un des parasites majeurs des agneaux, chevreaux et veaux maintenus en bâtiment, qui provoque, lors d'infestation importante, des troubles diarrhéiques graves avec déshydratation. Il est en revanche peu fréquent chez les jeunes animaux en pâture.

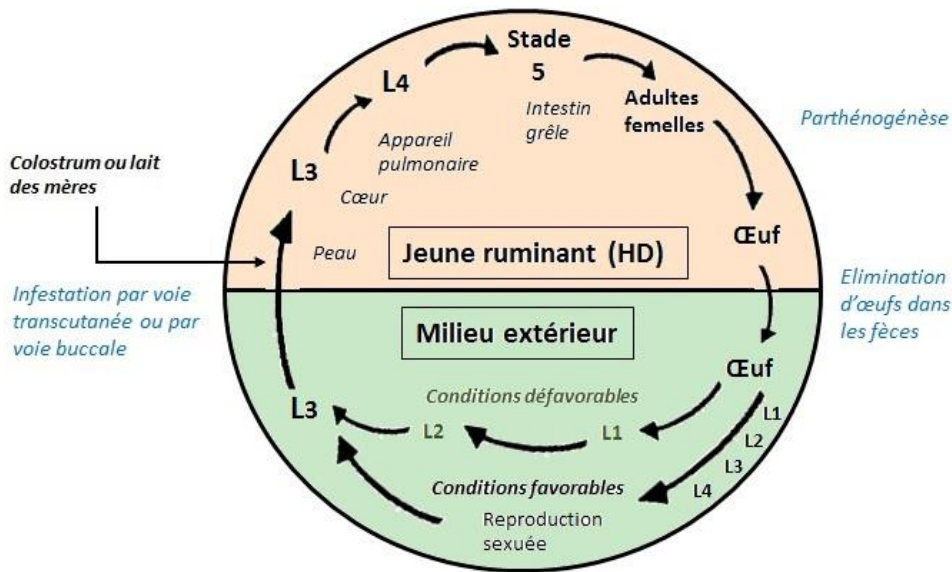


Figure 12 : cycle évolutif de *Strongyloides papillosus*

b. Aspect des œufs en coproscopie (figure 13)

L'œuf est ellipsoïde, ayant une taille moyenne de 40-60 × 20-25 µm. Il n'a pas de bouchons polaires et n'est pas operculé. La coque est mince et renferme une larve de premier stade (L1).



Figure 13 : œuf larvé (L1) de *Strongyloides papillosus* observé au microscope (×400)

5. *Toxocara vitulorum*

a. Cycle évolutif (figure 14)

Toxocara vitulorum est un parasite de l'ordre des Ascaridida (Bussieras, Chermette 1995), appartenant à la famille des Taxocaridés. Les individus sensibles à cette parasitose sont les jeunes animaux, notamment les veaux de 10 jours à 5 mois. Le cycle évolutif peut être considéré comme dixène : dans le milieu extérieur, les œufs sont éliminés, au sein desquels une ou deux mues ont lieu. La résistance de ces éléments parasitaires est extrêmement grande (plusieurs mois, voire des années).

Les bovins adultes, considérés parfois comme des hôtes intermédiaires, se contaminent par l'ingestion des œufs larvés au stade 3. Les larves ne subissent pas de mue, mais migrent à

partir de l'intestin grêle vers le foie ou les poumons (d'autres localisations moins fréquentes sont parfois rapportées : muscles, reins, encéphale). Chez la femelle, quelques jours avant la mise bas, les larves gagnent le tissu mammaire, et les larves infestantes L3 (présentes dans le colostrum ou le lait) sont ingérées par les veaux lors de la tétée (contamination possible dans les 8 jours qui suivent le part). Le cycle évolutif se poursuit dans la lumière de l'intestin grêle, sans migration, jusqu'au stade adulte.

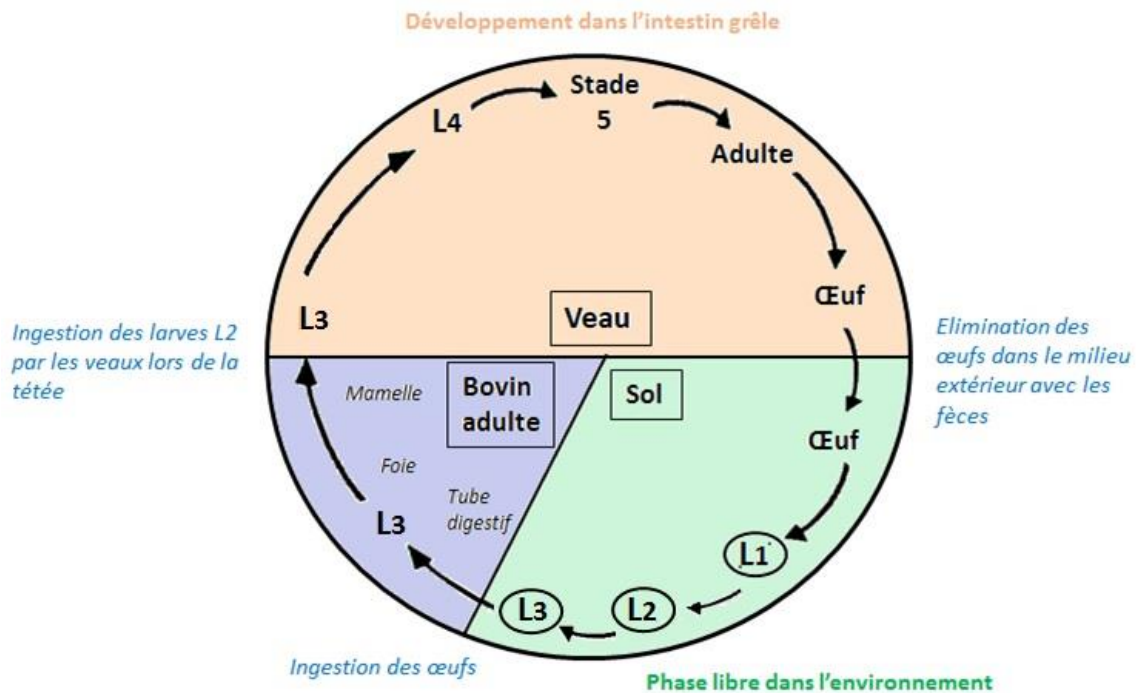


Figure 14 : cycle évolutif de *Toxocara vitulorum*

b. Aspect des œufs en coproscopie (figure 15)

L'œuf est sphérique, de taille assez importante (75-95 × 60-75 µm). Il possède une coque très épaisse, alvéolée à l'extérieur et lisse à l'intérieur, n'a pas de bouchon polaire et n'est pas operculé. Il est de couleur brune et contient une cellule unique qui remplit la quasi-totalité de l'œuf.



Figure 15 : œuf de *Toxocara vitulorum* observé au microscope (x400)

C. Les cestodes

1. Présentation des cestodes et espèces cibles

Les cestodes sont des vers plats, rubanés et segmentés au stade adulte. L'ordre nous intéressant particulièrement est l'ordre des *Cyclophyllidea*, contenant la famille des Anoplocephalidae qui se caractérise par des adultes présentant un scolex inerme, des segments beaucoup plus larges que longs, et des larves de type cysticercoïde. Ce sont des parasites du tube digestif des herbivores et des oiseaux. Le genre le plus fréquemment rencontré en France métropolitaine, et fréquemment pathogène chez les ruminants de première voire de seconde saison de pâture est le genre *Moniezia* avec deux espèces : *Moniezia benedeni* (plutôt chez les bovins), et *Moniezia expansa* (plutôt chez les petits ruminants). D'autres espèces existent, beaucoup plus exceptionnelles : *Thysaniezia ovilla*, *Stilesia globipunctata* et *Avitellina centripuncta*.

2. Cycle évolutif (figure 16)

Le cycle parasitaire est dixène. L'adulte, mesurant de 1 à 6 cm de long pour 1 à 2 cm de large, hermaphrodite, infeste l'intestin grêle des ruminants. Les derniers segments parasitaires sont les segments gravides, contenant des œufs embryonnés. Ces segments ovigères se détachent et sont entraînés avec les fèces dans le milieu extérieur. Ils sont directement infestants pour l'hôte intermédiaire obligatoire, et peuvent survivre 1 à 4 mois dans le milieu extérieur. Après rupture de la paroi du proglottis (événement qui peut survenir également dans le tube digestif de l'hôte définitif), les œufs doivent être ingérés par un acarien cryptostigmate à vie libre et appartenant à la famille des Oribatidae, pour que le cycle puisse se poursuivre. Les embryons sont alors libérés dans le tube digestif de l'Oribate et gagnent la cavité générale de l'acarien, où ils évoluent en larve cysticercoïde, forme infestante pour l'hôte définitif. La larve cysticercoïde est donc à l'abri jusqu'à la consommation de l'oribate par un ruminant et persiste 12 à 18 mois. Après digestion de l'oribate ingéré par le ruminant, la larve se fixe par son scolex inerme et muni de 4 ventouses, à la paroi de l'intestin grêle. La strobilisation débute et aboutit à la formation d'un adulte. Les infestations peuvent être massives, et la durée de la période prépatente est de 4 à 7 semaines (Barriga, 1994 ; Spasskii, 1951).

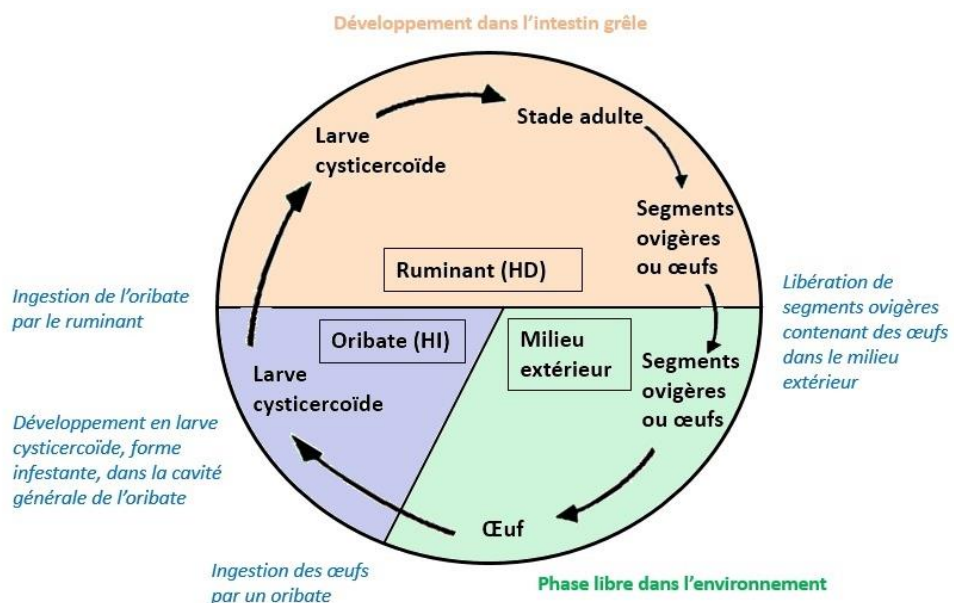


Figure 16 : cycle évolutif des cestodes

3. Morphologie des segments ovigères et des œufs

L'émission des segments est très irrégulière et un examen coproscopique peut s'avérer faussement négatif. En cas de forte suspicion, il ne faut donc pas hésiter à répéter sur plusieurs jours l'analyse des matières fécales, surtout lors de faible infestation.

Les segments non rompus dans le tube digestif du ruminant sont visibles macroscopiquement au milieu de la masse fécale. Ils sont allongés, blanchâtres, de l'ordre du millimètre et plus larges que longs (10-15 mm × 3-4 mm). Il est donc très important de ne pas omettre d'observer à l'œil nu l'échantillon de fèces.

Les œufs peuvent également être observés lors de l'examen coproscopique suite à la déchirure de la paroi proglotidienne.

L'œuf est anguleux, triangulaire ou quadrangulaire, de couleur grisâtre et mesure 50 × 90 µm. Sa coque est épaisse et lisse. Il contient en embryon hexacante, entouré d'un appareil piriforme et n'occupant pas la totalité de l'œuf (figure 17).



Figure 17 : œuf de *Moniezia expansa* observé au microscope (×400)

D. Les protozoaires digestifs

1. Présentation et espèces cibles

Les coccidies sont des protozoaires appartenant à l'embranchement des Apicomplexa et à la famille des Eimeriidae. Plus de 1500 espèces ont été décrites au sein du genre *Eimeria*. Ce sont des organismes unicellulaires, eucaryotes, à développement hétérotrophe, dont les éléments de dissémination sont les ookystes, qui nous intéressent ici.

Ce genre *Eimeria* est un agent de coccidiose intestinale chez les ruminants. Il regroupe plus de 20 espèces décrites chez les bovins, dont les plus pathogènes sont *Eimeria bovis* et *Eimeria zuernii*. Chez les petits ruminants, les plus pathogènes sont *Eimeria ovinoïdalis* et *Eimeria crandalis* (ovins), *Eimeria arloingi* et *Eimeria ninakohlyakimovae* (caprins). Les infections plurispécifiques sont de règle chez les ruminants.

Cryptosporidium parvum et *C. andersoni* appartiennent à la famille des Cryptosporidiidae. Pour *C. parvum*, à la différence de *C. andersoni*, les individus sensibles sont les jeunes animaux dans les premiers jours de vie, et la mortalité est assez élevée (10 à 50%). *Cryptosporidium parvum* est un parasite de l'intestin grêle alors que *C. andersoni* infecte la caillette des bovins adultes et juvéniles.

Giardia intestinalis est un protozoaire Mastigophora (ou flagellé), appartenant à l'ordre des Diplomonadida, et à la famille des Hexamitidae. Ce protozoaire est commun à de nombreux mammifères, dont l'homme. Les jeunes animaux sont les plus sensibles, mais pas immédiatement après la naissance (animaux de plus d'un mois en général), contrairement à la cryptosporidiose.

La contamination s'effectue lors d'ingestion d'eau, de végétaux ou lors du léchage de matériel, contaminés par des kystes (pour *Cryptosporidium*) ou par les oocystes (pour *Giardia*) émis par des animaux malades ou porteurs. Les kystes ou oocystes peuvent survivre dans l'environnement pendant de longues périodes, selon les caractéristiques de l'eau. Ils peuvent résister à divers stress environnementaux, notamment la congélation et l'exposition à l'eau de mer. Les genres *Giardia* et *Cryptosporidium* sont des causes fréquentes d'apparition de maladies d'origine hydrique : *Giardia* est le protozoaire entérique le plus souvent déclaré dans le monde entier (Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable (Santé Canada) 2012). La caractérisation moléculaire de *Giardia* a démontré l'existence d'assemblages génétiquement distincts et non distinguables morphologiquement (tableau 1).

Tableau 1 : les différentes espèces et assemblages génétiques de *Giardia* sp.

Espèces (assemblage)	Principaux hôtes
<i>G. agilis</i>	Amphibiens
<i>G. ardea</i>	Oiseaux
<i>G. lamblia</i> (A)	Humains, animaux d'élevage et autres mammifères
<i>G. lamblia</i> (B)	Humains
<i>G. lamblia</i> (C)	Chiens
<i>G. lamblia</i> (D)	Chiens
<i>G. lamblia</i> (E)	Bovins et autres ongulés d'élevage
<i>G. lamblia</i> (F)	Chats
<i>G. lamblia</i> (G)	Rats
<i>G. microti</i>	Rats musqués, campagnols
<i>G. muris</i>	Rongeurs
<i>G. psittaci</i>	Oiseaux

Les assemblages A et B infectent les humains et d'autres mammifères, tandis que les autres assemblages, soient C, D, E, F et G n'ont pas encore été isolés chez des humains, et semblent avoir un spectre d'hôte limité (Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable (Santé Canada) 2012).

2. Cycle évolutif (figure 18)

a. Les coccidies

Le cycle est monoxène. Les ookystes sporulés présents sur le sol sont avalés par un ruminant, et leur paroi est digérée dans l'intestin grêle (dans la portion jéjuno-iléale) ou au niveau du cæcum ou du côlon, libérant ainsi les 4 sporocystes contenant chacun 2 sporozoïtes. Ceux-ci pénètrent dans des cellules épithéliales de l'hôte, où ils se multiplient et donnent des schizozoïtes, formes de la multiplication asexuée très intense (ou phase de schizogonie), qui envahissent de nouveaux entérocytes. Les schizozoïtes sont libérés par l'éclatement de la cellule-hôte. Le cycle se poursuit par la pénétration dans des entérocytes sains, généralement dans les portions les plus distales de l'intestin grêle et dans le gros intestin. La phase de gamétogonie, ou reproduction sexuée, débute alors. Les schizozoïtes évoluent en microgamètes et macrogamètes. La pénétration d'un microgamète dans un macrogamète aboutit à la formation d'un ookyste rejeté dans le milieu extérieur avec les fèces, parfois dès le 7^{ème} jour après l'infection. La sporogonie (ou sporulation) s'effectue dans le milieu extérieur et l'ookyste sporulé est l'élément infestant pour l'hôte définitif. Cette sporulation requiert de l'humidité et une température suffisante (20°C), et se réalise en 2 à 3 jours. (Barriga, 1994). La période d'excrétion maximale du parasite survient environ 3 semaines après la contamination initiale.

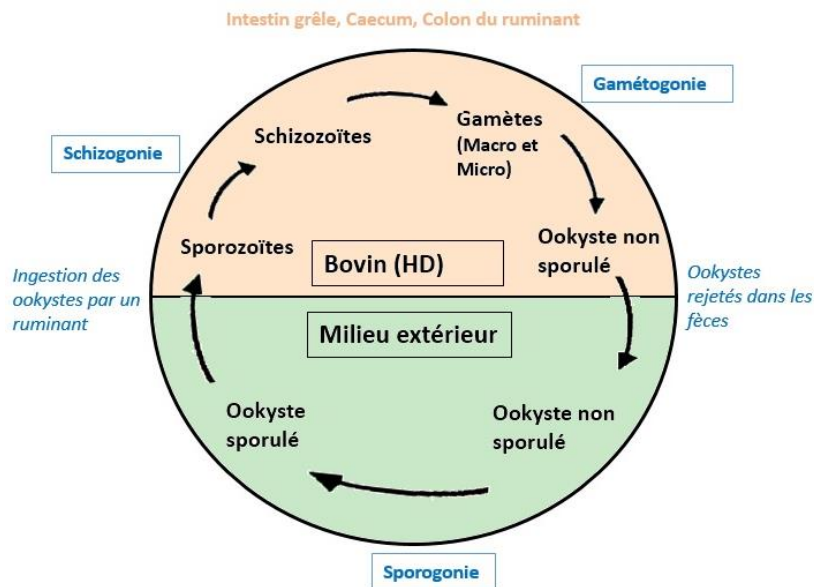


Figure 18 : cycle évolutif d'*Eimeria bovis*

b. *Cryptosporidium parvum*

Le cycle évolutif de ce parasite est monoxène (figure 19). La contamination de l'animal s'effectue par l'ingestion d'ookystes sporulés. Une fois ingérés, ces ookystes libèrent au niveau de l'intestin grêle des sporozoïtes qui pénètrent dans les cellules intestinales, à l'apex de ces dernières, sans entrer dans le cytoplasme. Ils évoluent en mérozoïtes de première génération. La multiplication asexuée a lieu à partir de cette forme. Ils donnent ensuite des mérozoïtes de deuxième génération. Par gamétogonie, les mérozoïtes deviennent des microgamètes et des macrogamètes qui assurent la reproduction sexuée. Il y a formation d'un zygote, puis sporogonie. Deux types d'ocystes sont produits : des ocystes à paroi mince qui commencent un autre cycle d'infection (cycle auto-infectieux) et des ocystes à paroi épaisse qui peuvent alors infecter les autres animaux après leur élimination avec les fèces dans le milieu extérieur.

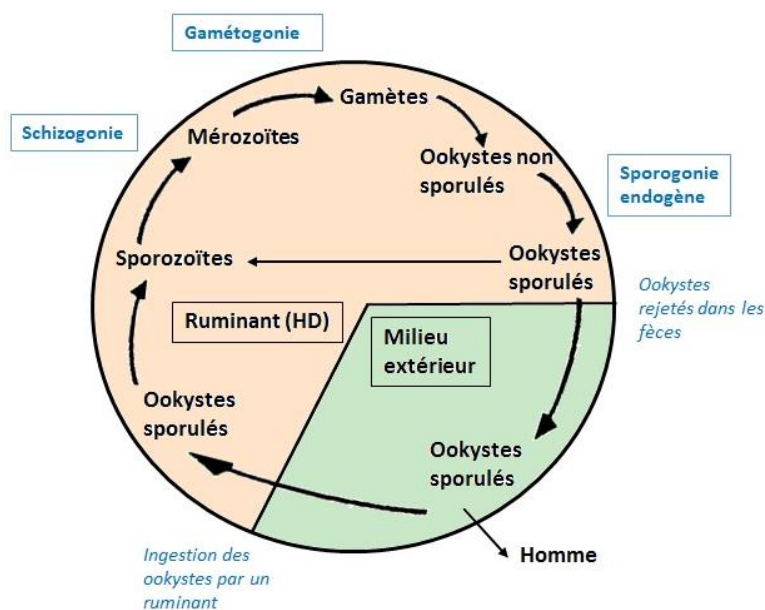


Figure 19 : Cycle évolutif de *Cryptosporidium parvum*

c. *Giardia intestinalis*

Le cycle évolutif de *Giardia intestinalis* est monoxène (figure 20). Après ingestion des kystes, il y a formation des trophozoïtes qui se fixent dans la partie antérieure de l'intestin grêle. Les formes adultes se multiplient alors par bipartition longitudinale (reproduction asexuée). Les adultes donnent des kystes qui sont éliminés avec les fèces dans le milieu extérieur. Les adultes donnent des kystes qui sont éliminés avec les fèces dans le milieu extérieur.

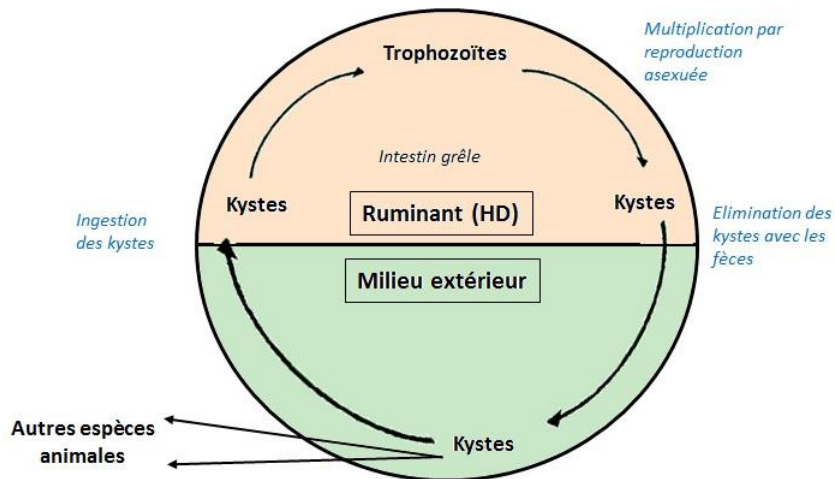


Figure 20 : cycle évolutif de *Giardia intestinalis*

3. Diagnostic coproscopique

a. Les coccidies

Les individus les plus sensibles sont les jeunes ruminants, dès 3 semaines d'âge. Une immunité s'installe par la suite et s'accroît avec l'âge. L'identification spécifique s'appuie sur la morphologie des ookystes : dimension (très variable, d'une dizaine de μm à 50 μm de long), forme (rond, sub-sphérique, ovale, ovoïde, ellipsoïde...) couleur, absence ou présence d'un micropyle (ouverture à l'un des pôles). Le noyau de l'ookyste, de couleur grisâtre, est de forme ronde, il emplit plus ou moins l'espace intérieur. La paroi est généralement très mince et lisse pour les espèces infestant les ruminants. Le développement de l'embryon, très rapide, peut entraîner le dédoublement du noyau observé au moment de l'examen coproscopique, même si seulement quelques heures se sont écoulées entre le prélèvement et l'analyse des matières fécales (figure 21). L'identification spécifique est plus favorable lorsque les ookystes sont sporulés (présence ou absence de corps résiduels d'oocyste et de sporocyste, de corps de Stieda) ce qui nécessite une coproculture pendant quelques jours. Des données biologiques peuvent parfois également être utilisées pour différencier certaines espèces.



Figure 21 : ookystes d'*Eimeria* sp en cours de sporulation observés au microscope (× 400)

b. *Cryptosporidium parvum* et *C. andersoni*

Les ookystes sont ovoïdes et très petits (5 µm de diamètre) et renferment 4 sporocystes nus. Ils peuvent parfois être confondus avec les ookystes de *C. muris* ou de *C. muris*-like, parasites mineurs et occasionnels de la caillette, provoquant une diarrhée passagère.

Les ookystes étant très petits, il est souvent nécessaire de les colorer avant de les examiner (coloration de Ziehl-Neelsen modifiée, figure 22). En cas de doute lors de l'examen coproscopique, il est bon d'effectuer une analyse PCR. Dans ce cas, le prélèvement devra être acheminé au frais, mais non congelé.

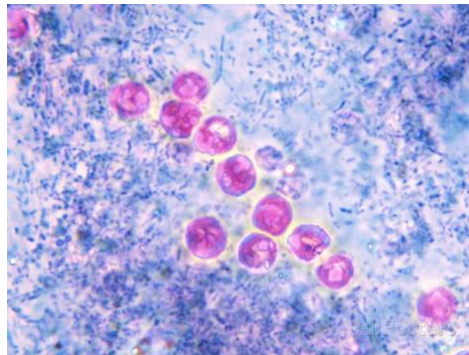


Figure 22 : ookystes de *Cryptosporidium parvum* observés au microscope (× 400) après coloration de Ziehl-Neelsen modifiée

c. *Giardia intestinalis*

Les kystes sont ovalaires et mesurent 10 µm de diamètre. Ils contiennent 4 noyaux et des résidus de flagelles (figure 23). Ils peuvent être colorés en ajoutant une goutte de Lugol, ce qui facilite leur identification.

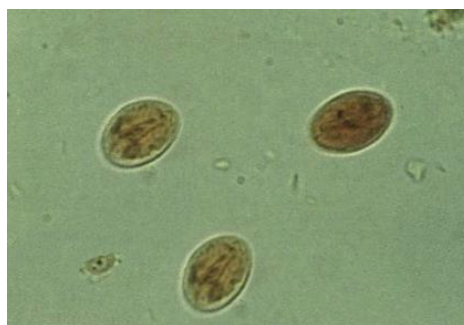


Figure 23 : kystes de *Giardia intestinalis* observés au microscope (× 400) après coloration au Lugol

II. Importance économique et médicale des infestations par les trématodes

Les trématodoses sont cosmopolites. La prévalence de ces dernières est mondiale : d'après des examens coprologiques, environ 30% des troupeaux ovins du Nord-Ouest de l'Espagne seraient infectés par *Fasciola hepatica*, et les analyses immunologiques ont montré une séroprévalence de plus de 56% (Rojo-Vázquez et al., 2012).

D.lanceolatum, ou Petite Douve, est présente en Europe, Asie, Amérique du Nord et Afrique du Nord. La prévalence de la Dicrocoélioze chez les ruminants a été étudiée par Duchacek et Lamka en 2003 : ils décrivent une prévalence supérieure à 32% en Allemagne au cours de l'année 1975, à 54% en Slovaquie durant la période 1984-1986, 21% en Hongrie en 1993, et entre 27% et 63% dans le Nord de l'Espagne entre 1991 et 1993 (Rojo-Vázquez et al., 2012). En ce qui concerne les Paramphistomoses, au cours des dernières années il y a eu une augmentation du nombre de cas rapportés en Argentine et en Europe, les infestations des troupeaux ovins restant moins fréquentes que chez les bovins (Rojo-Vázquez et al., 2012).

Même si les ruminants sont les espèces cibles principales, d'autres espèces, tels que les porcins ou les équins, sont considérés comme des hôtes secondaires de *Fasciola hepatica* et *Dicrocoelium lanceolatum*. L'infection par ces parasites est également considérée comme une zoonose émergente (Mas-Coma, Bargues 2005) Ainsi, par exemple, entre 2,4 et 17 millions de personnes seraient infestées par la Grande Douve dans le monde (figure 24, Ashrafi et al., 2014).



Figure 24 : carte de distribution (en rouge) dans le monde des cas humains de Fasciolose à *Fasciola* sp. (données 2013 de l'OMS, Ashrafi et al., 2014)

A. La Fasciolose

1. Prévalence d'infestation

En Suisse, les résultats obtenus à partir de l'examen *post mortem* du foie, du contenu de la vésicule biliaire, d'un test ELISA sur sérum, et d'une coproscopie (effectués sur 1331 bovins présentés à l'abattoir) ont montré que la prévalence de la Fasciolose était de 18 % (15,9 – 20,3 %) chez les bovins (Rapsch et al., 2006).

La prévalence de la Fasciolose chez les bovins a été estimée (par une technique sérologique Elisa) à 40.2% en 2008 en Belgique dans la région des Flandres, à environ 50% en Angleterre, et à 86% au Pays de Galles (Bennema et al., 2011 ; Salimi-Bejestani et al., 2005 ; Pritchard et al., 2005).

Quelques études permettent d'avoir une estimation de la prévalence dans les troupeaux bovins en France : en Creuse en 1985, elle était de 21.9% (déterminée par coproscopie) (Mage, 1989), dans le Sud-Ouest en 2002, elle était de 4.9% (Dorchies, 2007), et en 2009, elle a été évaluée à 7,3% en Bourgogne (Colin, 2009).

2. Signes cliniques

Comme les deux trématodoses suivantes, l'infestation se produit au pâturage. La forme aiguë est rare, elle est observée préférentiellement chez les ovins. Les animaux meurent en 1 à 2 jours suite à une anémie hémorragique aiguë (accompagnée d'une douleur abdominale importante due à la présence de liquide d'ascite). La forme subaiguë est, elle aussi, rare, elle se manifeste par une anémie et un amaigrissement progressif, avec parfois un signe de la bouteille (œdème de la mandibule), et conduit à la mort de l'animal en 1 à 2 semaines. Les formes aiguë et subaiguë sont dues à des ingestions plus ou moins massives de métacercaries sur la pâture et à la migration intrahépatique des adolescarias.

La forme chronique, insidieuse, est la plus fréquente et quasiment la seule forme observée chez les bovins. Elle est plutôt hivernale, et entraîne une baisse de l'état général, un syndrome anémique d'évolution lente, un amaigrissement progressif, des œdèmes dans les zones déclives (signe de la bouteille), une diminution qualitative et quantitative du lait et une perte de laine chez les ovins, ou le poil piqué chez les bovins. En l'absence de traitement, l'animal devient cachectique et l'anémie s'aggrave : c'est une pathologie pouvant être mortelle chez les ovins, mais, même si elle peut être grave chez les bovins, elle conduit rarement à leur mort. En effet, contrairement aux ovins, une calcification des canaux biliaires des bovins se produit et affame la Grande Douve qui n'a plus accès au sang. Les bovins éliminent quasiment toutes leurs Grandes Douves en 18 mois. La Grande Douve a une survie de plusieurs années en revanche chez les petits ruminants.

3. Diagnostic

a) Diagnostic expérimental

Le diagnostic direct est celui qui est habituellement utilisé pour détecter la présence du parasite (Anderson et al., 1999), il correspond à l'examen coproscopique des fèces, regroupant plusieurs techniques. Certaines sont dites de sédimentation (utilisant la gravité), d'autres de flottation (ces techniques doivent tenir compte de la densité des œufs), d'autres enfin sont une combinaison des deux. Nous reviendrons sur ces techniques dans la partie suivante.

L'examen coproscopique permet de révéler la présence des œufs uniquement au terme de la période prépatente, soit au plus tôt une dizaine de semaines après l'infestation. De plus, la faible sensibilité de cette méthode (surtout lorsque le niveau d'infestation est faible, soit inférieur à 20 douves, en raison d'un niveau d'excrétion fécale faible du fait de la ponte irrégulière de ce parasite) interdit le mélange de matières fécales de plusieurs animaux.

Le diagnostic immunologique (sur sérum ou sang), développé par la suite, a l'avantage de détecter les infestations parasitaires plus précocement, dès 2 à 6 semaines après l'infestation,

par rapport au diagnostic coproscopique (Reichel, 2002). En revanche, les anticorps persistent 2 à 6 mois après un traitement curatif et l'élimination du parasite. Il n'y a pas de lien non plus entre le taux d'anticorps et la charge parasitaire. Ces méthodes immuno-enzymatiques, indirectes, et spécifiques, sont utilisables sur des mélanges de sérum et lait. Elles perdent alors en sensibilité. Ces méthodes s'imposent comme les plus simples et rapides pour déterminer la prévalence d'une infestation à *F. hepatica* (Meissonnier et Mage 2007 ; Salem et al., 2011). Récemment, une étude a comparé les résultats obtenus à partir de l'examen *post mortem* du foie, du contenu de la vésicule biliaire, d'un ELISA sur sérum, et d'une coproscopie, et a montré que la sensibilité de cette dernière pouvait être très bonne (approximativement 92%) , à condition d'utiliser un échantillon pondéralement plus important qu'habituellement, et de répéter l'examen (Rapsch et al., 2006).

Une analyse sanguine peut également permettre d'orienter le diagnostic (avec l'observation d'une anémie, d'une hypoalbuminémie, d'une hyperéosinophilie, et d'une augmentation des GLDH et des γ GT), mais bien entendu ces modifications ne sont pas spécifiques d'une infestation par les trématodes.

En général, la corrélation entre le nombre d'œufs comptés en coproscopie et la charge parasitaire est considérée trop faible pour apporter des informations claires sur le degré d'infestation (Phiri et al., 2006). Cependant, Charlier et al. (2008) ont montré que des techniques coproscopiques réalisées avec 4g de fèces permettaient d'avoir des informations sur le degré d'infestation du troupeau, car elles détectaient les animaux les plus sévèrement infestés. Cette étude a également montré d'une part, qu'augmenter la quantité de fèces analysées (de 4g à 10g) conduisait à une augmentation significative de la sensibilité de l'examen coproscopique, mais que la spécificité n'était alors plus de 100%, et d'autre part, qu'il n'y avait pas de corrélation entre la charge parasitaire réelle et le résultat donné par l'ELISA Pourquoi.

Ainsi, cette absence de corrélation entre les résultats (qu'ils soient des tests immuno-enzymatiques ou coproscopiques) et la charge parasitaire souligne l'importance d'une vision globale, comprenant les données épidémiocliniques et les résultats des examens spécifiques complémentaires (Jacquet, 2002).

b) Diagnostic nécropsique

Les lésions concernent la carcasse entière (anémie, cachexie), les poumons (kystes distomiens) et le foie.

Dans les formes aiguës et subaiguës, des lésions d'hépatite traumatique sont retrouvées : le foie est friable, une ascite rosée (« les eaux rousses ») est présente, et les trajets de migration des douves immatures dans le parenchyme hépatique sont visibles.

En ce qui concerne la Fasciolose chronique, à l'inspection, en général un foie hypertrophié et déformé, décoloré et dur est observé. Des lésions de cirrhose du parenchyme hépatique ainsi que de cholangite chronique sont mises en évidence : les canaux biliaires sont très dilatés, leur paroi épaissie et calcifiée. Chez les bovins, les canaux biliaires sont souvent calcifiés, ce qui provoque un crissement lors de la section du foie. Des calculs biliaires ou cholélithiases peuvent se former, en raison de la stase de la bile qui ne peut plus s'écouler. De plus, il est possible de retrouver des parasites adultes dans les canaux biliaires lors de l'ouverture du foie, mais en cas de faible infestation, cette technique se révèle peu efficace pour détecter les parasites, les faux négatifs sont donc fréquents (Gimard, 2001).

B. Les Paramphistomoses

1. Prévalence d'infestation

Les Paramphistomoses sont des parasitoses qui semblent toucher le bétail des 5 continents. Le climat des zones tropicales favorable au parasite en fait même une maladie majeure en Afrique et en Asie. Ainsi, *C. daubneyi* a été identifié en Algérie, en Éthiopie, en Afrique équatoriale, en Amérique du Sud, où elle semble être en recrudescence ces dernières décennies, et en Asie (Gladys, 2015). Cette parasitose est plutôt observée chez les bovins que les ovins (Rojo-Vázquez et al., 2012). Depuis le milieu des années 90, une augmentation de la prévalence de la Paramphistomose est observée. Cette émergence peut être expliquée par différents facteurs :

- un meilleur diagnostic des œufs de *Calicophoron daubneyi* au niveau des laboratoires d'analyses vétérinaires,
- par le peu d'anthelminthiques spécifiques et efficaces disponibles,
- par la longévité et prolificité des vers adultes,
- par une plus grande disponibilité des limnées, hôtes intermédiaires, en raison de la moindre prévalence de *Fasciola hepatica*,
- ou encore par l'extensification de l'élevage.

En France, au courant de l'année 2000, au moins 33 départements étaient infestés par *Calicophoron daubneyi* (Alzieu, Dorchies 2007). Une enquête réalisée en abattoir à l'automne 2002 en Champagne Ardenne à l'occasion d'une thèse vétérinaire (Rieu, 2004) met en évidence des prévalences de la Paramphistomose bovine de l'ordre de 50%. En Espagne, Gonzalez-Warleta (2012) a estimé la prévalence de *C. daubneyi* à 30% chez des vaches allaitantes abattues au nord de l'Espagne (Gladys, 2015).

En parallèle de cette augmentation de la prévalence de la Paramphistomose (de 5,2% en 1990 à 44,7 % en 1999), celle de la Fasciolose a diminué (de 25,2% à 12,6 % entre 1993 et 1999) d'après les résultats d'une étude conduite dans le centre de la France utilisant le diagnostic coproscopique (Mage et al., 2002).

Une récente étude de Rebillard (2011) sur plus de 16 000 données de coproscopies et d'observations en abattoir dans 65 départements français a permis de réaliser une carte nationale (figure 25) qui reflète assez bien la répartition de la Paramphistomose, plus importante au sud d'une ligne reliant Valenciennes et la Rochelle. Le centre Bretagne et la Somme semblent demeurer encore relativement épargnés.

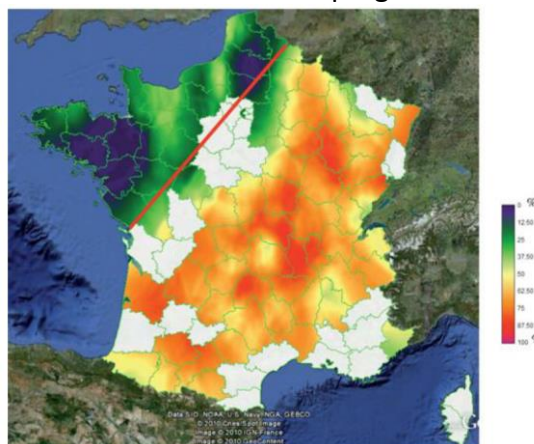


Figure 25 : pourcentage de résultats positifs en coproscopies et observations d'abattoir pour la recherche de paramphistomes (Blanc = aucune donnée) (d'après Rebillard, 2011)

2. Signes cliniques

La forme aiguë, due à la Paramphistomose pré-imaginale, débute 2 semaines après une infestation massive. Elle se caractérise par une apathie, une anorexie, une forte polydipsie, une diarrhée incoercible et des œdèmes en de nombreuses régions du corps (dues à l'hypoalbuminémie). Ces signes sont la conséquence du caractère hématophage des formes immatures lors de leur migration intra-pariétale dans la caillette et l'intestin grêle. La forme aiguë atteint plutôt des bovins en première saison de pâture, et peut entraîner la mort par déshydratation.

La forme chronique est la plus fréquente et est moins pathogène. Elle est à l'origine d'une inflammation chronique du réticulo-rumen, qui entraîne une atonie et une météorisation intermittente qui est fonction de la charge parasitaire. Ainsi, les symptômes sont peu spécifiques (perte d'état général, amaigrissement, ramollissement des matières fécales), et le plus souvent frustrés. Cependant, la Paramphistomose peut parfois entraîner des signes gastro-intestinaux et des chutes de production, parfois même la mort (Dorchies, 2002 cité par Rieu et al., 2007).

3. Diagnostic

a) Diagnostic expérimental

En l'absence actuelle d'un test sérologique, le diagnostic coproscopique est le seul moyen de démontrer la présence de vers adultes chez des animaux vivants. Ce sont les mêmes méthodes que pour les œufs de *F. hepatica*.

Une récente étude a montré que le nombre d'œufs trouvés dans les fèces pouvait être influencé par des modifications pathophysiologiques de l'animal infesté, par sa nourriture, par l'heure de récolte de l'échantillon, ou bien par la quantité de fèces produite par jour (Phiri et al., 2006).

b) Diagnostic nécropsique

Il se fait par l'observation directe des parasites adultes fixés à la muqueuse du réseau ou du rumen (après lavage des réservoirs gastriques), ou de lésions de la sous-muqueuse duodénale dues aux formes immatures (mais il est plus difficile de les observer, étant donné qu'elles peuvent s'enfoncer dans la muqueuse). Il faut alors pratiquer une digestion trypsique de la paroi intestinale pour les retrouver.

C. La Dicrocoélie

1. Prévalence d'infestation

Différentes études régionales ont été réalisées en France concernant la prévalence des infestations par *Dicrocoelium lanceolatum*.

Dorchies (2007), en réalisant une comparaison de différentes méthodes d'identification (coproscopie, ELISA sur sérum, inspection des foies) a montré que la prévalence était de 18,4% chez les bovins en 2002, de 16,4% en 2003 et de 26,7% en 2004 lors d'une enquête réalisée dans le Sud-Ouest. En Haute-Saône, la prévalence a été estimée à 7,2% en 2005 (Baudin,

2005), et en Bourgogne, l'observation de foies saisis à l'abattoir a permis d'estimer la prévalence à 10,1% en 2009 (Colin, 2009).

2. Signes cliniques

La forme aiguë est très rare et se traduit par une hépatite nécrosante.

La forme chronique est la plus fréquemment rencontrée, ses manifestations cliniques sont frustrées et ne sont pas spécifiques. Il s'agit plus souvent d'une suspicion qu'un réel diagnostic clinique, lui-même quasi-impossible (Courouble, 2007). Cela a par ailleurs longtemps alimenté la controverse sur la réalité même de la Dicrocoeliose clinique chez les bovins.

Les manifestations cliniques sont un syndrome de diarrhée chronique, avec un amaigrissement progressif et un poil terne et piqué, un syndrome de parésie des vaches laitières avec troubles métaboliques, et des perturbations digestives chez les jeunes (indigestion, météorisation) (Alzieu et al., 2002). Cette clinique entraîne des chutes de production.

Ces symptômes pouvant être rattachés à de nombreuses autres maladies, le diagnostic expérimental est donc nécessaire.

3. Diagnostic

a) Diagnostic expérimental

Le diagnostic coproscopique est la seule technique utilisée en routine pour le diagnostic de la Dicrocoeliose, car c'est la seule technique disponible du vivant de l'animal.

Cette analyse ne peut être positive que si les adultes pondent, c'est à dire au terme de la période prépatente. La ponte de *Dicrocoelium lanceolatum* étant faible et irrégulière, il est important de faire un échantillonnage sur une dizaine d'animaux au minimum pour estimer la prévalence de la Dicrocoeliose dans un troupeau. En effet, seulement 20% des animaux parasités peuvent avoir une coproscopie positive (Levasseur, 2002).

L'interprétation des résultats d'un examen coproscopique consiste à apprécier la proportion d'animaux excréteurs et l'intensité de l'excrétion pour la décision du traitement, qui est très onéreux. Chez les ovins, l'excrétion est forte et continue, aussi la valeur seuil de mise en œuvre d'un traitement est de 200 à 300 œufs par gramme (opg). Chez les bovins, l'élimination fécale des œufs est plus faible et aléatoire et souvent, un peu plus forte en hiver, le seuil retenu est alors entre 15 et 50 opg. De même, si plus de 30% d'un échantillonnage de 8 à 10 animaux s'avèrent positifs, un traitement peut être envisagé.

b) Diagnostic nécropsique

Les lésions de Dicrocoeliose consistent en une hépatomégalie, avec une surface du foie irrégulière, bosselée et parcourue de lignes blanchâtres, une dilatation des canaux biliaires et de la vésicule biliaire, avec une consistance dure et fibreuse du foie à la palpation. Le diagnostic de certitude *post-mortem* se fait par l'observation des petites douves à l'intérieur des canalicules biliaires. A la section, les canalicules biliaires sont dilatés, et leurs parois sont plus ou moins fibrosées. La bile est épaisse et noirâtre et renferme souvent de nombreux parasites adultes qui sortent à la pression manuelle. Ces lésions de cholangite chronique

touchent essentiellement les canalicules biliaires, mais peuvent atteindre également les plus gros canaux biliaires et la vésicule biliaire lors d'infestation massive.

D. Contrôle et prévention

La lutte contre les trématodoses doit combiner à la fois une prophylaxie efficace et des mesures agronomiques appropriées pour lutter contre la limnée, hôte intermédiaire. Chez les ruminants, le traitement du cheptel est réalisé à la suite de retour d'abattoir positifs ou de tests positifs.

1. Lutte thérapeutique

Les molécules peuvent être utilisées dans un but curatif (signes cliniques) et préventif (empêcher ou tout du moins limiter la contamination des pâtures).

Pour la Fasciolose, diverses molécules sont disponibles. Le choix de l'une d'elle dépend du mode de production des animaux et de la conduite d'élevage (en fonction des différents temps d'attente, de l'autorisation d'utilisation, de la voie d'administration, et du spectre d'activité du fasciolicide (actif ou non sur les formes immatures). Pour contrôler l'infestation, diverses stratégies peuvent être envisagées :

- un traitement larvicide unique est effectué après l'entrée en bergerie (par exemple 2 semaines après l'entrée avec du triclabendazole),
- mais si le traitement utilisé est adulticide (oxyclozanide par exemple), il doit être effectué en 2 fois (à la rentrée à l'étable, et 2 mois et demi après) : le premier traitement élimine les adultes présents lors de l'entrée en bâtiment, le second élimine les douves devenues adultes et issues des dernières métacercaires ingérées en fin de saison de pâture.

Une étude menée sur des cheptels ovins aux Pays-Bas a montré l'apparition d'une résistance de *F. hepatica* au triclabendazole (Gaasenbeek et al., 2001).

Le traitement des Paramphistomoses se fait essentiellement avec une molécule : l'oxyclosanide sans stop-dose comme pour la Fasciolose. L'administration systématique de deux traitements (un à la mise à l'herbe, l'autre à la rentrée en étable), comme il est réalisé couramment, ne semble pas être la plus efficace pour la maîtrise des Paramphistomoses. Un unique traitement pendant l'hiver, après dépistage coproscopique serait bénéfique, et une répétition annuelle pendant trois à cinq ans semble nécessaire (Abrous et al., 1999).

En ce qui concerne le traitement contre la Dicrocœliose, il est très difficile : il n'existe des spécialités vétérinaires avec une autorisation de mise sur le marché (AMM) que chez les ovins, et non chez les bovins, pour traiter cette trématodose. Les posologies requises pour être efficaces sont élevées: le nétohimin (20 mg/kg, *per os.*) et l'albendazole (15 mg/kg, *per os.*). Une étude comparative a montré, chez les ovins, que le nétohimin était plus efficace que l'albendazole, en terme de diminution du nombre d'œufs excrétés, et de réduction de la charge parasitaire (Calamel, 1989). Deux traitements : un à l'entrée en bâtiment (fin d'automne) et un au moment de la sortie (fin d'hiver) permettraient de réduire de façon significative l'excrétion des œufs (Rojo-Vázquez et al., 2012).

2. Lutte agronomique

La lutte agronomique a pour objectif d'éviter l'infestation des animaux et devrait être utilisée en combinaison avec le traitement thérapeutique préventif dans un objectif de lutte intégrée, car elle est la seule à même de contrôler efficacement à terme les infestations par les trématodes. Elle est la plus développée pour le contrôle de la Fasciolose et des Paramphistomoses. Elle est plus complexe et moins aboutie contre la Dicrocœliose et n'est pas développée ici. Elle consiste donc à éviter le pâturage dans les zones où vivent les limnées (hôtes intermédiaires de *F. hepatica* et *C. daubneyi*) et autres mollusques amphibies, hôtes intermédiaires de *C. daubneyi*, ou bien à l'assainissement des pâturages.

Diverses techniques sont donc utilisables mais doivent s'adapter aux réalités économiques de l'élevage concerné (Mage et Chauvin, 1997) :

- Identifier les zones à risques et rechercher les mollusques
- Mettre en place une gestion hydrique : par le drainage des pâtures ou par captage des sources,
- Empêcher l'accès du cheptel aux zones humides, par la mise en place de clôtures autour des mares et des cours d'eau
- Prévenir les débordements des abreuvoirs.

Le plan de lutte doit être dans l'idéal accompagné de suivis sérologiques afin de mesurer l'efficacité des mesures prises par la diminution de la séroprévalence ou en utilisant des animaux traceurs (animaux naïfs qui doivent demeurer négatifs après pâturage sur parcelles saines ou assainies).

E. Importance économique du parasitisme par les trématodes

Les trématodoses, en particulier la Fasciolose, causent de gros préjudices en élevage, en raison des pertes économiques à la fois directes et indirectes qu'elles entraînent.

En effet, la Fasciolose provoque

- la mort des animaux (surtout ovins) présentant une forme aigüe,
- des chutes de production laitière (en quantité, mais aussi en qualité avec une diminution notamment du taux protéique en raison de l'atteinte hépatique (Charlier et al., 2008) et une augmentation des infections néonatales par diminution de la qualité du colostrum maternel,
- une baisse de la fertilité, et de la fécondité avec un intervalle vêlage-vêlage augmenté (Dargie, 1987; Charlier et al., 2007),
- une diminution de la quantité et/ou de la qualité de la viande et de la laine,
- une diminution de la croissance des jeunes : en élevage allaitant, il y a une diminution du poids au sevrage et du Gain Moyen Quotidien des veaux infestés par rapport aux non-infestés (Alzieu, Mage, 1991),
- la saisie ou le déclassement des foies malades à l'abattoir.

Les raisons expliquant la baisse de productivité induite par les trématodoses sont complexes, elles comprennent une baisse de l'appétit et une diminution de la capacité de digestion (Loyacano et al., 2002), couplée à une perte protéique et énergétique (modification de l'anabolisme et du catabolisme hépatique), et dans certains cas à des modifications de la fonction gastro-intestinale (Dargie 1987).

Aucune donnée chiffrée ne permet d'évaluer l'incidence économique de la Dicrocœliose. Une hiérarchisation effectuée par Alzieu et Courouble en 2004 indique qu'au niveau des

répercussions économique pour un élevage, la Dicrocoeliose est moins importante que la Paramphistomose, elle-même moins importante que la Fasciolose.

La Fasciolose sub-clinique a un impact économique important, qui a été estimé au travers de différentes études. L'estimation des pertes annuelles par vache laitière infectée est de 299 € en Suisse, correspondant à une perte économique de plus de 50 millions € par an (Schweizer et al., 2005), et en Belgique, elle a été estimée à 30€ par vache sur l'ensemble des élevages bovins des Flandres (Bennema et al., 2009). Cette dernière étude confirme ce qu'avaient montré Charlier et al. en 2007, à savoir que l'observation d'une augmentation du taux d'anticorps dirigés contre *Fasciola* (dépistés par un test ELISA sur le lait de tank) était associée à une baisse de production de 0,7 kg de lait par vache et par jour.

Il est difficile de quantifier les pertes économiques mondiales liées aux infestations par les trématodes, mais les coûts associés à la Fasciolose pour l'industrie agricole ont été estimés à quelques milliards de dollars par an dans le monde.

III. Outils de diagnostic coproscopiques

A. Indications de la coprologie chez les ruminants

Comme nous l'avons vu précédemment, les signes cliniques associés aux parasitoses ne sont pas spécifiques, et sont parfois frustrés. Aussi le recours aux examens de laboratoire est nécessaire pour détecter la présence des parasites, afin de confirmer la suspicion d'infestation. La coproscopie parasitaire permet également de suivre un effectif sur le plan parasitaire, et de vérifier l'efficacité d'un traitement antiparasitaire.

La coproscopie microscopique, qui consiste en l'examen des fèces à l'aide d'un microscope, est une méthode de diagnostic direct qui compte différentes techniques basées sur plusieurs principes de concentration (technique de flottation, ou de sédimentation). Suivant la technique utilisée, le résultat de l'examen est qualitatif ou quantitatif et exprimé, dans ce dernier cas, en œufs par gramme ou opg.

Lors de la réalisation d'une coproscopie qualitative, l'observation des œufs de parasites et leur identification est le but de l'examen. Cette technique peut donc être considérée comme suffisante lors de la mise en évidence de parasites dont les conséquences cliniques et économiques sont graves, comme que *Fasciola hepatica*. En effet, dans ce cas, la mise en évidence d'un œuf chez un individu est synonyme de présence et de la circulation du parasite au sein du lot dont est issu l'animal examiné.

Par contre, en ce qui concerne d'autres familles de parasites tels que les strongles, l'appréciation qualitative des fèces n'est pas suffisante, la décision de traitement sera dépendante du niveau d'excrétion fécale et des signes cliniques. L'objectif n'est pas alors l'absence d'infestation mais plus le contrôle de cette dernière afin que les animaux soient en contact avec le parasite, pour que l'immunité protectrice s'installe. L'absence d'œufs lors de l'examen ne peut pas non plus être considérée comme une absence d'infestation de l'animal, pour au moins trois raisons :

- i) l'examen est réalisé en période prépatente
- ii) l'excrétion des œufs est très irrégulière (comme par exemple l'élimination des segments ovigères des *Moniezia* spp)
- iii) la technique en elle-même manque de sensibilité, et surtout lorsque l'infestation est faible et l'espèce parasitaire peu prolifique. Le prélèvement effectué ne représente qu'une infime partie des fèces éliminées quotidiennement par l'animal : l'échantillon observé est de 3 à 5g, contre une émission moyenne de 30 à 50kg de fèces en 24h (Euzéby 1981).

Les méthodes d'évaluation quantitative sont celles que nous développerons par la suite.

La coproscopie quantitative permet de quantifier le nombre d'œufs de parasites présents : le résultat se donne en nombre d'œufs présents par gramme de fèces d'un prélèvement (opg). Le comptage des œufs peut se faire soit directement sur la lame de coproscopie (technique utilisée par exemple lors de concentration par sédimentation ou lors d'étalement direct de matières fécales), soit grâce à une lame de type McMaster (le plus souvent employée avec une concentration par flottation). Il existe un grand nombre de techniques, nous ne les présentons pas toutes ici.

B. Matériel et prélèvements

1. Matériel

Le matériel nécessaire pour un diagnostic coproscopique est simple, ce qui rend cet examen facilement réalisable dans les structures vétérinaires.

La coproscopie nécessite :

- une balance précise au 0,01g, un mortier, un pilon, des verres à pied, des pipettes, des tubes à essai, un tamis et des compresses de gaze, pour le mélange des fèces, leur dilution et leur filtration,
- Des lames, des lamelles, une lame de McMaster, et un microscope optique (avec objectifs $\times 4$, $\times 10$, $\times 40$ et $\times 100$ pour l'identification et le dénombrement.

2. Prélèvements

La meilleure méthode de prélèvement fécal des ruminants est l'exploration rectale. Après l'opération réalisée avec un gant en plastique souple, ce dernier est retourné et noué, réalisant ainsi un sac à matières fécales. Ainsi, il n'y a pas de contaminations par des vers libres ou des acariens présents dans la litière ou sur la pâture. Un prélèvement sur les fèces émises peut également être effectué (cas d'animaux peu manipulables), en prélevant une carotte au centre des matières fécales fraîches, de telle manière qu'elles ne soient pas souillées par ces mêmes nématodes et acariens libres.

Le gant en plastique est le conditionnement le plus utilisé pour les fèces. Ceci est suffisant, mais un contenant fermé hermétiquement peut également être utilisé (pour éviter la déshydratation des prélèvements). Il est important de bien renseigner le numéro de l'animal ou le numéro de prélèvement sur le contenant, et de veiller à ce que ce dernier ne soit pas détérioré au cours de l'envoi.

Lors de l'envoi ou de la conservation d'un prélèvement, un paramètre important à prendre en compte est la température. En effet, la réfrigération à une température positive ($+4^{\circ}\text{C}$) ralentit l'évolution des éléments parasitaires, et permet de conserver un prélèvement. La conservation peut également se faire à température ambiante à condition que le conditionnement soit sous vide d'air. Ce milieu anoxique empêche l'évolution des œufs. La congélation est à proscrire car il y a destruction des éléments parasitaires et perte de sensibilité. La dilution dans du formol n'est pas indiquée non plus, du fait de sa toxicité non négligeable à la manipulation, et de son impact négatif sur la quantification parasitaire (perte de précision par dilution, par exemple).

C. Les différentes méthodes coproscopiques quantitatives

Afin de pouvoir observer correctement les éléments parasitaires, il est nécessaire de concentrer ces derniers, ainsi que d'éliminer une grande partie des débris végétaux, et autres débris présents dans les fèces des animaux (cellules...). Ceci implique donc l'utilisation de méthodes de concentration, qui regroupent différentes techniques (concentration par flottation, ou par sédimentation) et utilisent la densité relative des éléments parasitaires.

1. La concentration par flottation

a) Méthode

Les méthodes d'enrichissement par flottation font appel à des solutions de densité élevée, afin de concentrer les éléments parasitaires, de densité inférieure, à la surface du liquide. Leur densité conditionne leur concentration à la surface.

C'est une technique simple, qui demande peu de matériel.

Différents liquides de flottation sont utilisés, avec différentes densités, en fonction des œufs que l'on veut mettre en évidence. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les œufs de trématodes sont des œufs lourds, la densité des liquides pour leur détection coproscopique doit donc idéalement être supérieure à 1,4.

La méthode historique a été développée par Bass et Fülleborn (cité par Bailenger en 1982), elle utilise une solution de chlorure de sodium saturée, et la lecture se fait sur un prélèvement de la surface du liquide obtenu, après 45 minutes.

Différentes variantes de cette méthode ont été par la suite développées afin de permettre une meilleure détection des œufs : Willis en 1921 a introduit l'étape de versement de la solution fécale dans un tube à essai jusqu'à obtention d'un ménisque, qui consiste à déposer une lamelle à la surface du tube et d'ensuite examiner cette lamelle au microscope.

De plus, une étape de centrifugation peut être ajoutée, afin de diminuer le temps de réalisation de la méthode.

b) Les différents liquides utilisés pour la flottation

Différents liquides de flottation ont été proposés au cours des années, afin de détecter au mieux les œufs de parasites. Ces liquides se différencient par leur constituant de base, mais aussi par leur densité plus ou moins élevée, qui conditionne leur utilisation pour la mise en évidence des éléments parasitaires.

- Le saccharose

La solution de saccharose a été comparée à une solution de chlorure de sodium dans une étude publiée par Levine et al. en 1960. Aucune différence dans la sensibilité n'est notée, cependant la lecture est facilitée car le saccharose cristallise moins que le chlorure de sodium. Différentes proportions de mélange du saccharose peuvent être utilisées, engendrant ainsi des solutions dont la densité peut aller de 1.15 à 1.35. Sans impact pour l'environnement, il est toutefois délicat à utiliser car de nombreuses bulles peuvent se former.

Il peut être mélangé avec du nitrate de sodium ou du formol (Cringoli et al., 2004).

- Le chlorure de sodium

La solution salée obtenue à partir de chlorure de sodium dissous dans l'eau est le liquide de flottation historiquement utilisé, la solution préconisée étant une solution de chlorure de sodium à saturation (25%, dont la densité est de l'ordre de 1,20).

Il est très simple à réaliser, non dangereux, et très peu cher.

- Le chlorure de calcium

Les solutions de chlorure de calcium testées lors d'expérimentation présentaient des densités allant de 1,05 à 1,20. Il n'est pas utilisé en routine.

Ces solutions (chlorure de calcium, saccharose, chlorure de sodium) ont l'avantage d'être peu dangereuses, peu chères et de bien se conserver, et n'entraînent pas de déformation des œufs, mais la densité de ces solutions n'est pas suffisante pour faire remonter des œufs lourds tels que les œufs de *F. hepatica*, *D. lanceolatum* ou *C. daubneyi*. Par exemple, Cringoli et al. (2004) n'ont trouvé aucun œuf de *D. lanceolatum* avec les solutions de saccharose utilisées.

Les liquides présentés ci-après présentent une densité plus élevée, permettant de faire remonter les œufs plus lourds.

- Le nitrate de sodium (salpêtre)

La densité de la solution à saturation est de 1,40. Les solutions obtenues à partir de nitrate de sodium peuvent être pures, ou bien associées à du saccharose, ou à du thiosulfate de sodium. La densité élevée de ces solutions permet de faire remonter les œufs de nématodes et ceux de *D. lanceolatum* (Cringoli et al., 2004).

- Le nitrate de potassium

Employé dans une solution à 85%, la densité du liquide obtenu est de 1,40, ce qui permet de détecter les œufs de trématodes.

- L'iodomercurate de potassium

La solution d'iodomercurate de potassium initialement proposée en 1931 comporte de l'iodure de potassium et de l'iodure de mercure (Bailenger 1982). Par la suite, les composants sont restés les mêmes, seule la concentration en mercure de la solution a été diminuée de 100g pour 265mL à 100g/L (Bailenger 1982). La densité de la solution obtenue est plus élevée que toutes celles citées précédemment, elle est de 1,44.

Cette densité élevée permet donc d'avoir une très bonne sensibilité dans la détection d'œufs de trématodes. De plus, la remontée des débris végétaux est limitée, ce qui facilite la lecture des lames. En 1974, Raynaud et al. comparent les résultats obtenus par la sédimentation ou par la flottation des œufs, et concluent que la méthode de flottation dans l'iodomercurate de potassium présente de meilleures qualités de reproductibilité, précision, sensibilité et rapidité, que celle de sédimentation (Meissonnier et Mage, 2007).

Cependant, l'iodomercurate de potassium modifie l'aspect des œufs par contraction, disparition de l'opercule et éclaircissement, ce qui peut rendre la lecture difficile. La difficulté principale réside en la distinction des œufs de *Fasciola hepatica* et de *Calicophoron daubneyi* (Raynaud 1970).

Il est également important de noter le coût important de ce liquide, ce qui en limite l'utilisation bien qu'une technique de régénération a été proposée par Raynaud et Brunault en 1974.

De plus, l'utilisation de ce liquide présente un grand risque de toxicité. En effet, les composants du liquide, qui sont l'iodure de potassium et l'iodure de mercure, sont catégorisés comme toxiques, et leur acquisition et manipulation est soumise à une réglementation précise. Ces liquides ont un effet caustique et allergisant, pouvant mener à l'apparition d'une irritation de la peau et des muqueuses (oculaires et respiratoires), voire de l'eczéma ou un œdème (INRS, 2003). En outre, le mercure et ses dérivés sont tératogènes et embryotoxiques. Une exposition permanente entraîne des dommages permanents sur le système nerveux.

Ces inconvénients mènent donc à un abandon de ce liquide, et ont amené les laboratoires à se tourner vers d'autres liquides beaucoup moins toxiques.

- Le sulfate de magnésium

La solution de sulfate de magnésium à saturation, ayant une densité voisine de 1,30, a été utilisée par Dunn en 1955. Selon les proportions du mélange, la densité de la solution obtenue peut être de 1,20 à 1,30.

En ce qui concerne la détection des œufs de trématodes, il est le moins sensible des liquides conduisant à l'obtention d'un résultat positif dans la remontée d'œufs de *D. lanceolatum* (Cringoli et al., 2004).

- Le sulfate de zinc

Le sulfate de zinc est utilisé en solution, allant de 33% (concentration utilisée par Faust en 1938 (Bailenger 1982), la densité obtenue est alors de 1.18, jusqu'à saturation. Depuis quelques années, et notamment en raison de la toxicité apparente de l'iodomercurate de potassium, le sulfate de zinc est de plus en plus utilisé, à une densité allant de 1.35 à 1.40.

Dans certaines études, il est associé à l'iodomercurate de potassium pour améliorer la sensibilité du mélange. La densité du liquide obtenu est de 1,45 (Rinaldi et al., 2009).

Le coût de ce liquide est moyen, et il est peu toxique, ce qui rend son utilisation facilitée pour les laboratoires, d'autant plus qu'il présente une bonne sensibilité dans la détection des œufs de trématodes, et notamment de *F. hepatica* (Gibson 1965). Toutefois, son élimination requiert des mesures strictes afin d'empêcher toute pollution de l'environnement.

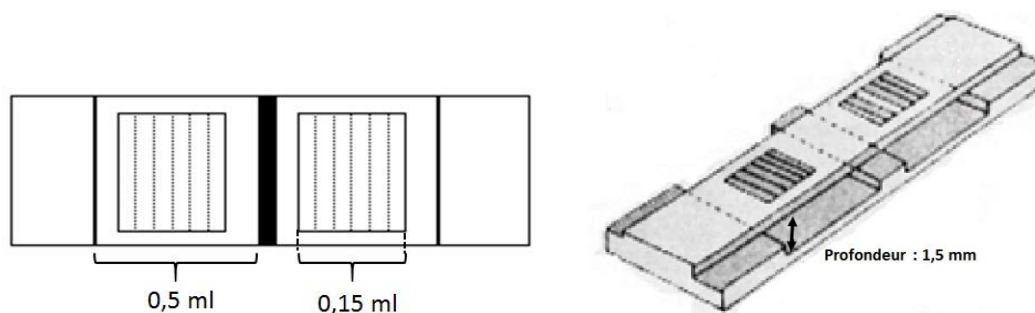
Ce liquide a cependant pour inconvénient d'entraîner des altérations morphologiques des œufs, compliquant leur identification, et de former de nombreuses bulles lorsqu'il est utilisé à une densité de 1,40, ainsi que d'entraîner la remontée des débris végétaux, rendant par conséquent la lecture plus difficile.

Les observations de Euzeby, en 1981, ont montré que la solution de sulfate de zinc à 33% concentré, en moyenne, de 15 à 20 fois moins d'œufs de *F. hepatica* que la solution d'iodomercurate de potassium, et que la solution saturée de sulfate de magnésium en concentre 5 fois moins.

Ces observations montrent bien l'intérêt constant de la recherche d'un liquide tout aussi efficace que l'iodomercurate de potassium mais n'ayant pas ses caractéristiques toxiques.

c) La technique de McMaster

La méthode par flottation la plus utilisée est la technique de McMaster, utilisant une lame à deux cellules quadrillées permettant de dénombrer très facilement et rapidement les œufs (figures 26 et 27).



Figures 26 et 27 : cellule de McMaster

Ces lames comportent 2 chambres, et chaque chambre contient un réseau quadrillé. La profondeur de la cellule est de 1,5 mm, et la surface de quadrillage est de 10 mm × 10 mm = 100 mm². Le volume de l'échantillon à examiner pour chaque quadrillage est donc de : 100 x 1,5 = 150 mm³, ou 0,15 ml

Ce réseau contenant 0,15 ml correspond au cadre dans lequel les œufs sont comptés. Sachant que la solution à examiner est obtenue en mélangeant 3g de matières fécales à 42 ml de liquide, chaque réseau contient 1/300^{ème} du volume total de la solution. Chaque œuf compté correspond donc à 300 œufs pour 3g de matières fécales, soit 100 œufs par gramme. Puisque les deux réseaux sont comptés, un œuf compte pour 50 œufs par gramme de matières fécales (opg).

Si aucun œuf n'est trouvé lors de l'observation à l'intérieur des deux réseaux, la découverte d'un seul œuf (ou de plusieurs) dans la chambre en dehors du réseau compte pour 15 opg de matières fécales.

Les différentes étapes sont :

- pesée et dilution des fèces dans un volume défini du liquide dense choisi, et homogénéisation du mélange.
- filtration à travers un tamis afin d'éliminer un maximum de débris végétaux, étape qui est renouvelée deux fois.
- prélèvement d'une partie du filtrat obtenu à l'aide d'une pipette et transfert dans une lame de McMaster (préalablement rincée à l'eau, et tenue inclinée afin de permettre aux bulles d'air de s'échapper). 0,5ml est déposé dans chaque chambre de la cellule.
- après 2 à 3 minutes, les œufs flottent à la surface du liquide d'enrichissement et viennent adhérer sous le verre supérieur de la lame de McMaster, ils sont alors identifiés et dénombrés au microscope dans chaque colonne de chaque réseau et pour chacune des deux chambres.
- le reste du filtrat est versé dans un tube à essai jusqu'à obtention d'un ménisque convergent, et une lamelle en verre de 22×22 mm est déposée sur le tube. Elle est laissée en place 30 min puis observée au microscope (principe d'enrichissement).

Une ou plusieurs centrifugations peuvent être effectuées en complément, afin de forcer la remontée de tous les œufs à la surface. Les inconvénients des méthodes dites de flottation-centrifugation comprennent un temps de préparation long, et la nécessité de disposer de matériel spécifique et coûteux tels que la centrifugeuse.

d) Avantages et inconvénients de la flottation

L'avantage principal de cette technique est sa rapidité. En effet, l'utilisation de la lame de McMaster pour la lecture permet d'identifier et de quantifier les œufs présents très rapidement. C'est également une technique facile à mettre en œuvre, peu coûteuse, et sensible (concentration des éléments parasitaires et élimination d'une grande partie des débris végétaux).

Les limites de la technique sont inhérentes aux caractéristiques de la solution employée : une solution qui n'est pas assez dense ne permettra pas la remontée des œufs lourds, et une solution très dense, permettant l'ascension des éléments les plus lourds, modifie l'aspect des œufs du fait des phénomènes osmotiques.

Les modifications sont : une contraction de ces derniers, une disparition fréquente de l'opercule, un éclaircissement. Cependant ces modifications ne gênent généralement pas la diagnose des œufs de trématodes. Suivant l'expérience du technicien, ces derniers restent identifiables, de par leur taille, leur forme, ou leur couleur (grâce à l'utilisation de filtres).

2. La concentration par sédimentation

a) Méthode

Le principe est de diluer l'échantillon de fèces dans une solution aqueuse (donc de densité égale à 1). Ainsi, les œufs de parasites et les autres éléments plus denses que l'eau se déposent au fond du verre à pied, alors que les autres particules (alimentaires, débris légers) restent en suspension dans la solution. Les caractéristiques physico chimiques des éléments parasitaires jouent ici un grand rôle, en effet la concentration des œufs est facilitée par leur caractère hydrophile.

Les méthodes d'enrichissement par sédimentation sont très utilisées pour détecter les œufs lourds, par conséquent pour détecter ceux de trématodes. D'après Boray (1969) et Rojo-Vázquez (2012), les techniques de sédimentation sont plus précises et sensibles que les techniques de flottation, pour la détection des œufs de Grande Douve et de trématodes en général.

La méthode primitive a été décrite par Faust dans les années 1930, qui utilisait l'eau du robinet comme liquide de dilution. En 1946, Faust et Ingalls ont développé une autre méthode utilisant cette fois une solution aqueuse de glycérine à 0,5%. Mais ces méthodes requièrent beaucoup de temps, car 30 à 45 minutes sont nécessaires pour laisser le temps aux œufs de parasites de sédimenter.

Différentes variantes ont été proposées afin d'améliorer la détection des œufs de parasites. Elles concernent le liquide de dilution : Jahnes et Hodges (1947) utilisent de l'alcool éthylique à 10%, Euzéby (1956) propose l'utilisation de détergent (teepol, 1%) ajouté dans l'eau, ou bien le rajout d'une étape supplémentaire. Ainsi, Barrody et Most utilisent une étape de centrifugation afin de diminuer le temps de sédimentation, et Boray et Pearson ajoutent une étape de coloration au bleu de méthylène afin d'améliorer la détection des œufs parmi les débris (Bailenger 1982; Happich, Boray 1969).

Ces méthodes requièrent différentes étapes :

- pesée et dilution des fèces dans un volume défini du liquide choisi, et homogénéisation du mélange
- filtration à travers un tamis afin d'éliminer un maximum de débris végétaux, étape qui peut être renouvelée plusieurs fois, au moins 2 fois
- utilisation possible d'une étape de centrifugation
- A l'aide d'une pipette, 4 gouttes de 0,15 ml sont disposées sur 2 lames en verres. Ces gouttes sont recouvertes chacune d'une lamelle de 22x22 mm.
- Le reste du filtrat est gardé dans le verre à pied, et laissé en place pendant 30 minutes. Une centrifugation raccourcit le temps nécessaire à la sédimentation. 0,15 ml du liquide de sédimentation est ensuite observé au microscope.

La méthode de Stoll suit ce principe de concentration par sédimentation, et requiert l'utilisation d'une solution de soude décinormale (4g de NaOH dans un litre d'eau). La soude a pour rôle d'éclaircir la solution et de faciliter la lecture.

La prise d'essai de 0,15 ml correspond à 1/300^{ème} du volume total de la suspension (composée de 3g de matières fécales et de 42 ml de solution). Chaque œuf compté correspond donc à 300 œufs pour 3g soit 100 œufs par gramme. Le comptage sur 4 échantillons de la suspension permet d'augmenter la sensibilité à 25 œufs par gramme (opg). Lorsqu'aucun œuf n'est retrouvé sur les 4 échantillons observés, par convention (la sédimentation n'étant pas forcément homogène au fond du verre à pied), la mise en évidence d'un ou de plusieurs œufs dans la sédimentation totale (après 30 minutes) correspond à 12 œufs par gramme de matières fécales.

b) Avantages et inconvénients de la sédimentation

Cette technique a plusieurs avantages : elle ne requiert pas de matériel spécifique, et le matériel utilisé est simple, et peu coûteux, c'est donc un examen aisément pratiqué. De plus, elle n'entraîne aucune déformation des œufs observés.

De plus, le raccourcissement des temps de sédimentation permet à cette technique d'être plus utilisable en routine, et l'utilisation d'un colorant tel que le bleu de méthylène permet une distinction facilitée des œufs, afin notamment de différencier les œufs de *F. hepatica* et de *C. daubneyi* des éléments végétaux.

Cependant, le principal inconvénient de cette technique est qu'elle requiert beaucoup de temps. En effet, le comptage des œufs est une étape qui est très longue, d'une part par le balayage des lamelles au grossissement adapté du microscope, et d'autre part en raison de la quantité de débris présents sur les lames, ralentissant l'observation minutieuse des œufs.

Le tableau 2 synthétise brièvement les avantages et inconvénients des techniques de sédimentation et de flottation.

Tableau 2 : tableau récapitulatif des avantages et inconvénients des techniques de flottation et de sédimentation

	Avantages	Inconvénients
Flottation	Très bonne sensibilité Facile Rapide Faible coût	Déformation des éléments parasitaires Si la densité est inférieure à 1,4 : pas de mise en évidence des œufs de trématodes, lourds
Sédimentation	Facile Faible coût Mise en évidence des œufs lourds	Technique longue Sensibilité moyenne

PARTIE 2 : ÉTUDE EXPERIMENTALE

I. Introduction

Comme nous l'avons souligné dans la partie bibliographique, le nombre d'infestations des ruminants par les trématodes demeure important, voire en augmentation notamment avec les Paramphistomoses. Pour s'assurer à la fois du diagnostic, de la nécessité d'un traitement et de son efficacité, l'examen coproscopique est indispensable. Il est par ailleurs le seul outil disponible du vivant de l'animal pour détecter les infestations par les trématodes *Calicophoron daubneyi* et *Dicrocoelium lanceolatum*.

Cependant, il convient de déterminer quelle technique de diagnostic coproscopique utiliser. En effet, comme nous l'avons vu, les techniques de diagnostic par flottation présentent ou bien un manque de sensibilité pour la détection des œufs lourds (si la densité de la solution utilisée est trop faible) ou bien présentent une grande toxicité d'utilisation (comme avec l'iodomercurate de potassium).

Les techniques de diagnostic par sédimentation sont très utilisées, mais présentent l'inconvénient d'être très longues à mettre en œuvre. En effet, le comptage des œufs est une étape qui demande beaucoup de temps, d'une part par le balayage des lamelles au grossissement adapté du microscope, et d'autre part en raison de la quantité de débris présents sur les lames, ralentissant l'observation minutieuse des œufs.

Jusqu'à il y a quelques années, la technique la plus utilisée en laboratoire était la flottation avec une solution d'iodomercurate de potassium. Malgré son prix élevé, la rapidité d'exécution de cette technique la rendait très pratique pour effectuer de nombreuses coproscopies. Mais l'utilisation de ce produit et son recyclage requièrent d'importantes mesures de sécurité, qui ne garantissent pas une innocuité parfaite pour autant. Ainsi, la toxicité importante de l'iodomercurate a conduit à un arrêt de son utilisation au laboratoire de Parasitologie de l'ENVT.

Depuis, la solution de sulfate de zinc est celle qui tend à remplacer celui-ci. Moins chère, dense, elle permet une bonne flottation des œufs de trématodes. Elle nécessite également un recyclage, et l'obtention d'une densité importante pour la préparation de la solution n'est pas facile. En outre, comme l'iodomercurate de potassium, elle entraîne une déformation des œufs, et surtout, la formation de nombreuses bulles gênant la lecture, rendant donc la distinction très difficile entre *Calicophoron daubneyi* et *Fasciola hepatica* par exemple.

Parmi les méthodes de sédimentation, celle de Stoll, utilisant une solution de soude, est encore aujourd'hui très utilisée, en pratique courante notamment. En effet, le matériel requis est très simple et peu cher. Cependant, c'est une technique qui demande beaucoup de temps. Pour être suffisamment sensible, 4 lamelles au grossissement $\times 400$ doivent être lues par échantillon, ce qui est très fastidieux.

Devant ce constat, il est apparu nécessaire de rechercher une alternative, combinant à la fois la rapidité et la praticité des techniques de flottation utilisant la lame de Mac Master, et une

grande sensibilité et une reconnaissance aisée des œufs. Pour envisager une technique mettant en œuvre la flottation, un liquide dense est donc nécessaire.

Le Polytungstate de sodium (appelé PTS par la suite) est l'un de ces liquides. De formule $3\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 9\text{WO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, le PTS est un composé de séparation non toxique (Sax, 1979) dont la dilution avec de l'eau distillée entraîne une solution de haute densité (de 1 à 3 g/cm³ selon la préparation), neutre, présentant une faible viscosité.

Il apparaît dans les années 80, utilisé comme liquide de haute densité pour effectuer des séparations minérales par exemple (Gregory, Johnston, 1987), pour la séparation de différents feldspaths, ou bien pour l'isolement de fractions minérales inorganiques (cendres) à partir du charbon. Krukowski et al. (1988) l'ont utilisé pour la récupération de microfossiles, les éléments de Conodontes.

Le PTS est par la suite très employé en archéologie ou en paléontologie. En 1996, Munsterman et Kerstholt publient une étude démontrant l'efficacité du PTS comme alternative à l'utilisation de bromoforme lors d'examen d'échantillons de pollen. Son utilisation est reconnue en palynologie, car elle résulte en une augmentation du nombre et de la diversité des dinokystes mis en évidence (microfossiles retrouvés dans les roches sédimentaires de milieu marins). Bosi et al. (2011) puis Florenzano et al. (2012) utilisent le PTS (seul, ou combiné à d'autres liquides) pour la recherche de pollen dans des échantillons de sol prélevés sur des sites archéologiques. Après le traitement des échantillons dans le but de retrouver des grains de pollen, ils ont noté la présence en grande quantité d'œufs de parasites : *Trichuris* sp, *Ascaris* sp, *Taenia* sp /*Echinococcus* sp, *Capillaria* sp, *Dicrocoelium* sp, et *Diphyllobothrium* sp extraits des échantillons (Florenzano et al., 2012).

Le PTS apparaît donc comme un liquide dense, très soluble dans l'eau, permettant l'élaboration de solutions elles aussi très denses. Ainsi, en préparant une solution de densité supérieure à 1,3, pour la détection des œufs de trématodes, ce liquide semble très approprié à la recherche parasitologique coproscopique.

Dans le cadre de l'étude expérimentale, il a donc été décidé d'utiliser le PTS comme liquide de flottation, et d'utiliser la méthode de McMaster, afin de déterminer sa sensibilité dans la détection des œufs de trématodes, ainsi que les avantages et les inconvénients de l'utilisation de ce nouveau liquide.

Nous avons décidé de comparer cette technique à une technique de sédimentation utilisant la méthode de Stoll, qui est la technique utilisée au laboratoire de l'ENVT aujourd'hui pour la détection des œufs de trématodes.

II. Matériel et méthodes

1. Les animaux et les prélèvements

a. Origine géographique des animaux

L'objectif de notre thèse est d'évaluer les performances du Polytungstate de Sodium (PTS) comme liquide dense de flottation pour la mise en évidence des œufs de trématodes. Les élevages ont été recrutés selon le principe du volontariat. Les animaux provenaient d'élevages principalement du Sud-Ouest pour les brebis (Pays Basque notamment), et du Limousin pour les bovins (Haute-Vienne pour la plupart). La condition unique d'inclusion dans l'étude a été l'absence de traitement contre le parasitisme dans les deux mois précédents le prélèvement de matières fécales. Les résultats des analyses ont été systématiquement transmis aux éleveurs. En concertation avec le vétérinaire traitant, la décision d'un traitement a été prise ou non.

b. Âge et utilisation des animaux prélevés

En ce qui concerne les animaux utilisés, aucun critère d'âge ni de statut physiologique n'a été retenu, mais il s'avère que concernant les brebis, la plupart des animaux prélevés étaient des agnelles primipares.

Les fèces de bovins examinés provenaient d'élevages laitiers (vaches de race Prim'Holstein) et allaitants (vaches Limousines) dans une proportion quasiment identique. Les éleveurs bovins du Limousin ont demandé à prélever en priorité les animaux qui leur semblaient les plus susceptibles d'être parasités, à savoir ceux ayant une note d'état corporel basse.

c. Prélèvements

i. Volume requis et identification des prélèvements

Les expériences nécessitaient une certaine quantité de fèces pour chaque animal (3 g pour chaque technique de diagnostic coproscopique, donc au minimum 6 g, voire plus lorsque des coproscopies de mélange des différents animaux d'un même élevage ont été effectuées). Ainsi, pour pouvoir avoir cette quantité à disposition, les contenants demandés étaient des gants de palpation transrectale (pour les bovins) ou bien des pots à prélèvement de 60 mL fermés hermétiquement (pour les brebis).

Les prélèvements ont été effectués en ferme directement dans le rectum, le plus profondément possible afin d'éviter les contaminations par les nématodes libres, ces derniers pouvant être présents dans les souillures de la queue.

Le numéro d'élevage était relevé pour chaque session de prélèvement. Chaque pot à prélèvement et chaque gant de fouille a été daté et identifié, avec le numéro de travail de chaque vache ou brebis. Ceci assurait donc une traçabilité de l'échantillon, et nous a permis de donner aux éleveurs des résultats individuels, pour ceux souhaitant par exemple identifier les principaux animaux excréteurs de leur troupeau.

Cependant, certains éleveurs nous ont simplement fait parvenir des échantillons non identifiés, car la motivation principale de leur participation à cette étude était de connaître le statut global de leur élevage en termes d'infestation parasitaire.

ii. Transport et conservation avant analyse

Pour le transport, les prélèvements étaient acheminés sous couvert du froid jusqu'au laboratoire de parasitologie de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, où ils ont été traités, dans la mesure du possible, dès leur arrivée, ou bien placés en chambre froide.

Étant donné la quantité de prélèvements envoyés par chaque élevage (allant de 10 à une trentaine parfois), l'analyse de l'ensemble des échantillons de chaque élevage demandait plusieurs jours de manipulation.

La conservation en chambre froide (à une température de +4°C) était l'option adoptée pour les prélèvements que nous pouvions examiner dans la journée suivant leur réception. La congélation détruit des éléments parasites et peut entraîner une sous-estimation de la quantification parasitaire qui s'accroît avec la durée de congélation. Aussi, tout échantillon décongelé a été analysé par les deux méthodes le même jour pour éviter ce biais faussant les comptages.

2. Méthodes de diagnostic coproscopique

Comme précisé dans l'introduction, nous avons comparé deux techniques de diagnostic coproscopique pour les trématodes des ruminants :

- la première étant une méthode suivant le principe d'enrichissement par flottation, utilisant le nouveau liquide dense à tester : le Polytungstate de Sodium (PTS).
- l'autre méthode, choisie pour la comparaison, est une méthode utilisant le principe de sédimentation : la méthode de Stoll. Cette méthode est utilisée au laboratoire de parasitologie de l'ENVT pour les œufs de trématodes depuis l'interdiction de l'utilisation de l'iodomercurate de potassium.

a. Méthode de McMaster modifiée utilisant le Polytungstate de Sodium (PTS) comme liquide de flottation

i. Caractéristiques du PTS

Le Polytungstate de Sodium est fourni par Polytungstates Europe (Chippenham, Wilts, Angleterre) sous le nom commercial de LST Fastfloat ND, solution aqueuse à la densité de 2,82 g/mL. Les conditionnements possibles sont 1L, 2L, 5L et 10L. La fiche commerciale résumant les caractéristiques du produit présente le PTS comme « le meilleur liquide dense pour une séparation rapide de minéraux, tout en gardant à l'esprit la sécurité des manipulateurs ». En effet, alors que l'utilisation des anciens liquides denses pose des problèmes environnementaux et inquiète au niveau de la sécurité des utilisateurs, celui-ci est non toxique et n'est pas néfaste pour l'environnement, donc ne nécessite pas l'utilisation de hottes aspirantes ou de protection particulière.

Il présente une grande stabilité (thermique notamment), et a une densité pouvant dépasser les 2,90 g/mL à 25°C.

- Caractéristiques physiques :

Le PTS contient 80% d'hétéropolytungstate de sodium ($3\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 9\text{WO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) sous forme de cristaux hydratés incolores et extrêmement solubles dans l'eau. La molécule de PTS est un agrégat de 12 unités monomères, et a une masse moléculaire de 1986 g/mol. Les solutions concentrées de PTS sont très denses, et sont presque incolores à jaunâtres. Il est disponible sous forme de poudre, de granules, ou sous forme liquide. Il ne présente pas d'odeur désagréable, n'est pas corrosif ni inflammable.

- Sécurité :

Le PTS a une bien moindre toxicité que les liquides denses organiques. Ce dernier est utilisé en solution dans de l'eau distillée. La solution aqueuse obtenue est neutre. Il n'est pas volatil et ne contient pas de solvants, ce qui permet son utilisation sans présence d'une hotte aspirante. Il ne dégage pas d'odeur désagréable et n'est pas inflammable.



GHS05 : Ce pictogramme de sécurité indique que le PTS est corrosif vis-à-vis des métaux (catégorie 1). Il peut être corrosif vis-à-vis de la peau et des yeux (catégorie 1).



GHS07 : Le PTS présente une toxicité (orale, dermique, et lorsque le produit est inhalé) aiguë (catégorie 4). Il peut entraîner une irritation de la peau et des yeux (catégorie 2), et une sensibilité de la peau (catégorie 1).

Figure 28 : pictogrammes de sécurité

Les dérivés du tungstène sont considérés généralement comme peu ou pas toxiques suivant le sel utilisé, mais ils sont peu étudiés (Strigul et al., 2010). Les valeurs de Dose Létale 50 (DL_{50}) ont été déterminées pour le polytungstate de sodium chez le Rat (Strigul et al., 2009) et sont égales à 1715 mg/kg (voie orale) et supérieure ou égale à 2000 mg/kg (voie cutanée). Ce sont des valeurs très élevées. En terme d'écotoxicité, le polytungstate de sodium se révèle 55 à 80 fois plus toxique que le monotungstate de sodium pour les poissons (Strigul et al., 2010). Cependant, seule la toxicité aiguë a fait l'objet d'investigations dans ces travaux, et non une exposition chronique à de plus faibles concentrations. Elle semble faible à modérée pour les poissons, les daphnies et les vers de terre avec des estimations de la DL_{50} de 130 à 850 mg de tungstène par litre d'eau et de 6,25 g de tungstène par kilo de terre (Callahan, 1987 ; Munsterman & Kerstholt, 1996 ; Strigul, et al., 2010). Du fait de ces données, certes parcellaires, le PTS doit donc être recyclé et éliminé dans des conteneurs pour liquides comme c'est déjà le cas pour le sulfate de zinc.

- Stabilité thermique :

Sa grande stabilité lui permet d'être amené à ébullition pour permettre à l'eau qui le compose de s'évaporer, et d'ainsi retrouver sa densité originale. Ainsi, le recyclage de ce produit est simple et rapide.

- Densité d'utilisation :

À 25°C, la densité maximale du PTS atteint 2,9 g/mL (figure 28). La solution envoyée par notre fournisseur est une solution ayant une densité de 2,80 g/mL, pour minimiser les risques de cristallisation du produit, qui a lieu lorsque la densité maximale est atteinte. La stabilité du produit est très grande : la densité du PTS ne change que de 0,01 g/mL par paliers de 10°C. La densité du produit est facilement ajustable de 1,0 g/ml jusqu'à 3,1 g/ml.

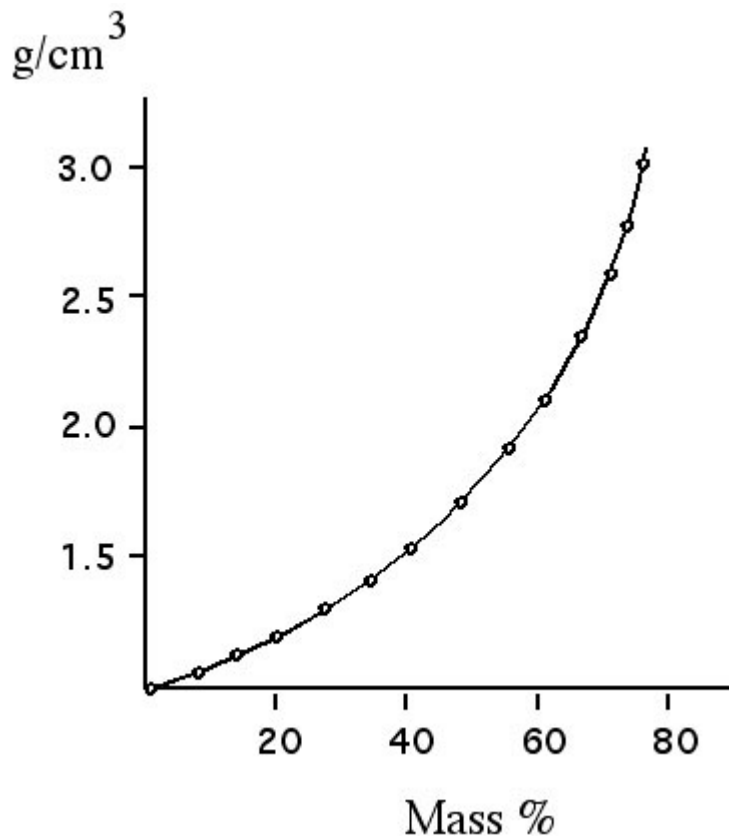


Figure 29 : densité d'une solution aqueuse de PTS en fonction de la masse de PTS à 25°C (source : <http://www.sometu.de/spt.html>)

- Viscosité :

La faible viscosité est l'une des principales caractéristiques du PTS. En effet, même à des concentrations élevées, sa viscosité reste faible. Celle-ci varie en fonction de la densité et de la température d'utilisation, mais aux températures et densités typiques, elle est de 10 centiPoise environ (figure 29). Ceci permet son utilisation pour des séparations minérales rapides.

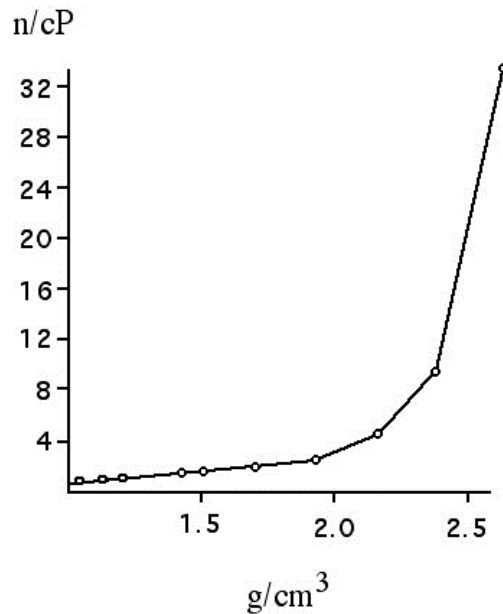


Figure 30 : viscosité d'une solution aqueuse de PTS en fonction de la densité de PTS à 25°C (source : <http://www.sometu.de/spt.html>)

- pH :

En fonction de la concentration en PTS, le pH de la solution obtenue se situe entre 2 et 3. Par exemple, à la densité de 4000g/l, à 20°C, la valeur du pH est de 3. Le PTS est stable dans une gamme de pH allant de 2 à 14.

- Utilisation et stockage :

Le PTS doit être stocké dans une pièce non humide et à température ambiante, dans le contenant original. Ce produit réagit avec de nombreux métaux, donc le contact avec des contenants métalliques doit être évité lors de son stockage ou de son utilisation. Lors des manipulations, il est nécessaire d'utiliser des contenants en verre ou en plastique. En cas de stockage à de très basses températures, des cristaux peuvent apparaître, mais ces derniers sont dissouts dès lors que le liquide est réchauffé.

Pour effectuer les dilutions, il est important d'utiliser de l'eau distillée, ou désionisée, car l'eau du robinet est susceptible de contenir des ions calcium, qui provoquent la formation d'un précipité de polytungstate de calcium, qui est insoluble en solution aqueuse.

- Recyclage :

Lors de son utilisation pour la séparation de minéraux, le PTS peut être recyclé très facilement en nettoyant les minéraux avec de l'eau désionisée, puis en filtrant, et enfin en concentrant l'eau de lavage en l'amenant à ébullition. Le PTS est un produit non volatile, ce qui permet sa concentration lors de l'évaporation de l'eau le composant. Ainsi, ce produit peut être recyclé avec une efficacité de plus de 99%, et en général, une perte de seulement 1,5 mL par kilogramme d'échantillon minéral est notée lors de son utilisation. L'absence d'ions calcium est indispensable, car en cas de présence de ces ions, il se forme un précipité de métatungstate de calcium, insoluble en solution aqueuse.

ii. Ajustement de la densité de PTS à 1,43g/mL

La préparation de la solution de PTS se fait à partir de la solution de densité 2.80 g/mL.

La densité que nous souhaitons obtenir étant de 1,44 pour permettre la remontée des œufs de trématodes, lourds, une dilution de la solution d'origine était nécessaire.

La préparation de la solution est très simple, extemporanée, et consiste à diluer 0.1 L de la solution mère dans 309 mL d'eau distillée.

En effet le calcul a été effectué comme expliqué ci-dessous (à 20°C) :

- $\frac{m_1}{V_1}$ la masse volumique de la solution mère (2.80 g/mL),
- $\frac{m_2}{V_2}$ celle de la solution d'eau distillée (1.00 g/mL)
- $\frac{m_3}{V_3}$ celle de la solution souhaitée (1.44 g/mL)
- Soit v_1 le volume de la solution mère à prélever (100 mL)

Le volume v_2 d'eau distillée à ajouter est donc calculé selon cette équation :

$$\frac{(v_1 \times \frac{m_1}{V_1} + v_2 \times \frac{m_2}{V_2})}{v_1 + v_2} = \frac{m_3}{V_3}$$
$$\frac{(100 \times 2.80 + v_2 \times 1)}{100 + v_2} = 1.44$$
$$144 + 1.44 v_2 = 280 + v_2$$
$$v_2 = \frac{280 - 144}{1.44 - 1} = \frac{136}{0.44} = 309 \text{ mL}$$

Après préparation de la solution fille, la densité était vérifiée à chaque fois en pesant 100 mL de la solution (après avoir taré la balance avec la fiole jaugée de 100 mL).

iii. Application à la méthode de McMaster (figure 30)

La première étape consiste en la préparation extemporanée, rapide, de la solution de Polytungstate de sodium (PTS, $d=1,44$).

Trois grammes de matières fécales sont pesés avec une balance puis sont écrasés dans un verre à pied à fond conique, dans lequel sont ensuite ajoutés 42 ml de solution de PTS ($d=1,44$), avant de mélanger et d'homogénéiser le tout.

Le contenu est versé sur une passoire au-dessus d'un autre verre à pied pour filtrer les gros débris végétaux. La filtration est facilitée par l'utilisation d'un pilon servant à déliter les matières fécales. Cette dernière étape est renouvelée deux fois.

Après agitation de la solution obtenue, une partie du filtrat est prélevé avec une pipette pour remplir immédiatement les deux chambres de comptage d'une lame de Mac Master.

L'observation est réalisée après 3 minutes d'attente pour permettre aux œufs de flotter à la surface du liquide d'enrichissement et d'adhérer au réseau de la lame de Mac Master, présent sur la lame recouvrant la cellule.

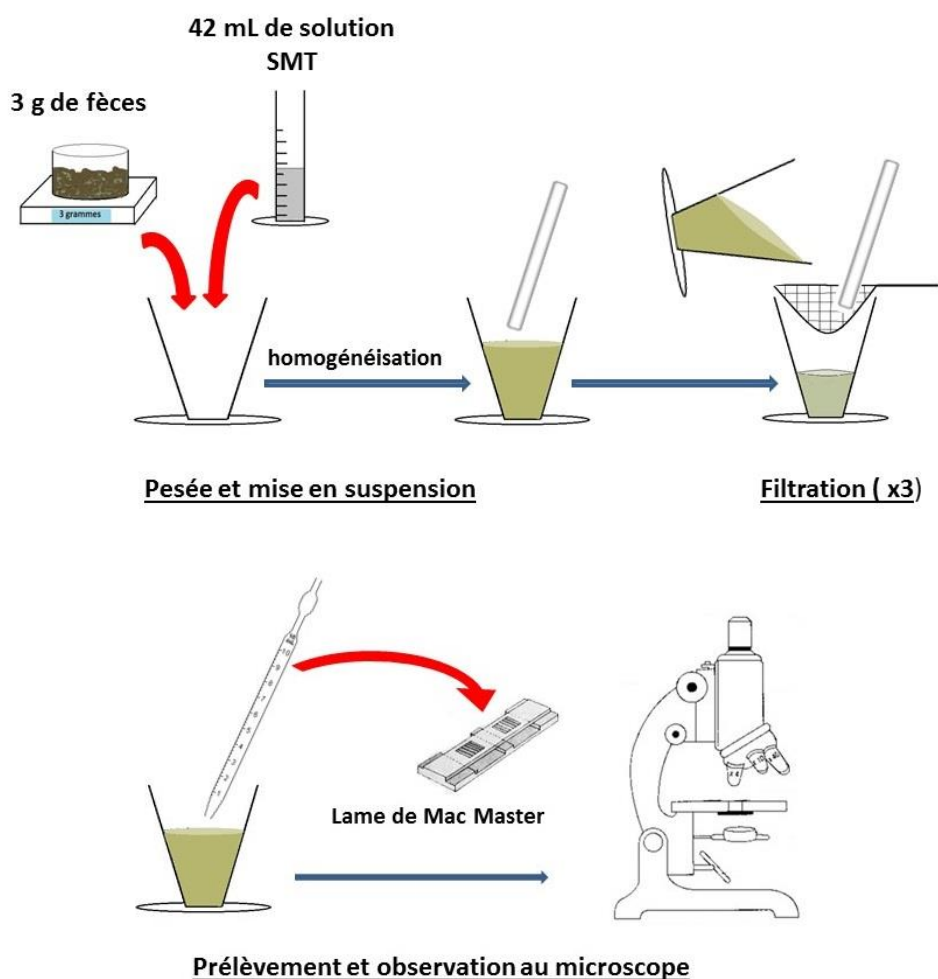


Figure 31 : déroulement de la méthode de coproscopie par la méthode de McMaster utilisant le PTS

iv. Lecture des réseaux et dénombrement des œufs

La lecture du réseau s'effectue au microscope électronique, au grossissement $\times 100$. La distance entre la lamelle gravée de la lame de McMaster et l'objectif est trop faible sur les microscopes que nous avons utilisés pour pouvoir nous servir de l'objectif $\times 40$. Chaque réseau a un contenu de 0,15ml soit $1/300^{\text{ème}}$ du volume total contenu de la solution. Chaque œuf compté correspond donc à 300 œufs pour 3g de matières fécales, soit 100 œufs par gramme. Puisque les deux réseaux sont comptés, un œuf compte pour 50 œufs par gramme de matières fécales (opg).

Si aucun œuf n'est trouvé lors de l'observation à l'intérieur des deux réseaux, la découverte d'un seul œuf (ou de plusieurs) en dehors du réseau compte pour 15 œufs par gramme de matières fécales.

v. Flottation totale (figure 31)

Afin de détecter les éléments parasitaires présents en très faible quantité (au-dessous du seuil de sensibilité de 15 opg), il est nécessaire de recourir à la flottation totale, plus sensible, à

partir du liquide non utilisé. La préparation obtenue est versée dans un tube à essai de 15 mm de diamètre intérieur, jusqu'à obtention d'un ménisque convergent. Une lamelle en verre de 22 mm de côté est placée au-dessus du tube, au contact du liquide. Après 30 minutes d'attente, la lamelle est déposée sur une lame puis observée au microscope.

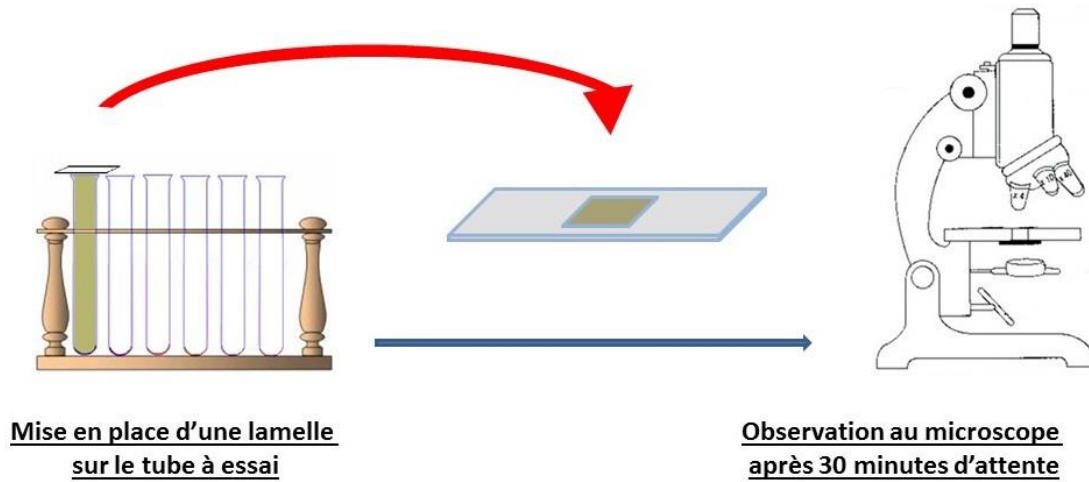


Figure 32 : déroulement de l'étape d'enrichissement

b. Seconde méthode : sédimentation par la méthode de Stoll

i. Préparation de la solution de soude

Cette technique requiert l'utilisation d'une solution de soude décimormale. Cette solution est préparée à la demande, en diluant 4g d'hydroxyde de sodium (NaOH), dans 1L d'eau.

ii. Méthode (figure 32)

Trois grammes de matières fécales sont pesés avec une balance puis sont délités avec un pilon dans un verre à pied à fond conique dans lequel sont ensuite ajoutés 42 ml de solution de soude à 4g/L, avant de mélanger et d'homogénéiser le tout.

Le contenu est versé sur une passoire au-dessus d'un autre verre à pied afin d'éliminer les gros débris végétaux. L'écrasement facilite la filtration et la séparation des œufs de la gangue de matières fécales. Trois filtrations successives sont effectuées. Le prélèvement de 4 gouttes de 15 µl est extemporané, tant que les éléments parasitaires sont encore en suspension.

Pour augmenter la sensibilité de cette méthode, le dénombrement des œufs a été fait sur la surface totale de quatre lamelles (de 22 mm de côté), recouvrant chacune un volume de 0,15 mL de la suspension fécale prélevée : après agitation de la suspension fécale obtenue, 4 prélèvements de 0,15 ml chacun sont réalisés à l'aide d'une pipette, puis déposés sur des lames et recouverts de lamelles.

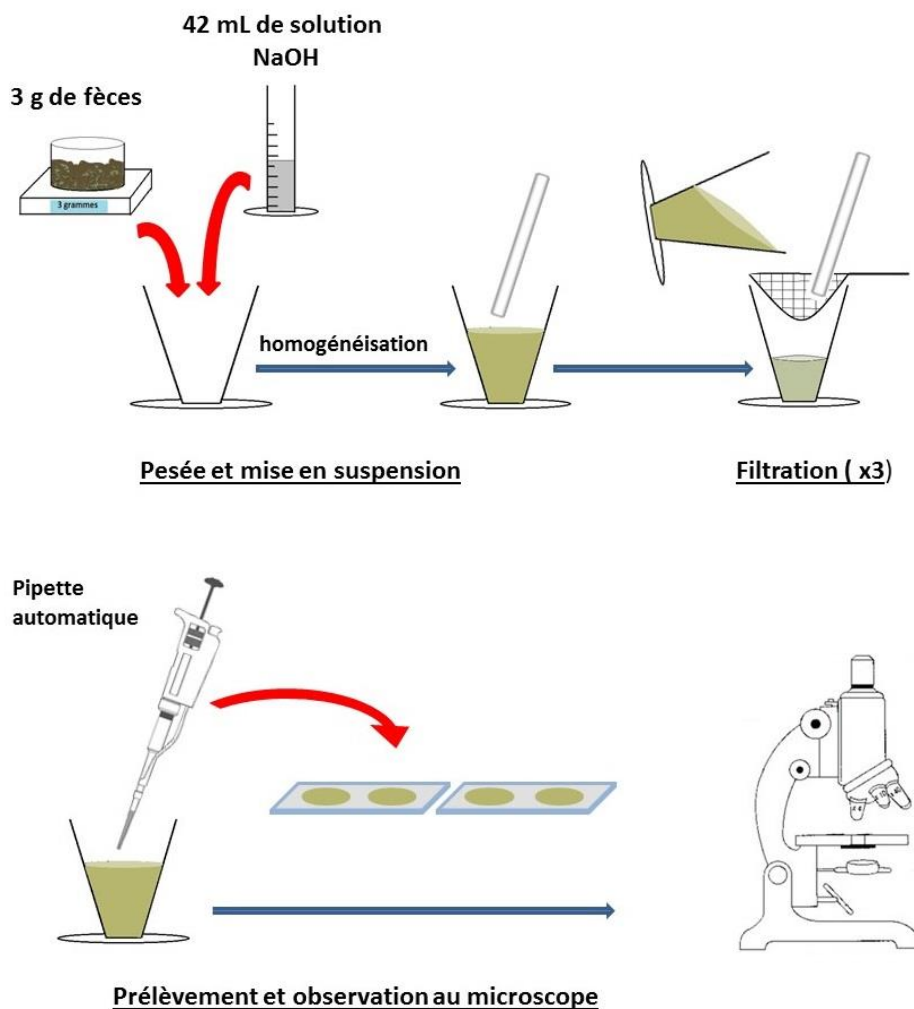


Figure 33 : déroulement de la méthode de Stoll

iii. Lecture des lames et dénombrement des œufs

Les lames sont observées au microscope pour compter les œufs présents, au grossissement $\times 400$. Les quatre lamelles sont entièrement lues.

La prise d'essai de 0,15ml correspond à $1/300^{\text{ème}}$ du volume total de la suspension. Chaque œuf compté correspond donc à 300 œufs pour 3g soit 100 œufs par gramme. Le comptage sur 4 échantillons de la suspension permet d'augmenter la sensibilité à 25 œufs par gramme, ainsi pour chaque œuf trouvé, nous comptons 25 œufs par gramme de matière fécale (opg).

iv. Sédimentation totale

La recherche de parasites est également complétée par la lecture d'une fraction du culot après sédimentation. Cette dernière consiste à laisser reposer la suspension fécale obtenue pendant 30 minutes, puis à prélever à l'aide d'une pipette une prise d'essai de 0,15 mL dans le fond du verre, et de rechercher la présence d'œufs au microscope. Par convention (la sédimentation n'étant pas forcément homogène au fond du verre à pied), la mise en évidence d'un ou de plusieurs œufs dans la sédimentation totale correspond à 12 œufs par gramme de matières fécales.

3. Comparaison des deux méthodes (tableau 3)

Un même échantillon de fèces a été analysé deux fois, avec les deux méthodes de diagnostic coproscopiques envisagées.

Cela nous a donc permis d'effectuer différentes comparaisons. En effet, nous avons pu étudier, sur un aspect pratique, la répétabilité des méthodes, les aspects de mise en œuvre et de lecture des résultats de chacune, mais également leur sensibilité respective en termes de détection d'infestation parasitaire.

Pour le déroulement des expériences, voici les étapes clés :

- Pour chaque échantillon, deux techniques de diagnostic coproscopique
- Pour chaque technique, deux étapes de lecture : une étape de lecture quantitative, et une étape qualitative (après flottation ou sédimentation totale suivant la méthode).

Tableau 3 : déroulement des expériences

Echantillon 1	Peser 2 × 3g de matières fécales	
Méthode 1 : sédimentation de Stoll	Ajout de 42mL de solution NaOH Mélange, filtration Prélèvement de 4 × 0,15mL et dépôt sur des lames	
	Lecture des 4 lamelles (quantitative)	
Méthode 2 : flottation PTS	Ajout de 42mL de solution PTS Mélange, filtration Prélèvement à l'aide d'une pipette et remplissage des 2 chambres de la lame de Mac Master	
	Lecture des réseaux de la lame de Mac Master après 3 minutes (quantitative)	
	Lecture de l'enrichissement de Stoll après avoir laissé reposer la solution 30 min dans le verre à pied (qualitative)	
Echantillon 2	Peser 2 × 3g de matières fécales	
Méthode 1 : sédimentation de Stoll	Ajout de 42mL de solution NaOH Mélange, filtration Prélèvement de 4 × 0,15mL et dépôt sur des lames	
Echantillon 1	Lecture de l'enrichissement de flottation PTS de l' échantillon 1 , 30 min après le dépôt de la solution dans le tube à essai (qualitative)	
Echantillon 2	Lecture des 4 lamelles de l'échantillon 2 (Stoll) (quantitative)	
Méthode 2 : flottation PTS	Ajout de 42mL de solution PTS Mélange, filtration Prélèvement à l'aide d'une pipette et remplissage des 2 chambres de la lame de Mac Master	
	Lecture des réseaux de la lame de Mac Master après 3 minutes (quantitative)	
	Lecture de l'enrichissement de Stoll de l' échantillon 2 après avoir laissé reposer la solution 30 min dans le verre à pied (qualitative)	
Echantillon 3	Peser 2 × 3g de matières fécales	
Méthode 1 : sédimentation de Stoll	Ajout de 42mL de solution NaOH Mélange, filtration Prélèvement de 4 × 0,15mL et dépôt sur des lames	
Echantillon 2	Lecture de l'enrichissement de flottation PTS de l' échantillon 2 , 30 min après le dépôt de la solution dans le tube à essai (qualitative)	
Echantillon 3	Lecture des 4 lamelles de l'échantillon 2 (Stoll) (quantitative)	
Méthode 2 : flottation PTS	Ajout de 42mL de solution PTS Mélange, filtration Prélèvement à l'aide d'une pipette et remplissage des 2 chambres de la lame de Mac Master	
	Lecture des réseaux de la lame de Mac Master après 3 minutes (quantitative)	
	Lecture de l'enrichissement de Stoll de l' échantillon 3 après avoir laissé reposer la solution 30 min dans le verre à pied (qualitative)	

Pour le PTS, après lecture des lames de McMaster et de la lame de flottation totale, la suspension fécale est à chaque fois versée dans un contenant plastique, en vue de sa filtration et d'un recyclage du produit. Le protocole et les tests sont en cours d'essai.

4. Coproscopies de mélange (figure 33)

À la suite d'un travail de thèse mené sur deux ans par M. Bonnefont et A. Canellas (2014) visant à tester l'efficacité d'une méthode de coproscopie de mélange pour identifier les lots de moutons qui nécessitent réellement un traitement anthelminthique, il a été décidé de réaliser, en plus des coproscopies individuelles, des coproscopies de mélange pour quelques lots d'ovins. Il s'agit d'évaluer si l'analyse coproscopique par flottation et utilisant le PTS (et non plus une solution de NaCl à saturation, comme utilisé dans leur thèse) appliquée à des mélanges de matières fécales, est corrélée à la moyenne des valeurs obtenues sur les échantillons pris isolément, afin de valider cette méthode pour la détection des lots à traiter. L'utilisation du PTS permet ainsi de prendre en compte la présence d'infestations par les trématodes.

Une fois les coproscopies individuelles réalisées sur tous les échantillons (toujours selon le même principe, en utilisant les deux méthodes : flottation avec le PTS et sédimentation avec Stoll), des coproscopies de mélanges ont été effectuées. Pour cela, nous avons pesé dans un même récipient 1 gramme de matières fécales de chaque animal (figure 33). Les 15 grammes obtenus ont ensuite été écrasés et mélangés, jusqu'à obtention d'un mélange homogène. Deux coproscopies ont alors été effectuées à partir de ce mélange, en utilisant uniquement la technique de Mac Master modifiée avec le nouveau liquide dense, le PTS.

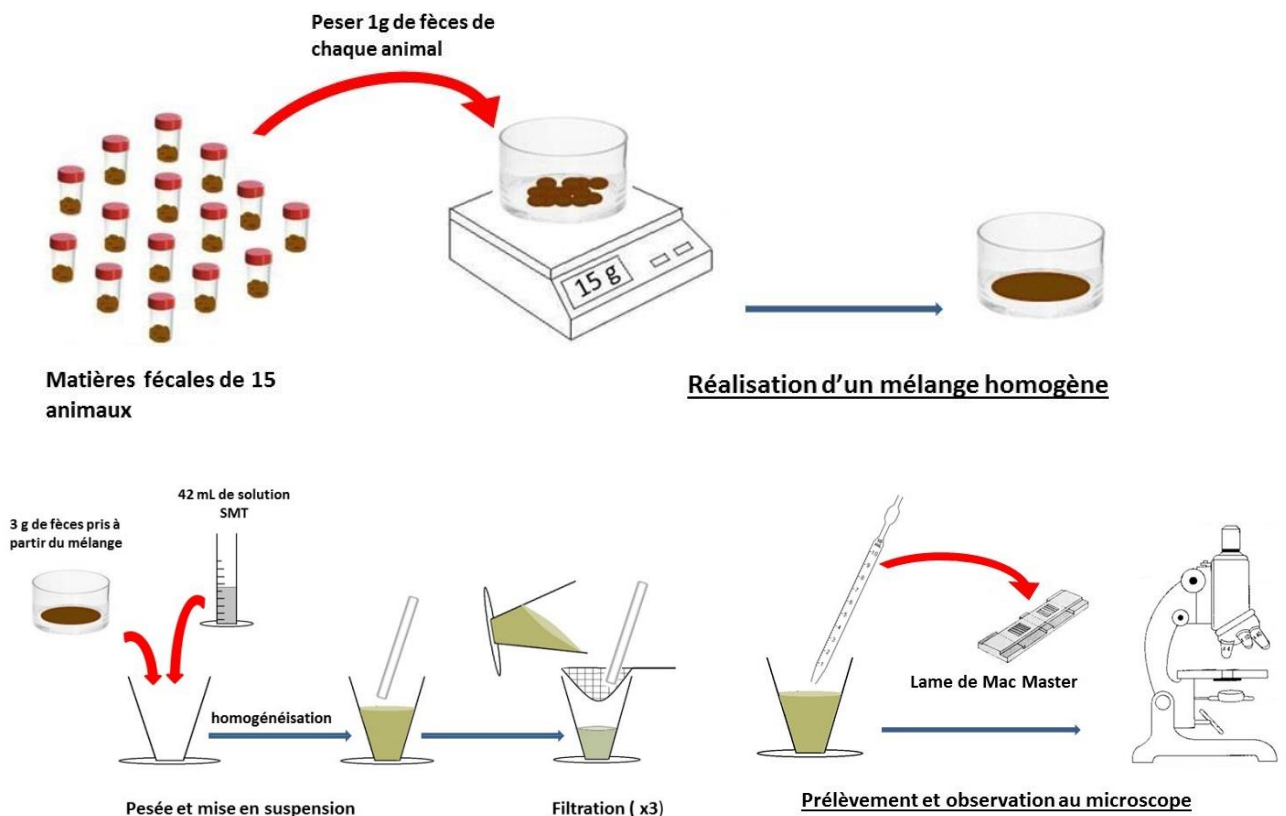


Figure 34 : réalisation des coproscopies de mélange

5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel StatXact® version 10 (Cytel® Software Corporation, Cambridge, Massachusetts, États-Unis) avec un seuil de significativité $p < 0,05$. La comparaison entre les deux méthodes de diagnostic pour les moyennes géométriques d'œufs par gramme (opg) pour chaque espèce parasitaire et pour chaque espèce hôte a été effectuée avec le test exact de permutation. Le coefficient de corrélation de Pearson entre les moyennes géométriques d'opg a été déterminé pour chacune des méthodes, pour chaque espèce parasitaire et chaque espèce hôte, et sa significativité dans leur procédure exacte a été évaluée. La comparaison du nombre d'animaux positifs suivant la méthode et pour chaque espèce parasitaire et pour chaque espèce-hôte a été réalisée avec le test exact de McNemar. Les performances de chacune des méthodes (sensibilité, valeur prédictive négative et pourcentage de mauvaise classification) ont été déterminées à l'aide de l'add-on DAG_Stat (Mackinnon, 2000) dans Excel® 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, États-Unis). Le coefficient Kappa de Cohen (κ) a été utilisé pour calculer le degré d'accord entre la méthode de Stoll et la méthode de flottation au PTS. Il a été évaluée selon les critères suivants: 0.00 = très mauvais, 0.01-0.20 = mauvais, 0.21-0.40 = médiocre, 0.41-0.60 = moyen, 0.61-0.80 = bon, 0.81-1.00 = accord quasi parfait (Everitt, 1989).

Pour étudier l'intérêt de la coproscopie de mélange, les coefficients de variation ont été calculés dans Excel® 2013 pour chacun des 4 lots de 15 ovins testés, provenant de 4 élevages différents. Ils ont été calculés individuellement puis en mélange pour chaque espèce parasitaire détectée. De même, pour chaque parasite, les comparaisons entre les moyennes individuelles d'opg et les moyennes issues des coproscopies de mélange ont été comparées avec le test de permutation dans sa procédure exacte. Le coefficient de corrélation de Pearson entre ces valeurs a également été calculé, ainsi que son seuil de significativité dans sa procédure exacte.

III. Résultats

A. Comparaison des méthodes : flottation au PTS et sédimentation de Stoll

1. Comparaison de l'aspect des œufs de trématodes avec le PTS et avec la méthode de Stoll

a. *Calicophoron daubneyi* (Figure 35)

Les œufs de *Calicophoron daubneyi* sont de grande taille ($80\ \mu\text{m} \times 160\ \mu\text{m}$), ellipsoïdes, à coque mince et lisse, et sont operculés à une extrémité. Avec la méthode de sédimentation de Stoll, ils apparaissent grisâtres à légèrement verdâtres, et leurs pôles inégaux sont bien visibles. Avec la méthode de flottation au PTS, les œufs sont déformés et sont presque translucides.

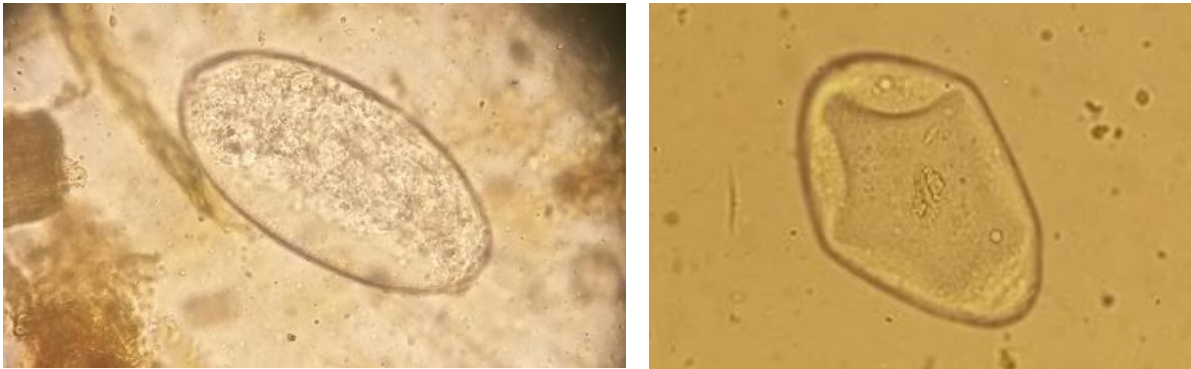


Figure 35 : aspect de l'œuf de *Calicophoron Daubneyi* au microscope ($\times 400$) avec la sédimentation de Stoll (à gauche) et avec la flottation au PTS (à droite)

b. *Fasciola hepatica* (Figure 36)

Les œufs de *Fasciola hepatica* sont ellipsoïdes, de grande taille ($80\ \mu\text{m} \times 140\ \mu\text{m}$), à paroi fine et lisse, et sont operculés à une extrémité. Ils apparaissent marron-jaunâtres avec la méthode de sédimentation de Stoll, et, si la couleur n'est que très peu modifiée avec l'utilisation du PTS, la forme, elle, est altérée (figure 36).



Figure 36 : aspect de l'œuf de *Fasciola hepatica* au microscope ($\times 400$) à la sédimentation de Stoll (à gauche) et avec la flottation au PTS (à droite)

c. *Dicrocoelium lanceolatum* (Figure 37)

Les œufs de *Dicrocoelium lanceolatum* sont de petite taille (40 µm × 25 µm), ellipsoïdes, légèrement asymétriques, et de couleur sombre. Ils ne sont pas déformés avec l'utilisation du liquide dense PTS. Ainsi, leur aspect est identique au microscope lors de la réalisation des deux méthodes : ils apparaissent brun-noirs, et contiennent deux masses germinatives très sombres.



Figure 37 : aspect de l'œuf de *Dicrocoelium lanceolatum* au microscope (×400) quelle que soit la méthode utilisée

Les autres œufs observés au cours de cette étude (œufs de strongles digestifs, trichures, *Moniezia* sp.) ne sont pas déformés lors de l'utilisation de la méthode de flottation utilisant le PTS.

2. Analyse statistique

Au total, 118 échantillons de matières fécales de brebis et 121 de bovins ont été examinés en coproscopie. Dans cette partie, nous avons étudié comparativement, selon la méthode coproscopique utilisée, la prévalence d'infestation, la sensibilité et la valeur prédictive négative, le degré d'accord et le comptage des œufs, ainsi que le taux de mauvaise classification.

a. Prévalence et taux de mauvaise classification

- Ovins (figure 38) :

La prévalence des infections parasitaires par les trématodes est différente selon la méthode utilisée. En effet, les prévalences obtenues avec la sédimentation de Stoll sont systématiquement inférieures à la flottation au PTS : pour *C. daubneyi*, elles sont de 16,1% (19/118) et 29,7% (35/118) respectivement ; pour *D. lanceolatum* de 22% (26/118) et 50,8% (60/118) respectivement ; pour *F. hepatica* de 5,1% (6/118) et 9,3% (11/118) respectivement. Les prévalences des autres infections parasitaires obtenues avec le Stoll et avec le PTS sont respectivement de 52,6% (62/118) et 76,3% (90/118) pour les strongles, de 7,6% (9/118) et 11,9% (14/118) pour *Nematodirus*, de 6,8% (8/118) et 15,3% (18/118) pour les Trichures, et de 1,7% (2/118) et 2,5% (3/118) pour *Moniezia* sp.

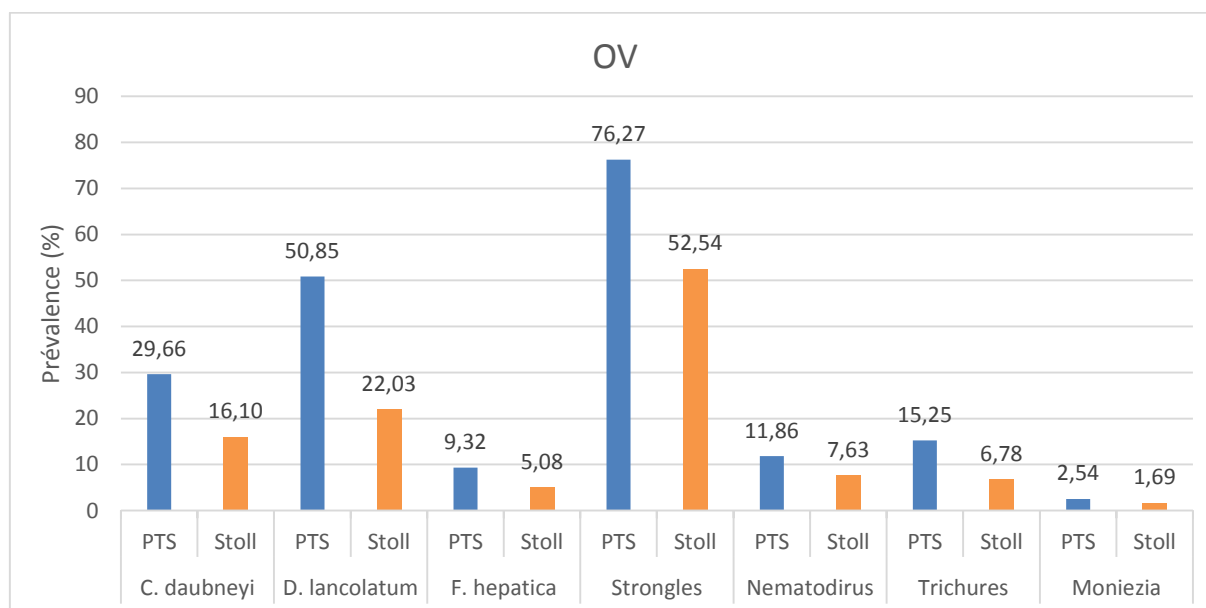


Figure 38 : comparaison des prévalences obtenues avec les différentes méthodes chez les ovins

Le taux de mauvaise classification (c'est-à-dire le nombre d'ovins qui ont été détectés non parasités avec la méthode de Stoll, mais détectés parasités avec la méthode au PTS) est de 13,6% (16/118) pour *C. daubneyi*, de 28,9% (34/118) pour *D. lanceolatum*, de 4,2% (5/118) pour *F. hepatica* et pour *Nematodirus*, de 23,7% (28/118) pour les strongles digestifs, et de 8,5% pour les Trichures.

- Bovins (Figure 39) :

Les prévalences des infections parasitaires par les trématodes obtenues avec la sédimentation de Stoll sont également plus faibles que pour la flottation au PTS : respectivement, elles sont, pour *C. daubneyi* de 72,7% (88/121) et 90,1% (109/121), et pour *D. lanceolatum* de 5,8% (7/121) et 15,7% (19/121). Pour *F. hepatica*, la prévalence est faible, 0,8% (1/121) quelle que soit la méthode utilisée.

Les prévalences des infections par les strongles obtenues avec le Stoll et avec le PTS sont respectivement de 5,8% (7/121) et 26,4% (32/121), et de 0,8% (1/121) et 2,5% (3/121) respectivement pour *Nematodirus*.

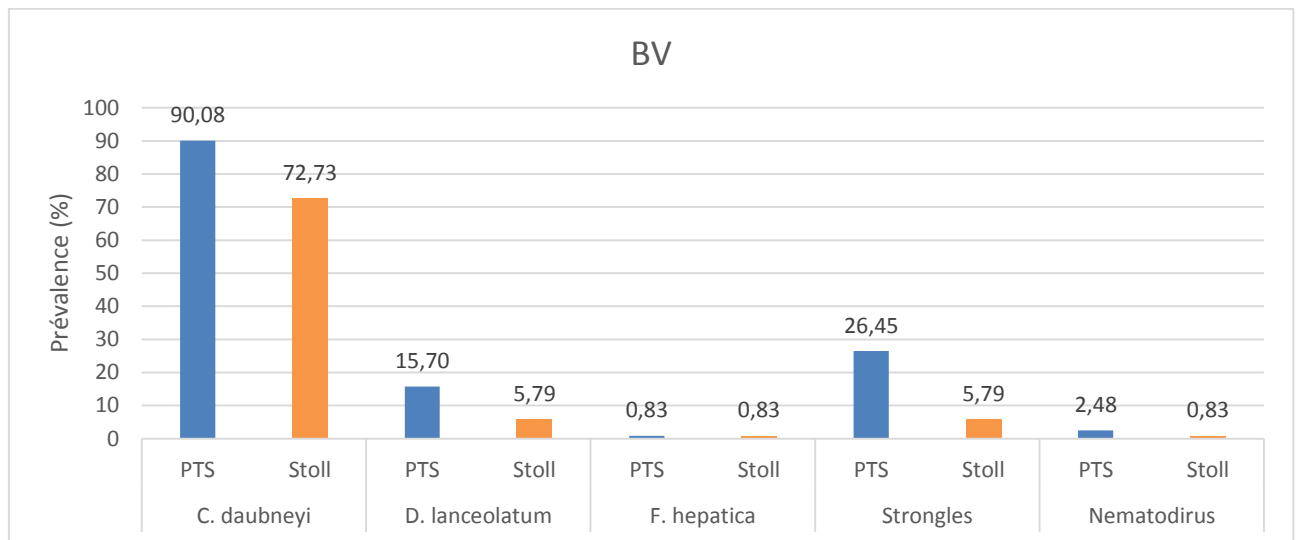


Figure 39 : comparaison des prévalences obtenues avec les différentes méthodes chez les bovins

Le taux de mauvaise classification (c'est-à-dire le nombre de bovins qui ont été détectés non parasités avec la méthode de Stoll, mais détectés parasités avec la méthode au PTS) est de 17,3% (21/121) pour *C. daubneyi*, de 9,9% (12/121) pour *D. lanceolatum*, de 0,8% (1/121) pour *F. hepatica*, de 20,7% (25/121) pour les strongles digestifs, et de 1,6% (2/121) pour *Nematodirus* sp.

b. Agrément

Les calculs ont été effectués à l'aide d'un tableur Excel, du add-on DAG_Stat (Mackinnon 2000), et du logiciel StatXact10. La sensibilité, la valeur prédictive négative de chaque test (sédimentation de Stoll et flottation PTS), le coefficient Kappa de Cohen, le coefficient de corrélation de Pearson (évaluant la corrélation entre les moyennes), ainsi que le test de McNemar ont été déterminés respectivement pour chacune des deux espèces (ovins, bovins) et pour chacun des parasites détectés.

Les concordances entre les résultats obtenus pour chaque espèce cible et pour chaque espèce parasite ont été calculées en utilisant des tableaux de contingence et ont été définies comme étant la proportion d'accord global entre les résultats des deux tests comparés (sédimentation de Stoll et flottation PTS). Le coefficient Kappa de Cohen (κ) a été utilisé pour calculer le degré d'accord (Landis & Koch 1977).

- Ovins (Tableaux 4, 5 et 6) :

Quel que soit le parasite étudié, il y a significativement plus d'œufs mis en évidence avec le PTS qu'avec le Stoll, car la différence entre les moyennes arithmétiques est positive (Tableaux 4, 5 et 6).

Tableau 4 : moyennes et écarts types arithmétiques et géométriques selon la méthode employée pour la détection des œufs de trématodes chez les ovins

	<i>Calicophoron daubneyi</i>		<i>Dicrocoelium lanceolatum</i>		<i>Fasciola hepatica</i>	
	PTS	Stoll	PTS	Stoll	PTS	Stoll
Moyenne arithmétique	42,03	12,28	133,69	7,91	7,88	0,94
Écart type arithmétique	106,91	39,96	251,78	24,65	31,77	4,34
Moyenne géométrique	86,73	52,57	143,56	26,32	62,07	17,32
Écart type géométrique	2,76	2,45	3,21	2,02	2,39	1,49

Pour la détection de *C. daubneyi*, la moyenne arithmétique obtenue avec le PTS est plus de trois fois supérieure à celle obtenue avec la méthode de Stoll. En ce qui concerne *D. lanceolatum*, les moyennes obtenues avec le PTS sont très supérieures à celles obtenues avec le Stoll, plus de quatorze fois supérieure pour la moyenne arithmétique et plus de cinq fois pour la moyenne géométrique. La tendance se confirme pour la détection des œufs de *F. hepatica* : la méthode utilisant le PTS permet de détecter beaucoup plus d'œufs, ainsi la moyenne arithmétique obtenue est plus de 8 fois supérieure à celle obtenue avec le Stoll, et la moyenne géométrique est, elle, triplée.

Tableau 5 : moyennes et écarts types arithmétiques et géométriques selon la méthode employée pour la détection des œufs des autres parasites gastro-intestinaux chez les ovins

	Strongles digestifs		<i>Nematodirus</i>		Trichures		<i>Moniezia sp.</i>	
	PTS	Stoll	PTS	Stoll	PTS	Stoll	PTS	Stoll
Moyenne arithmétique	375,04	80,071	6,14	2,32	20,59	3,49	5,93	0,64
Écart type arithmétique	712,62	169,25	20,50	9,08	74,27	19,05	37,65	5,13
Moyenne géométrique	206,36	83,16	39,65	26,76	85,93	34,59	228,94	35,35
Écart type géométrique	3,98	2,99	2,24	1,74	2,66	2,41	1,26	1,63

Ce tableau confirme le résultat obtenu pour la détection des œufs de trématodes : pour les autres parasites, les moyennes obtenues avec l'utilisation du PTS sont toutes supérieures à celles obtenues avec la méthode de Stoll. La moyenne arithmétique est notamment toujours au moins plus de deux fois supérieure, et va même jusqu'à être plus de 9 fois plus importante (*Moniezia sp.*).

Tableau 6 : test exact de permutation, coefficient de corrélation de Pearson, p-value de McNemar et leur interprétation (S = significatif, N S = non significatif) obtenus avec les résultats des ovins

	Différence des moyennes arithmétiques	Différence des écart-types	Comparaison de moyennes (test exact de permutation)				p-value de McNemar	Interprétation	
			p	Interprétation	Coeff. corrélation de Pearson	p			Interprétation
<i>C. daubneyi</i>	29,75	76,56	< 0.0001	S	0,8387	< 0.0001	S	< 0.0001	S
<i>D. lanceolatum</i>	125,77	242,34	< 0.0001	S	0,4247	0,0022	S	< 0.0001	S
<i>F. hepatica</i>	6,94	29,05	0,0009766	S	0,668	0,0001	S	0.0625	N S
Strongles digestifs	294,97	608,08	< 0.0001	S	0,6911	< 0.0001	S	< 0.0001	S
<i>Nematodirus</i>	3,82	14,61	0,00293	S	0,777	< 0.0001	S	0,0625	N S
Trichures	17,10	58,59	< 0.0001	S	0,8647	< 0.0001	S	0,0019	S

Les résultats du test de permutation sur les moyennes et de la corrélation de Pearson montrent que quel que soit le parasite recherché chez les ovins par les deux techniques, la différence entre les moyennes est significative, et que la corrélation est significativement positive.

En effet, le coefficient de corrélation de Pearson, évaluant la corrélation entre les moyennes arithmétiques obtenues avec les deux tests, est de 0,8387 en ce qui concerne *C. daubneyi* ($\rho < 0,0001$), de 0,4247 ($\rho = 0,0022$) pour *D. lanceolatum*, de 0,668 ($\rho = 0,0001$) pour *F. hepatica*, de 0,6911 ($\rho < 0,0001$) pour les strongles digestifs, de 0.777 ($\rho < 0,0001$) pour *Nematodirus* sp. et de 0,8647 ($\rho < 0,0001$) pour les Trichures, ce qui est significatif au seuil 0,05 (Tableau 6).

La valeur de p de McNemar est inférieure à 0,05 pour ces tous les parasites, sauf pour *F. hepatica* et *Nematodirus* ($< 0,0001$ pour *C. daubneyi*, *D. lanceolatum* et les strongles digestifs, égale à 0,0019 pour les Trichures), soulignant une augmentation significative du nombre d'animaux positifs avec le PTS. Pour *F. hepatica* et *Nematodirus*, la p-value de McNemar est égale à 0,0625, ce qui signifie qu'il n'y a pas pour ces parasites d'augmentation significative du nombre d'animaux positifs entre les deux méthodes (mais peu d'animaux ont été détectés positifs vis-à-vis de ces parasites chez les ovins).

- Bovins (Tableaux 7, 8 et 9) :

De même que chez les ovins, il y a significativement plus d'œufs mis en évidence avec le PST qu'avec le Stoll, quel que soit le parasite étudié. En effet, la différence entre les moyennes arithmétiques est toujours positive (Tableaux 7, 8 et 9).

Tableau 7 : moyennes et écarts types arithmétiques et géométriques selon la méthode employée pour la détection des œufs de trématodes chez les bovins

	<i>Calicophoron daubneyi</i>		<i>Dicrocoelium lanceolatum</i>		<i>Fasciola hepatica</i>	
	PTS	Stoll	PTS	Stoll	PTS	Stoll
Moyenne arithmétique	254,17	90,41	6,65	0,80	0,12	0
Écart type arithmétique	327,32	142,81	18,53	3,43	1,36	0
Moyenne géométrique	138,20	60,13	34,52	13,33	15	
Écart type géométrique	3,72	3,50	1,99	1,32		

Pour la détection de *C. daubneyi*, les moyennes arithmétiques et géométriques obtenues avec le PTS sont plus de deux fois supérieures à celles obtenues avec la méthode de Stoll. En ce qui concerne *D. lanceolatum*, les moyennes obtenues avec le PTS sont également supérieures à celle obtenues avec le Stoll, plus de huit fois supérieure pour la moyenne arithmétique et plus de deux fois pour la moyenne géométrique.

Tableau 8 : moyennes et écarts types arithmétiques et géométriques selon la méthode employée pour la détection des œufs des autres parasites gastro-intestinaux chez les bovins

	Strongles digestifs		<i>Nematodirus</i>	
	PTS	Stoll	PTS	Stoll
Moyenne arithmétique	6,69	2,07	2,60	0,1
Écart type arithmétique	15,13	9,46	19,24	1,09
Moyenne géométrique	20,71	32,29	69,62	12
Écart type géométrique	1,78	1,57	3,78	

En ce qui concerne la détection des œufs de strongles, la moyenne arithmétique obtenue avec le PTS est plus de 3 fois supérieure à celle obtenue avec la méthode de Stoll, mais la moyenne géométrique la plus importante est celle obtenue avec cette dernière méthode (seul cas de figure où la moyenne obtenue est supérieure en Stoll, toutes espèces cibles et espèces parasitaires confondues).

Tableau 9 : test exact de permutation, coefficient de corrélation de Pearson, p-value de McNemar et leur interprétation (S = significatif, N S = non significatif) obtenus avec les résultats des bovins

	Différence des moyennes arithmétiques	Différence des écart-types	Comparaison de moyennes (test exact de permutation)				p-value de McNemar	Interprétation	
			p	Interprétation	Coeff. corrélation de Pearson	p			Interprétation
<i>C. daubneyi</i>	163,7603306	202,7047124	< 0.0001	S	0,9246	< 0.0001	S	< 0.0001	S
<i>D. lanceolatum</i>	5,851239669	17,09320584	< 0.0001	S	0,4962	< 0.0001	S	0,0004	S
Strongles digestifs	4,628099174	13,78654672	< 0.0001	S	0,4484	0,0034	S	0,0001383	S

Les résultats du test de permutation sur les moyennes montrent que quel que soit le parasite recherché chez les bovins par les deux techniques, la différence entre les moyennes est significative.

De plus, le coefficient de corrélation de Pearson, évaluant la corrélation entre les moyennes arithmétiques obtenues avec les deux tests, est de 0,9246 en ce qui concerne *C. daubneyi* ($p < 0,0001$) ce qui signe une corrélation significative et positive entre les deux tests. Il est de 0,4962 pour *D. lanceolatum* ($p < 0,0001$) et de 0,4484 ($p = 0,0034$) pour les strongles digestifs, ce qui est significatif.

La p-value de McNemar est inférieure à 0,05 pour ces trois parasites ($< 0,0001$ pour *C. daubneyi*, égale à 0,0004 pour *D. lanceolatum* et à 0,0001 pour les strongles digestifs), soulignant une augmentation significative du nombre d'animaux positifs avec le PTS.

- Degré d'accord (Tableaux 10 et 11) :

Pour calculer le degré d'accord (Landis & Koch 1977), le coefficient Kappa de Cohen (κ) a été utilisé (Tableaux 10 et 11). Il n'a pas été déterminé pour les parasites pour lesquels nous n'avons pas détecté assez d'œufs (c'est à dire, chez les bovins, pour *F. hepatica* et *Nematodirus* sp, et chez les ovins, pour *Moniezia* sp).

Chez les bovins, le degré d'accord est médiocre (compris entre 0,21 et 0,40) en ce qui concerne les strongles digestifs, et moyen (compris entre 0,41 et 0,60) pour *C. daubneyi* et *D. lanceolatum*. Chez les ovins, il est bon (compris entre 0,81 et 0,80) pour *C. daubneyi*, *F. hepatica* et *Nematodirus* sp, et moyen pour *D. lanceolatum*, les strongles digestifs et les trichures.

Il y a une augmentation significative de la fréquence des animaux détectés positifs avec le PTS par rapport au Stoll (Tableaux 38 et 39), donc il est attendu que le degré d'accord entre les deux méthodes ne soit pas bon voire même médiocre. Ce degré d'accord est évalué bon pour les parasites qui n'ont pas été détectés en grand nombre, et ce quelle que soit la méthode utilisée.

Tableau 10 : détermination du degré d'accord grâce au coefficient Kappa de Cohen (κ) chez les ovins

			PTS			κ (p)	Interprétation du κ (Everitt 1989)
			Positifs	Négatifs	Total		
<i>Calicophoron daubneyi</i>	Stoll	Positifs				0,62 (<0.0001)	Bon
		Négatifs	19	0	19		
		Total	16	83	99		
			35	83	118		
<i>Dicrocoelium lanceolatum</i>	Stoll	Positifs	26	0	26	0,43 (<0.0001)	Moyen
		Négatifs	34	58	92		
		Total	60	58	118		
<i>Fasciola hepatica</i>	Stoll	Positifs	6	0	6	0,68 (<0.0001)	Bon
		Négatifs	5	107	112		
		Total	11	107	118		
Strongles digestifs	Stoll	Positifs	62	0	62	0,51 (<0.0001)	Moyen
		Négatifs	28	28	56		
		Total	90	28	118		
<i>Nematodirus</i>	Stoll	Positifs	9	0	9	0,76 (<0.0001)	Bon
		Négatifs	5	104	109		
		Total	14	104	118		
Trichuris spp	Stoll	Positifs	8	0	8	0,57 (<0.0001)	Moyen
		Négatifs	10	100	110		
		Total	18	100	118		
<i>Moniezia</i> spp	Stoll	Positifs	2	0	2		
		Négatifs	1	115	116		
		Total	3	115	118		

Tableau 11 : détermination du degré d'accord grâce au coefficient Kappa de Cohen (κ) chez les bovins

			PTS			κ (p)	Interprétation du κ (Everitt 1989)
			Positifs	Négatifs	Total		
<i>Calicophoron daubneyi</i>	Stoll	Positifs	88	0	88	0,45 (<0.0001)	Moyen
		Négatifs	21	12	33		
		Total	109	12	121		
<i>Dicrocoelium lanceolatum</i>	Stoll	Positifs	7	0	7	0,5 (<0.0001)	Moyen
		Négatifs	12	102	114		
		Total	19	102	121		
<i>Fasciola hepatica</i>	Stoll	Positifs	0	0	0		
		Négatifs	1	120	121		
		Total	1	120	121		
Strongles digestifs	Stoll	Positifs	7	0	7	0,29 (<0.0001)	Médiocre
		Négatifs	25	89	114		
		Total	32	89	121		
<i>Nematodirus</i>	Stoll	Positifs	1	0	1		
		Négatifs	2	118	120		
		Total	3	118	121		

c. Comptage des œufs et classification

- Comptage des œufs (figures 40 et 41) :

Pour le comptage des œufs, la moyenne géométrique a été utilisée. Seules les données des animaux positifs sont alors utilisées pour chaque espèce parasitaire.

Pour *C. daubneyi*, le nombre moyen d'œufs par gramme (opg) est de 86,7 en flottation PTS contre 52,6 en sédimentation de Stoll chez les ovins, et de 138,2 (PTS) contre 60,1 (Stoll) chez les bovins.

Pour *D. lanceolatum*, nous avons détecté en moyenne 143,5 opg avec le PTS contre 26,3 opg avec le Stoll chez les ovins, et 34,5 opg (PTS) contre 13,3 opg (Stoll) chez les bovins.

Chez les ovins, le nombre moyen d'œufs de *F. hepatica* détectés avec le PTS est de 62,1 opg avec le PTS contre 17,3 avec le Stoll.

L'écart entre les moyennes est également marqué en ce qui concerne le nombre d'opg des strongles digestifs : alors que la moyenne chez les ovins est de 206,4 opg avec la flottation PTS, elle est de 83,2 opg avec la sédimentation de Stoll. Chez les bovins, elle est de 20,7 opg avec le PTS contre 32,3 opg avec le Stoll. Il s'agit d'ailleurs du seul cas de figure où la moyenne obtenue avec la sédimentation de Stoll est supérieure à la moyenne obtenue avec la flottation au PTS.

Comme le nombre d'animaux positifs entre les deux méthodes n'est pas le même, il n'y a pas eu de tests statistiques effectués pour comparer la significativité des différences de moyennes géométriques d'opg entre celles-ci pour les différentes espèces parasitaires.

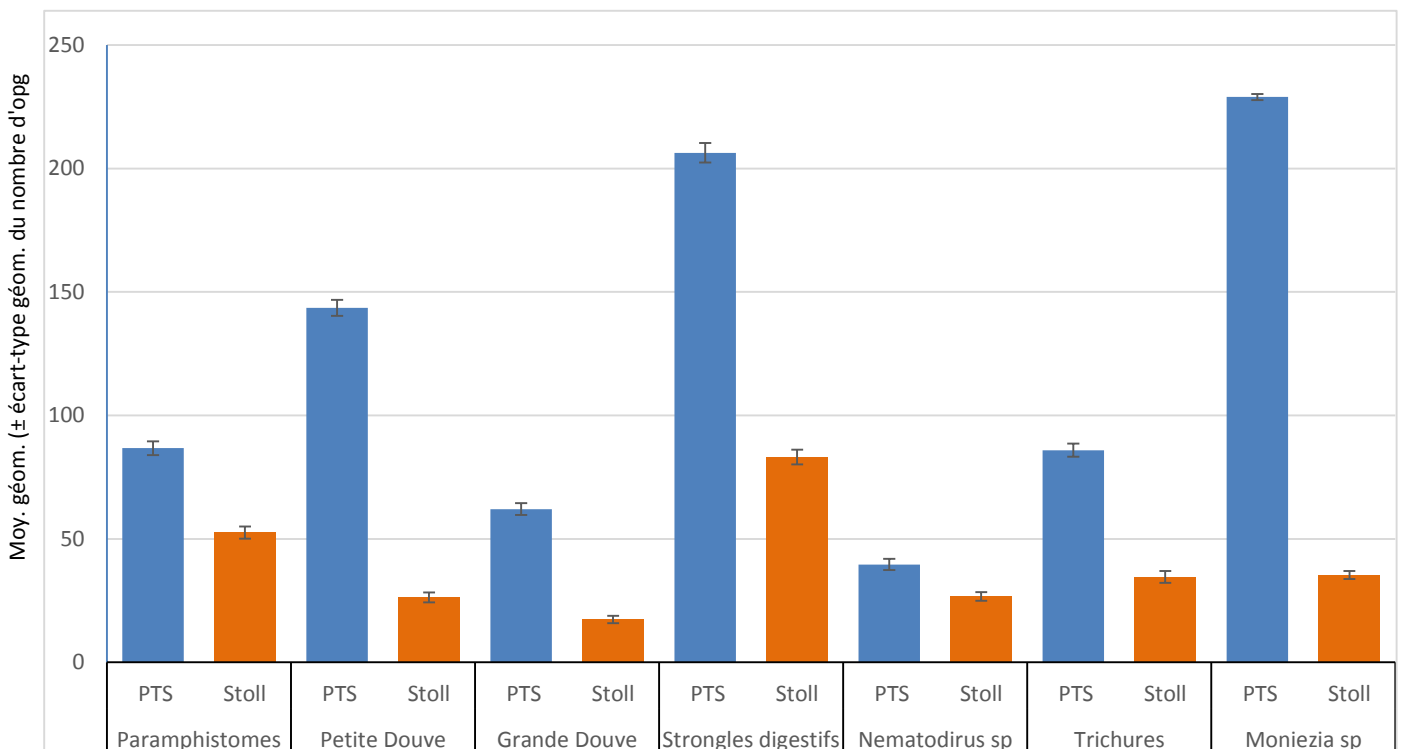


Figure 40 : moyennes géométriques (± écarts-types géométriques) du nombre d'opg des différentes espèces de parasites gastro-intestinaux déterminées par les deux méthodes (PTS et Stoll) des ovins infestés

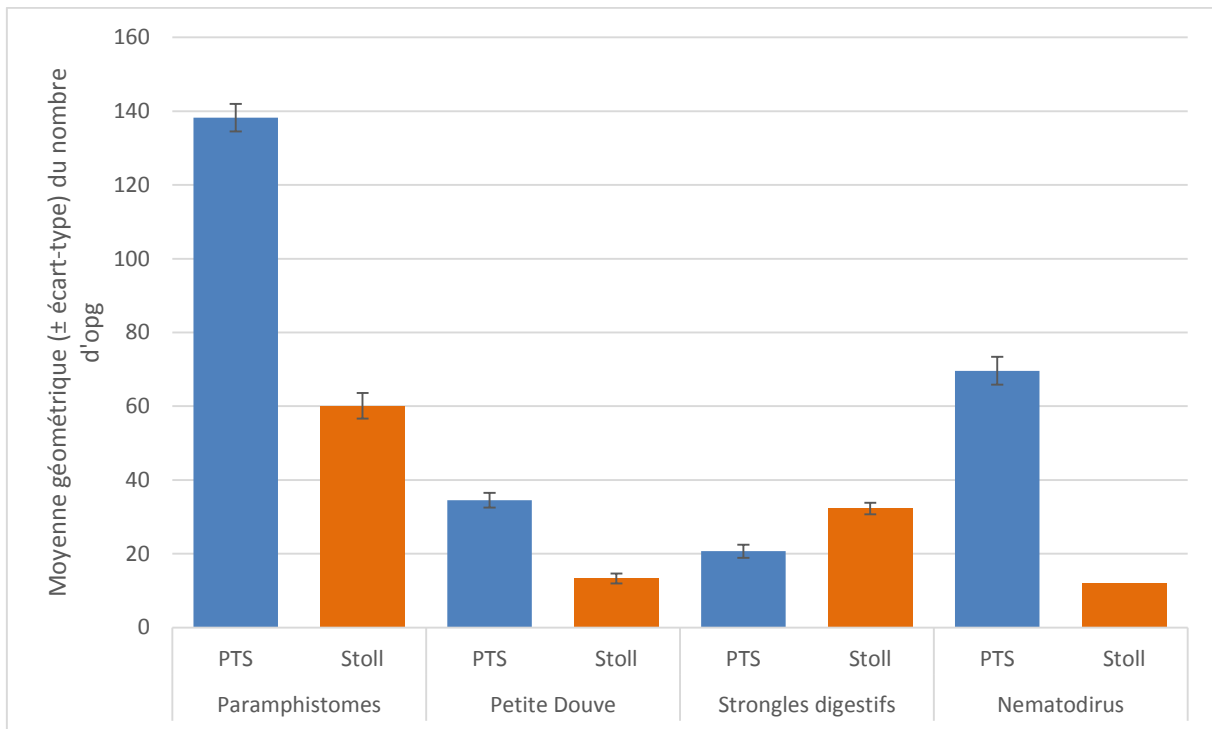


Figure 41 : moyennes géométriques (\pm écarts-types géométriques) du nombre d'opg des différentes espèces de parasites gastro-intestinaux déterminées par les deux méthodes (PTS et Stoll) des bovins infestés

- Taux de mauvaise classification :

Les animaux ont été répartis par classes, selon leur niveau d'infestation détecté avec chacune des méthodes (flottation au PTS et sédimentation de Stoll). Des tableaux croisés dynamiques ont été réalisés grâce à un tableur Excel, permettant ainsi de mettre en évidence les animaux mal classés par les différentes méthodes dans les tableaux suivants (Tableaux 12 à 19).

Ces déterminations d'erreurs de classification sont très importantes, notamment dans le cas d'erreurs avec plus de 2 classes d'écart par rapport à l'autre méthode. En effet, d'un point de vue pratique, cela est très gênant dans le cas où un animal est classé par exemple non infesté par le Stoll, alors qu'il est classé entre 200 et 500 opg par le PTS (voir le tableau Ovins, *C. daubneyi*) : cet animal contamine fortement les pâtures, mais ne sera pas traité si d'après les résultats obtenus avec la méthode de sédimentation de Stoll.

Tableau 12 : légende des couleurs des tableaux de détermination d'erreurs de classification

	Concordance entre les résultats obtenus avec le PTS et le Stoll
	Erreur du PTS qui n'a pas classé l'animal dans la bonne case
	Erreur du Stoll qui n'a pas classé l'animal dans la bonne case
	Erreur du Stoll avec plus de 2 cases d'écart par rapport au LST

Ovins :

- *C. daubneyi* :

Tableau 13 : détermination d'erreurs de classification des œufs de *C. daubneyi* chez les ovins

		Stoll								
	CLASSE	0]0 a 15]]15 a 50]]50 a 100]]100 a 200]]200 a 500]]500 a 1000]]1000	Total
PTS	0	82	1							83
]0 a 15]	3	1							4
]15 a 50]	11		3						14
]50 a 100]	1		3						4
]100 a 200]	1		2	3					6
]200 a 500]	1		1	2	2				6
]500 a 1000]						1			1
]1000									
	Total	99	2	9	5	2	1			118

Ainsi, ce tableau nous indique que la technique de flottation au PTS sous-estime de 0.8% (1/118) le nombre d'infestations par *C. daubneyi* chez les ovins, là où la sédimentation de Stoll le sous-estime de 26.3% (31/118), ce qui est un taux plus de 30 fois supérieur. De plus, la méthode de Stoll sous-estime avec plus de deux classes d'écart dans 12.9% (4/31) des cas.

- *D. lanceolatum* :

Tableau 14 : détermination d'erreurs de classification des œufs de *D. lanceolatum* chez les ovins

		Stoll								
	CLASSE	0]0 a 15]]15 a 50]]50 a 100]]100 a 200]]200 a 500]]500 a 1000]]1000	Total
PTS	0	58								58
]0 a 15]	5								5
]15 a 50]	8	2	3						13
]50 a 100]	5	3	2						10
]100 a 200]	6	1	4						11
]200 a 500]	4	1	5	1					11
]500 a 1000]	4		2	1		1			8
]1000	2								2
	Total	92	7	16	2		1			118

La méthode de flottation au PTS ne sous-estime aucune infestation par *D. lanceolatum* chez les ovins, alors que la méthode de Stoll engendre une mauvaise classification de 48,3% (57/118) des animaux, dont 54.4% (31/57) avec plus de deux classes d'écart.

- *F. hepatica* :

Tableau 15 : détermination d'erreurs de classification des œufs de *F. hepatica* chez les ovins

	CLASSE	Stoll								Total
		0]0 a 15]]15 a 50]]50 a 100]]100 a 200]]200 a 500]]500 a 1000]]1000	
PTS	0	107								107
]0 a 15]	2								2
]15 a 50]	2		2						4
]50 a 100]	1	2							3
]100 a 200]			1						1
]200 a 500]		1							1
]500 a 1000]									
]1000									
Total		112	3	3						118

Là encore, aucune mauvaise classification n'est à déplorer avec le PTS, contrairement à la méthode de Stoll qui sous-estime 7,6% (9/118) des infestations dues à *F. hepatica* chez les ovins, dont 22.2% (2/9) avec plus de deux classes d'écart avec le PTS.

- Strongles digestifs :

Tableau 16 : détermination d'erreurs de classification des œufs de strongles digestifs chez les ovins

	CLASSE	Stoll								Total
		0]0 a 15]]15 a 50]]50 a 100]]100 a 200]]200 a 500]]500 a 1000]]1000	
PTS	0	27			1					28
]0 a 15]	6		1						7
]15 a 50]	9	1	4	1					15
]50 a 100]	3	1	5	1					10
]100 a 200]	4	2	5	3					14
]200 a 500]	1		6	5	5	1			18
]500 a 1000]	3			2	6	1	1		13
]1000	3				2	5	2	1	13
Total		56	4	21	13	13	7	3	1	118

Pour la détection des œufs de strongles digestifs des ovins, la méthode de flottation au PTS sous-estime 2,5% des cas (3/118), ce qui est infime comparé à la sous-estimation engendrée par l'utilisation de la méthode de Stoll : cette dernière est de plus de 25 fois supérieure, elle est de 67,8% (80/118), dont 32,5% (26/80) avec plus de deux classes d'écart.

Les prévalences d'infestations par *Nematodirus* sp., par les trichures, et par *Moniezia* sp. n'étant pas assez élevées chez les ovins, les tableaux de détermination d'erreurs de classe concernant ces infestations parasitaires ne sont pas significatifs et ne nous permettent pas d'obtenir d'informations statistiques, donc nous avons décidé de ne pas les présenter ici.

Bovins :

- *C. daubneyi* :

Tableau 17 : détermination d'erreurs de classification des œufs de *C. daubneyi* chez les bovins

	CLASSE	Stoll								Total
		0]0 a 15]]15 a 50]]50 a 100]]100 a 200]]200 a 500]]500 a 1000]]1000	
PTS	0	12								12
]0 a 15]	13	4							17
]15 a 50]	7	6	1	1					15
]50 a 100]		5	10	1					16
]100 a 200]	1	5	11	2	1				20
]200 a 500]			3	7	12	2			24
]500 a 1000]				1	2	8	1		12
]1000						3	2		5
	Total	33	20	25	12	15	13	3		121

Ce tableau indique que la technique de flottation au PTS sous-estime de 0.8% (1/121) le nombre d'infestations par *C. daubneyi* chez les bovins, là où le taux de sous-estimation de la méthode de Stoll est 100 fois supérieur : il est de 81% (98/121), et avec plus de deux classes d'écart dans 10,2% (10/98) des cas de mauvaise classification.

- *D. lanceolatum* :

Tableau 18 : détermination d'erreurs de classification des œufs de *D. lanceolatum* chez les bovins

	CLASSE	Stoll								Total
		0]0 a 15]]15 a 50]]50 a 100]]100 a 200]]200 a 500]]500 a 1000]]1000	
PTS	0	102								102
]0 a 15]	6	1							7
]15 a 50]	4	5	1						10
]50 a 100]	2								2
]100 a 200]									
]200 a 500]									
]500 a 1000]									
]1000									
	Total	114	6	1						121

Pour la détection des infestations dues à *D. lanceolatum* chez les bovins, aucune mauvaise classification n'est à déplorer avec la méthode utilisant le PTS, contrairement à la méthode de Stoll qui sous-estime 14% (17/121) des infestations, dont 11,7% (2/17) avec plus de deux classes d'écart avec le PTS.

- Strongles digestifs :

Tableau 19 : détermination d'erreurs de classification des œufs de strongles digestifs chez les bovins

	CLASSE	Stoll								Total
		0]0 a 15]]15 a 50]]50 a 100]]100 a 200]]200 a 500]]500 a 1000]]1000	
PTS	0	88		1						89
]0 a 15]	21		2	1					24
]15 a 50]	5		2						7
]50 a 100]			1						1
]100 a 200]									
]200 a 500]									
]500 a 1000]									
]1000									
	Total	114		6	1					121

Pour la détection des œufs de strongles digestifs des bovins, la méthode de flottation au PTS sous-estime 3,3% des cas (4/121), ce qui est là encore très inférieur à la sous-estimation engendrée par l'utilisation de la méthode de Stoll. En effet, cette dernière est de 22,3% (27/121).

Les prévalences d'infestations par *Nematodirus* sp et par *F. hepatica* n'étaient pas assez élevées chez les bovins pour obtenir des tableaux de détermination d'erreurs de classe significatifs nous permettant d'obtenir des informations statistiques pertinentes, donc nous avons décidé de ne pas les présenter ici.

d. Sensibilité et valeur prédictive négative (tableaux 20 et 21)

La performance des méthodes (flottation au PTS et sédimentation de Stoll) a été déterminée en émettant l'hypothèse que les résultats combinés des deux techniques nous donnaient une estimation de la prévalence la plus proche possible de la réalité des animaux étudiés. Les sensibilités et valeurs prédictives négatives calculées sont montrées dans les tableaux 20 et 21.

La méthode de flottation au PTS révèle une sensibilité et une valeur prédictive négative significativement supérieures à la méthode de sédimentation de Stoll.

La sensibilité d'une méthode est le pourcentage d'animaux parasités dont le résultat de la coproscopie effectuée avec cette méthode est positif.

Elle est de 100% pour la méthode de flottation au PTS, alors qu'elle est significativement inférieure pour la méthode de Stoll, quelle que soit l'espèce cible étudiée, et quelle que soit l'espèce parasite envisagée (tableaux 20 et 21). Par exemple, dans le tableau 20, nous voyons que la sensibilité de la méthode de Stoll pour la détection des œufs de *C. daubneyi* chez les ovins est de 54,29%. Cela veut dire que 45,71% ($100 - 54,29$) des animaux parasités par *C. daubneyi* ont eu un résultat de coproscopie négatif.

La valeur prédictive négative (VPN) est par définition la probabilité que la condition ne soit pas présente lorsque le test est négatif. C'est-à-dire, la probabilité que l'animal ne soit pas parasité lorsque le résultat de la coproscopie est négatif.

La VPN est égale à 100% pour la méthode de flottation au PTS. Les valeurs de VPN calculées pour la méthode de Stoll sont très intéressantes, car elles permettent de mettre en évidence le nombre d'animaux potentiellement parasités bien qu'ayant eu un résultat de coproscopie négatif. Par exemple, dans le tableau 20, nous voyons que la VPN de la méthode de Stoll pour la détection des œufs de *C. daubneyi* chez les ovins est de 83,84%, donc 16,16% des animaux ayant eu une coproscopie négative peuvent en fait être parasités par *C. daubneyi*.

Tableau 20 : sensibilité et valeur prédictive négative (VPN) et les intervalles de confiance à 95% (IC) des méthodes de flottation au PTS et de sédimentation de Stoll pour la détection des parasites gastro-intestinaux des ovins

		Sensibilité	IC à 95%	VPN	IC à 95%
<i>C. daubneyi</i>	PTS	100	0,8235-1	100	0,9565-1
	Stoll	54,29	0,3665-0,7117	83,84	0,75-0,90
<i>D. lanceolatum</i>	PTS	100	0,8677-1	100	0,9384-1
	Stoll	43,33	0,3059-0,5676	63,04	0,52-0,73
<i>F. hepatica</i>	PTS	100	0,5407-1	100	0,9661-1
	Stoll	54,55	0,2338-0,8325	95,54	0,89-0,98
Strongles	PTS	100	0,9422-1	100	0,8766-1
	Stoll	68,89	0,5826-0,7823	50	0,36-0,64
Nematodirus	PTS	100	0,6637-1	100	0,9652-1
	Stoll	64,29	0,3514-0,8724	95,41	0,90-0,98
Trichures	PTS	100	0,6306-1	100	0,96-1
	Stoll	44,44	0,2153-0,6924	90,91	0,84-0,96
<i>Moniezia</i>	PTS	100	0,1581-1	100	0,97-1
	Stoll	66,67	0,0943-0,9916	99,14	0,95-0,99

Chez les ovins, la sensibilité de la méthode de Stoll dans la détection des infestations par *C. daubneyi*, *F. hepatica*, les strongles, *Nematodirus* sp et *Moniezia* sp est moyenne (supérieure à 50%). Elle est très mauvaise dans la détection des œufs de trichures et de *D. lanceolatum* (inférieure à 50%).

La valeur prédictive négative de la méthode de Stoll est très bonne pour la détection des œufs de *Moniezia* sp., de trichures, de *Nematodirus* sp, et de *F. hepatica*., c'est-à-dire que cette méthode est très valable pour la détection des animaux négatifs, et elle est moyenne pour la détection des œufs de paramphistomes, de Petite Douve, et des strongles.

- Bovins :

Tableau 21 : sensibilité et valeur prédictive négative (VPN) et les intervalles de confiance à 95% (IC) des méthodes de flottation au PTS et de sédimentation de Stoll pour la détection des parasites gastro-intestinaux des bovins

		Sensibilité	IC à 95%	VPN	IC à 95%
<i>C. daubneyi</i>	PTS	100	0,9589-1	100	0,73-1
	Stoll	80,73	0,7207-0,8766	36,36	0,20-0,55
<i>D. lanceolatum</i>	PTS	100	0,5904-1	100	0,96-1
	Stoll	36,84	0,1629-0,6164	89,47	0,82-0,94
<i>F. hepatica</i>	PTS	100		100	0,97-1
	Stoll	0		99,17	0,95-0,99
Strongles	PTS	100	0,5904-1	100	0,96-1
	Stoll	21,88	0,0928-0,3997	78,07	0,69-0,85
<i>Nematodirus</i>	PTS	100	0,0250-1	100	0,97-1
	Stoll	33,33	0,0084-0,9057	98,33	0,94-0,99

Chez les bovins, la sensibilité de la méthode de Stoll pour la détection des infestations par *C. daubneyi* est moyenne, et elle est très mauvaise pour la détection des œufs des autres parasites.

Sa valeur prédictive négative est très bonne pour la détection des œufs de *Nematodirus* sp, et de *F. hepatica*., elle est moyenne pour la détection des œufs de petite douve et des strongles, et très mauvaise pour les œufs de paramphistomes.

B. Corrélation entre les coproscopies de mélange et les coproscopies individuelles

Dans les tableaux suivants, il s'agit d'évaluer si l'analyse coproscopique par flottation utilisant le PTS appliquée à des mélanges de matières fécales est corrélée à la moyenne des valeurs obtenues sur les échantillons pris isolément, afin de valider cette méthode pour la détection des lots à traiter.

Au total, nous avons réalisé ces coproscopies de mélange pour 4 troupeaux ovins du Sud-Ouest (notés T1 à T4), chacun étant constitué de 15 échantillons individuels de fèces, et nous avons déterminé au sein de ces troupeaux d'une part la moyenne des résultats des coproscopies individuelles (noté indiv dans les tableaux), et d'autre part la moyenne des résultats des deux coproscopies de mélange (noté mel).

Nous avons choisi d'étudier cette corrélation en fonction de l'espèce parasitaire recherchée.

- *C. daubneyi* :

Tableau 22 : comparaison des moyennes individuelles et des moyennes des mélanges (en opg) dans la détection d'œufs de *C. daubneyi*

	indiv	mel	Différence
T1	6,67	0	6,67
T2	3,33	0	3,33
T3	3,33	0	3,33
T4	123,33	75	48,33

Ainsi, la détection de troupeaux positifs (car positifs en coproscopies individuelles) est positive en mélange dans 25% des cas (1/4).

Le test de permutation sur les moyennes donne un résultat de p égal à 0,125 ce qui ne représente pas une différence significative, mais cela est à mettre en regard avec les niveaux d'infestations par *C. daubneyi*, qui sont très bas.

Le R de Pearson est de 0,9996 (p=0,25), cela signifie que la corrélation n'est pas significativement positive entre les deux techniques.

- *D. lanceolatum* :

Tableau 23 : comparaison des moyennes individuelles et des moyennes des mélanges (en opg) dans la détection d'œufs de *D. lanceolatum*

	indiv	mel	Différence
T1	87,67	50,00	37,67
T2	102,00	57,50	44,50
T3	6,67	0,00	6,67
T4	546,67	850,00	-303,33

Nous remarquons dans ce tableau que la moyenne des mélanges est supérieure à la moyenne des coproscopies individuelles dans le troupeau 4, donc plus d'œufs ont été détectés en mélange dans ce troupeau. De plus, le taux de détection positive en mélange de troupeaux positifs est de 75% (3/4) en ce qui concerne la petite douve.

Le test de permutation sur les moyennes donne un résultat de p égal à 1 ce qui ne représente pas une différence significative.

Le R de Pearson est de 0,9939 (p=0,0417), cela signe une corrélation significativement positive entre les deux techniques.

- *F. hepatica* :

Tableau 24 : comparaison des moyennes individuelles et des moyennes des mélanges (en opg) dans la détection d'œufs de *F. hepatica*

	indiv	mel	Différence
T1	44,33	7,50	36,83
T2	13,33	0,00	13,33
T3	0,00	0,00	0,00
T4	3,33	0,00	3,33

Le taux de détection positive en mélange de troupeaux positifs est de 33% (1/3) en ce qui concerne la grande douve.

Ni le test de permutation sur les moyennes ($p=0,25$), ni le test de Pearson ($R=0,9599$, $p=0,25$) ne donnent de résultats significatifs : il n'y a donc pas de différence significative entre les moyennes (mais là encore les niveaux d'infestations sont très bas), et il n'y a pas de corrélation significativement positive entre les deux techniques.

- Strongles digestifs :

Tableau 25 : comparaison des moyennes individuelles et des moyennes des mélanges (en opg) dans la détection d'œufs de strongles digestifs

	indiv	mel	Différence
T1	504,33	450,00	54,33
T2	543,33	450,00	93,33
T3	175,33	225,00	-49,67
T4	1153,33	1600,00	-446,67

Nous avons détecté plus d'œufs dans les mélanges que dans les coproscopies individuelles pour les troupeaux 3 et 4. En ce qui concerne les strongles, le taux de détection positive en mélange de troupeaux positifs est de 100% (4/4).

Le test de permutation sur les moyennes ($p=0,75$) montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les moyennes.

Le R de Pearson (égal à 0,9674, $p=0,0833$), montre une corrélation positive entre les deux techniques, mais non significative.

En synthèse, nous remarquons que le mélange des fèces engendre dans la plupart des cas une sous-estimation de degré d'infestation parasitaire. Nous notons cependant, d'après ces résultats, que les coproscopies de mélange semblent utilisables pour détecter une infestation par les strongles et par la petite douve, mais les seuils de sensibilité demeurent à définir.

Pour chacun des quatre troupeaux, deux mesures sur le mélange des fèces ont été réalisées (tableau 26). Le taux de discordance entre les résultats des mélanges a été évalué.

Tableau 26 : comparaison des deux mélanges répétés par troupeau (T1 à T4) et par espèce parasitaire

		<i>C. daubneyi</i>	<i>D. lanceolatum</i>	<i>F. hepatica</i>	Strongles dig.
T1	Mel 1	0	0	0	450
	Mel 2	0	100	15	450
T2	Mel 1	0	100	0	550
	Mel 2	0	15	0	350
T3	Mel 1	0	0	0	200
	Mel 2	0	0	0	250
T4	Mel 1	50	800	0	1350
	Mel 2	100	900	0	1850
Discordance (en termes de fréquence)		0	0,25	0,25	0

En termes d'élevages positifs ou négatifs, dans deux cas (un pour la Petite Douve et un pour la Grande Douve) le résultat est discordant (sur un mélange le résultat est positif, et sur l'autre le résultat est négatif).

Le taux de discordance entre les mélanges est nul en ce qui concerne la détection des paramphistomes et des strongles digestifs (les deux mélanges sont à chaque fois en accord : positifs tous deux ou négatifs), et est de 25% (1/4) pour la détection de la Petite et la Grande Douve.

Le coefficient de variation (CV) est le rapport de l'écart-type à la moyenne. Ainsi, plus la valeur du coefficient de variation est élevée, plus la dispersion autour de la moyenne est grande. Il est exprimé en pourcentage, et permet la comparaison de distributions de valeurs. Il a été déterminé à partir des données obtenues pour les 2 répétitions de chaque mélange de chacun des troupeaux (tableau 27).

Tableau 27 : calcul des coefficients de variation de mélange (en %)

		<i>C. daubneyi</i>	<i>D. lanceolatum</i>	<i>F. hepatica</i>	Strongles dig.
T1	Écart-type	0,00	70,71	10,61	0,00
	Moyenne arithmétique	0,00	50,00	7,50	450,00
	CV		141,42	141,42	0,00
T2	Écart-type	0,00	60,10	0,00	141,42
	Moyenne	0,00	57,50	0,00	450,00
	CV		104,53		31,43
T3	Écart-type	0,00	0,00	0,00	35,36
	Moyenne arithmétique	0,00	0,00	0,00	225,00
	CV				15,71
T4	Écart-type	35,36	70,71	0,00	353,55
	Moyenne arithmétique	75,00	850,00	0,00	1600,00
	CV	47,14	8,32		22,10

Ce tableau montre que les coefficients de variation sont très élevés dans le cas des très faibles infestations (*D. lanceolatum*, *F. hepatica*), c'est-à-dire que les valeurs sont très dispersées autour de la moyenne.

Lorsque les résultats en opg sont supérieurs à 100, le CV entre les deux mélanges est raisonnable (de 8.32 à 31.43%), signant une dispersion des valeurs peu importante.

Il est cependant à noter que ces résultats sont indicatifs, et qu'il faudrait les répéter plusieurs fois (sur plus d'élevages, et avec des taux d'excrétion plus importants) pour confirmer ces conclusions.

C. Comparaison de la mise en pratique des différentes techniques
1. Comparaison selon le temps nécessaire

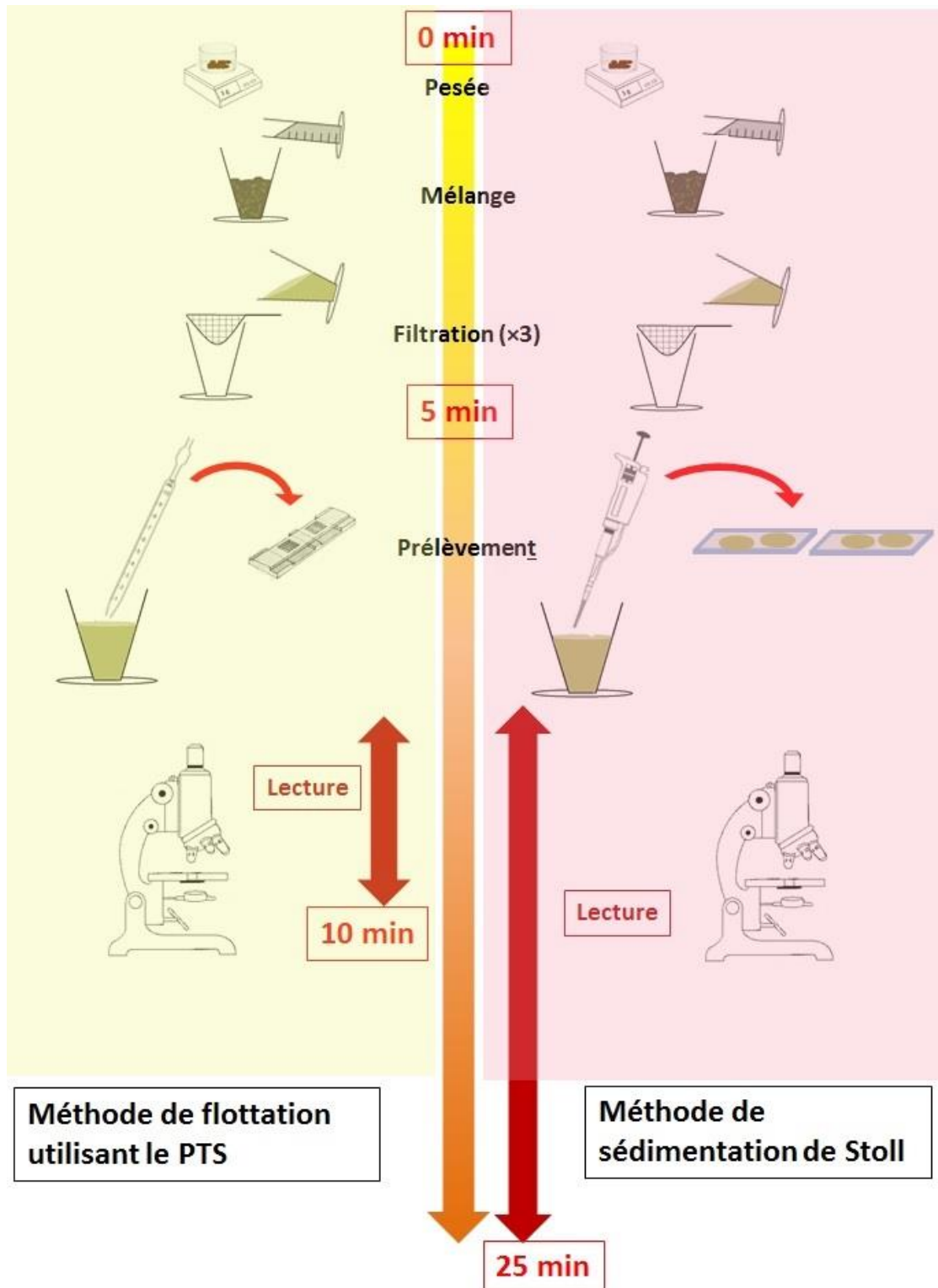


Figure 42 : déroulement comparé des expériences en fonction de la méthode utilisée (flottation au PTS, sédimentation de Stoll)

Les deux techniques comparées dans cette étude ont le même temps dit de préparation. En effet, pour chacune, les étapes de pesée, de prélèvement du liquide de dilution, de mélange et de filtration sont les mêmes. L'ensemble de ces étapes prend environ 5 minutes, jusqu'au prélèvement à la pipette.

À partir de ce moment, il y a une différence significative dans la durée de déroulement des techniques.

En effet, alors que la lecture de la lame de Mac Master pour la technique de flottation avec le nouveau liquide dense ne prend en moyenne que 5 minutes, la lecture des 4 lames issues de la technique de sédimentation de Stoll est fastidieuse et prend beaucoup plus de temps. Malgré l'habitude de lecture des lames, et la familiarisation avec les éléments parasitaires rencontrés, en moyenne la lecture prenait 20 minutes, soit 4 fois plus de temps qu'avec la technique de flottation.

Au total donc, en moyenne la technique utilisant le liquide dense prenait 10 minutes contre 25 minutes pour la sédimentation.

2. Comparaison selon le coût

Les liquides employés dans cette étude diffèrent d'une technique à l'autre, c'est pourquoi il est intéressant de connaître le coût total de chaque examen, incluant le coût matériel et le coût technique.

- Coût matériel :

En ce qui concerne les outils nécessaires, ils sont presque identiques d'une technique à l'autre. Une lame de Mac master est nécessaire pour la technique de flottation, et une pipette automatique est indispensable pour mesurer les gouttes à déposer sur les lames pour la technique de sédimentation, mais en dehors de cela, les lames, les récipients, la balance et le microscope font partie du matériel de laboratoire à envisager pour les deux techniques. Il n'y a donc pas de différence notable en ce qui concerne le matériel.

Pour ce qui est du liquide utilisé, la différence en termes de coût est importante et estimée à 6,02€ HT en faveur de la sédimentation de Stoll en raison du prix initial élevé du PTS (tableau 28).

Tableau 28 : comparaison des coûts des deux techniques utilisées (flottation au PTS ou sédimentation de Stoll)

Flottation PTS		Sédimentation de Stoll	
Libellé	Coût	Libellé	Coût
Produit pur (2L, d=2,82)	1245 € HT	Soude caustique (1kg)	92,70 € HT
Solution reconstituée (0,1L + 0,309L ED)	62,25 € HT	Solution reconstituée (4g NaOH)	0,37 € HT
42 mL	6,39 € HT	42 mL	0,02 € HT
Prix d'une coproscopie	6,39 € HT	Prix d'une coproscopie	0,02 € HT

- Coût technique :

Comme nous l'avons remarqué, le temps nécessaire à la réalisation de ces techniques est significativement différent, ce qui implique un coût technique également différent pour chacune des méthodes. En effet, si nous considérons un tarif horaire moyen d'un technicien de laboratoire égal à 11,7 € HT (technicien de niveau B, d'après la convention collective des laboratoires de biologie médicale), nous pouvons effectuer les calculs suivants (tableau 29) :

Tableau 29 : comparaison des prix des coproscopies en fonction de la technique utilisée (flottation au PTS ou sédimentation de Stoll)

	Flottation PTS	Sédimentation de Stoll
Temps nécessaire à l'examen	10 minutes	25 minutes
Coût technique	$(1/6) \times 11,7 = 1,95 \text{ €}$	$(25/60) \times 11,7 = 4,9 \text{ €}$
Coût technique d'une coproscopie	1,95 €	4,9 €

Le coût technique d'une coproscopie est 2,5 fois supérieur lors de l'utilisation de la méthode de sédimentation de Stoll.

Ainsi, si le prix facturé au client pour une coproscopie est de 17 € HT (prix moyen relevé sur 5 cliniques du Sud-Ouest de la France), nous pouvons estimer la différence entre les dépenses et les recettes comme suit (tableau 30) :

Tableau 30 : estimation des recettes en fonction de la technique utilisée (flottation au PTS ou sédimentation de Stoll)

	Flottation PTS	Sédimentation de Stoll
Nombre de prélèvements examinés / heure	6	2,4
Prix facturé	$6 \times 17 = 102 \text{ €}$	$2,4 \times 17 = 40,8 \text{ €}$
Coût de l'examen coproscopique	$6 \times (6,39+1,95) = 50,04 \text{ €}$	$2,4 \times (4,9+0,02) = 11,81 \text{ €}$
Recette par heure	51,96 € HT	28,99 € HT

Ainsi, les recettes engendrées par une heure de coproscopies réalisées avec la méthode utilisant le PTS sont 1,8 fois supérieures aux recettes engendrées par l'utilisation de la méthode de Stoll.

3. Facilité de lecture

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la lecture est très différente d'une technique à l'autre.

L'utilisation convenable de la lame de Mac Master entraîne une lecture aisée, une absence de bulles, et un comptage facilité au sein du réseau de la lame.

Pour la technique de sédimentation, la lecture des 4 lames de verres est fastidieuse, le comptage est plus long, et souvent, de nombreux débris végétaux viennent perturber la lecture.

De plus, en ce qui concerne la détection des œufs de parasites, nous avons vu que les œufs de *Calicophoron daubneyi* et de *Fasciola hepatica* sont déformés lorsque le nouveau liquide dense, le PTS, est utilisé mais cela ne gêne pas leur reconnaissance avec un peu d'habitude, et apporte même un avantage : après 2 à 3 minutes au sein de la lame de McMaster (temps nécessaire à la remontée des œufs au contact de la lame supérieure), les œufs de *Calicophoron daubneyi* sont plus déformés par phénomène osmotique que les œufs de *Fasciola hepatica*, qui mettent plus de temps à être modifiés morphologiquement. Tandis que lorsque nous détectons un œuf de taille importante avec la technique de sédimentation de Stoll, il est recommandé d'utiliser un filtre bleu pour être certain de distinguer un œuf de grande douve d'un œuf de paramphistome, tant leur reconnaissance est difficile.

IV. Discussion

A. Matériel et méthodes

1. Choix des méthodes

Le but de notre étude était de tester un nouveau liquide dense pour la détection des œufs de trématodes des ruminants.

Le choix de s'intéresser à une technique de concentration par flottation se justifie par plusieurs points : c'est une technique qui permet la concentration de nombreux éléments parasites en une fois, là où les techniques de sédimentation ou les méthodes diphasiques ne ciblent que quelques types de parasite (par exemple, les laboratoires d'analyses utilisent les méthodes de sédimentation pour la recherche des œufs de trématodes uniquement). De plus, c'est actuellement la technique la plus utilisée en laboratoire ou en pratique vétérinaire de routine de par sa simplicité et rapidité de mise en œuvre.

Le PTS était un bon candidat dans cette recherche d'un liquide permettant une technique de flottation aisée, tout en assurant une sécurité d'emploi.

Pour tester ce nouveau liquide de flottation, il a fallu tout d'abord déterminer avec quelle technique le comparer. La décision de la méthode de sédimentation de Stoll comme technique de comparaison a été prise car cette dernière est celle utilisée traditionnellement au laboratoire de Parasitologie de l'ENVT pour la détection des œufs de trématodes, et ce depuis l'interdiction de l'emploi de l'iodomercurate de potassium.

Notre travail a consisté à comparer le dénombrement des œufs (et les qualités intrinsèques des méthodes, qui sont leur sensibilité, efficacité et répétabilité), mais également les aspects pratiques de leur mise en œuvre, comme la facilité de lecture des coproscopies.

Le choix d'un liquide dense repose sur le principe selon lequel les liquides de densité supérieure à 1,4 permettent la mise en évidence des œufs « lourds » des trématodes. Cependant, ils présentent deux inconvénients : ils déforment les œufs de paramphistomes et de Grande Douve (aspect « très cabossé »), et peuvent détruire les œufs très fragiles de *Strongyloides* (source de nombreux « faux-négatifs ») (Alzieu et al., 2011). Nous n'avons pas observé d'œufs ou de larves de *Strongyloides* au cours de nos essais avec le liquide dense. Hors, nous n'en avons pas non plus détecté avec l'utilisation de la méthode de sédimentation de Stoll. Ainsi, trois hypothèses peuvent être émises :

- soit il n'y avait réellement pas de *Strongyloides* dans notre échantillonnage (= vrais négatifs), ce qui est envisageable du fait de l'âge des animaux
- soit ils étaient présents mais à des niveaux d'excrétion très faibles (= faux négatifs), inférieurs au seuil de sensibilité des deux techniques employées
- soit ils étaient présents et également à faible niveau (= faux négatifs) mais ils ont été détruits par le PTS et non détectés par la méthode de Stoll qui a une sensibilité bien plus mauvaise que la flottation avec un liquide dense.

Il n'est donc pas possible de privilégier l'une ou l'autre de ces suggestions du fait de notre échantillonnage. Il faudra tester spécifiquement les propriétés du PTS vis-à-vis des *Strongyloides* sp. en recrutant des animaux jeunes âgés de moins d'un an et maintenus en bâtiment sur litière, qui sont les plus susceptibles d'être infestés par ces parasites.

2. Échantillonnage

Les échantillons ont été prélevés dans divers élevages du Sud-Ouest pour les ovins, du Limousin pour les bovins. Les animaux prélevés dans le cadre de ce travail avaient plus d'un an et avaient accès aux pâtures, et n'avaient pas reçu de traitement antiparasitaire durant les deux derniers mois.

Aucune catégorisation des animaux (selon l'âge et le sexe notamment) n'a été réalisée. Nous avons observé différents niveaux d'excrétion d'éléments parasitaires. En effet, l'excrétion des œufs par certains parasites est dépendante par exemple du statut immunitaire de l'hôte et de sa rencontre avec les parasites (cas des strongles digestifs en particulier). Pour d'autres espèces, comme les paramphistomes et la Petite Douve, il y a un phénomène d'accumulation de la charge parasitaire concomitant avec l'augmentation de l'âge de l'animal sans développement d'une immunité protectrice. Nous avons pu observer des échantillons à faible teneur en éléments parasitaires, qui ont été très intéressants pour évaluer et comparer la sensibilité des méthodes.

B. Résultats

En termes de prévalence, nous pouvons noter que nous avons détecté peu de strongles digestifs chez les bovins. Cela est peu surprenant si l'on observe la population échantillonnée : en effet, ont été prélevés en grande majorité des bovins adultes, donc ayant très probablement acquis une immunité vis-à-vis des strongyloses gastro-intestinales (Alzieu, 2015).

Sur l'ensemble des animaux testés (121 bovins, 118 ovins), les prévalences d'infestation obtenues sont toujours supérieures pour la méthode de flottation au PTS, et ce quel que soit le parasite recherché, et il en est de même des moyennes géométriques et arithmétiques : elles sont systématiquement supérieures avec l'utilisation du PTS, sauf pour un cas de figure sur lequel nous reviendrons. De plus, nous avons montré grâce au test exact de permutation que la différence entre les moyennes était significative.

La grande majorité des animaux a présenté systématiquement des taux d'opg significativement plus importants (comme nous l'avons montré dans la partie résultats) avec le PTS qu'avec la sédimentation de Stoll, et seulement 13 animaux sur les 239 testés ont eu des résultats en opg supérieurs avec la méthode de Stoll qu'avec la méthode de flottation au PTS. Ces 13 cas concernaient toujours des taux d'infestation très faibles (inférieurs à 100 opg), donc des animaux peu parasités. Notre hypothèse principale est que chez ces animaux présentant une charge parasitaire faible, la prise d'essai de 3g de fèces est trop faible donc trop aléatoire (*i.e.* le coefficient de variation est élevé), et engendre l'obtention de faux négatifs. Il faudrait donc répéter les mesures sur des animaux très faiblement infestés et déterminer le coefficient de variation pour la méthode de Stoll et pour la flottation avec le PTS.

Le seul cas de figure où la moyenne obtenue avec la sédimentation de Stoll est supérieure à la moyenne obtenue avec la flottation au PTS concerne l'infestation des bovins par les strongles digestifs. En effet, la moyenne géométrique est de 20,7 opg avec le PTS contre 32,3 opg avec le Stoll. Nous remarquons que la moyenne arithmétique elle, est supérieure avec le

PTS qu'avec le Stoll (6,69 opg contre 2,07 opg). Or, cette moyenne arithmétique prend en compte les animaux non parasités : il s'agit de la somme des opg trouvés divisé par le nombre d'animaux. Mais la moyenne géométrique, elle, prend en compte uniquement les animaux ayant été détectés positifs en coproscopie. Donc l'interprétation de cette moyenne arithmétique inférieure et de cette moyenne géométrique supérieure avec le Stoll est qu'avec cette méthode, moins d'animaux ont été détectés positifs. En effet, ce sont les animaux détectés positifs à l'enrichissement total du PTS qui engendrent une diminution de la moyenne géométrique, puisqu'ils donnent des résultats faibles en opg (15 opg). La méthode de Stoll étant peu sensible, les animaux peu parasités ne sont pas détectés, ni avec la méthode directe, ni à l'enrichissement total. Ainsi, il y a peu d'animaux ayant des taux d'opg faibles, ce qui explique que la moyenne géométrique soit plus importante avec le Stoll.

Nous avons diversifié au maximum notre collecte d'échantillons (élevages laitiers, allaitants, plein air ou troupeaux rentrés en hiver), mais nous n'avons observé que 11 ovins présentant un résultat coproscopique positif à *Fasciola hepatica*, et seulement un bovin. Ce fait s'explique plus par la particularité de l'excrétion des œufs (intermittente et faible) que par l'échantillonnage en lui-même.

Cependant, malgré le faible nombre d'animaux détectés, il est important de noter que seul 7 animaux ont été détectés positif avec la méthode de Stoll, contre 12 avec la méthode au PTS. Cela souligne encore une fois la bonne sensibilité de la méthode de flottation utilisant le PTS. Dans le cas d'excrétion parasitaire faible, il est important que la méthode utilisée soit très sensible pour détecter, s'il y en a, le peu d'œufs présents. La méthode de Stoll l'est trop peu, et engendre donc beaucoup plus de faux négatifs.

Au cours de nos travaux statistiques, nous avons également déterminé les erreurs de classification des méthodes. Alors que la méthode utilisant le PTS n'engendre, sur l'ensemble des animaux testés, toutes espèces parasitaires confondues, que 13 mauvaises classifications, la méthode de Stoll en est beaucoup plus loin. Au total, ce sont 204 ovins qui sont mal classés (ce nombre est supérieur au nombre d'ovins testés, car certains animaux ont été mal classés par le Stoll en ce qui concerne la détection coproscopique des œufs de plusieurs espèces parasites), dont 63 avec plus de deux classes d'écart, et 143 bovins, dont 14 avec plus de deux classes d'écart.

Au cours de notre étude, nous avons pu déterminer que la méthode présentant la plus grande sensibilité de détection des œufs (qu'ils soient de trématodes, de strongles, ou des autres parasites gastro-intestinaux) était la méthode de flottation utilisant le PTS. En effet, nous avons montré que chez les ovins, la sensibilité de la méthode de Stoll est toujours inférieure à celle obtenue avec le PTS, et est au mieux moyenne (comprise entre 50 et 90%). Chez les bovins, elle est moyenne pour la détection des infestations par *C. daubneyi*, et elle est très mauvaise (inférieure à 50%) pour la détection des œufs des autres parasites. Ce résultat n'est pas en accord avec les conclusions de Raynaud et al. (1974) et de Duthaler et al. (2010), qui ont montré que les méthodes de sédimentation montraient une plus grande sensibilité dans la détection des œufs de trématodes.

De même, cette sensibilité plus importante du PTS explique les mauvaises valeurs de κ observés entre les deux méthodes avec un nombre important de faux négatifs observés avec le Stoll.

Nous avons également montré que la valeur prédictive négative de la méthode utilisant le PTS est toujours très bonne, quelle que soit l'espèce cible ou l'espèce parasite envisagée, alors que celle de la méthode de Stoll n'est très bonne que pour la détection des œufs de *Nematodirus* sp., et de Grande Douve, et pour la détection des œufs de *Moniezia* sp et de trichures chez les ovins. Toutefois, nous remarquons que cela concerne des espèces peu présentes dans notre échantillonnage. Une augmentation de ce nombre pourrait influencer négativement la VPN concernant la méthode de Stoll du fait de son défaut de sensibilité. Pour les autres parasites, elle est moyenne ou très mauvaise donc elle n'assure pas l'absence d'infestation pour ces espèces.

Nous aurions pu nous attendre, comme le suggèrent les conclusions de Raynaud (1970), à ce que la lecture des lames de McMaster lors de la flottation au PTS soit très difficile, à cause des débris présents (en raison de la forte densité du liquide de flottation utilisé, comparable à la densité des solutions de sulfate de zinc et de magnésium qu'il décrit dans son étude). Cependant, nous n'avons pas été gênés par cet aspect, les éléments parasitaires restants bien détectables tant par leur taille, leur couleur, leur forme ou leur contenu.

La réalisation de mélanges de fèces d'animaux est souvent critiquée, du fait de la dilution que réalise le mélange : en effet, lors de parasitisme faible des animaux, l'examen coproscopique peut conclure à une absence d'infestation. Mais en envisageant une méthode très sensible comme notre méthode de flottation utilisant le PTS, il s'avère que la réalisation de mélanges est révélatrice du niveau de parasitisme des animaux prélevés. Reste toujours le biais qui apparaît lors d'une coproscopie de mélange positive : il est difficile de dire si tous les animaux ont le même niveau de parasitisme, ou si éventuellement un animal est plus infesté (ce qui conduit alors à réaliser des examens coproscopiques individuels).

Les résultats que nous avons obtenus sont à relativiser : le taux de détection positive en mélange de troupeaux positifs est excellent en ce qui concerne les strongles digestifs, et très bon en ce qui concerne la Petite Douve (respectivement 100% et 75%, ce qui fait du mélange avec le PTS une technique valable pour la détection de troupeaux atteints de strongyloses gastro-intestinales et de dicrocoélie), mais n'est que de 33% pour la Grande Douve, et de 25% pour les paramphistomes.

Ces résultats suggèrent un défaut de sensibilité lors de faibles excrétions d'œufs, mais ce seuil ne peut être déterminé ici, car nous avons étudié dans cette partie trop peu d'élevages, qui de plus présentaient un niveau d'excrétion parasitaire trop faible.

De plus, avec seulement 4 troupeaux étudiés, la puissance des tests est faible, donc les résultats sont relatifs. Il serait intéressant de poursuivre cette étude avec plus de troupeaux évalués parallèlement en mélange et individuellement, afin d'évaluer la corrélation entre les techniques, et de confirmer la validité de notre méthode utilisant le PTS en mélange.

C. Biais de l'étude

1. Échantillonnage

Comme nous l'avons précisé dans la partie bibliographique, l'excrétion d'œufs est différente pour tous les parasites du système digestif, et l'infestation des individus est différente selon l'âge de l'espèce cible et le parasite recherché.

Mais nous rencontrons également un risque de biais au niveau de l'échantillonnage, puisque seuls quelques grammes de cet échantillon sont examinés lors de la coproscopie. En effet, nos protocoles de coproscopie, tout comme les protocoles usuels, prévoyaient l'analyse de 3g de fèces seulement ; alors que les échantillons récoltés peuvent peser jusqu'à 200g. Cette faible quantité de fèces examinées est un point qui soulève de nombreuses critiques : en effet, elle ne représente qu'une faible part des selles produites quotidiennement par un ruminant, donc ne serait pas très représentative de l'excrétion, et nous pouvons donc envisager ne pas retrouver d'œufs dans l'échantillon malgré une infestation de l'animal. C'est d'ailleurs pour cela que se sont développées les diverses techniques de concentration, afin d'obtenir dans un faible volume les œufs de parasites, à partir de la grande quantité de matières fécales recueillies.

La première étape est l'homogénéisation de l'échantillon avant prélèvement lorsqu'une faible portion de l'échantillon est examinée ; cela diminue le risque que le prélèvement réalisé ne soit pas représentatif. Cette étape est très importante, même si l'homogénéisation est plus ou moins facile selon le contenant (gant ou pot).

Cringoli et al. (2004) conseillent de diluer une grande quantité de fèces dans de l'eau, puis de mélanger ensuite une partie de cette dilution au liquide de flottation. Cette étape peut être utile pour les techniques alliant sédimentation et flottation, car la dilution dans l'eau a pour objectif l'élimination d'un maximum de débris avant de mélanger le filtrat à une solution plus dense (Levecke et al., 2012).

Les recommandations d'usage sont de répéter les coproscopies sur plusieurs jours pour un individu, et d'élaborer un suivi parasitaire des élevages avec prélèvement de plusieurs individus (Bosquet et al., 2006), et visent à pallier à ce biais de prélèvement. Toutefois, pour des raisons pratiques et économiques, cela est difficilement réalisable en pratique.

Le même échantillon a été testé par les deux techniques, au sein du même laboratoire, en suivant toujours les mêmes protocoles.

La période d'échantillonnage peut également constituer un biais suivant les espèces parasitaires recherchées. La recherche des strongles digestifs est réalisée essentiellement sur les animaux en pâture, et celle des œufs de trématodes et en particulier de *Fasciola hepatica* est plus instructive en fin d'hiver, à l'étable, quand il n'y a plus de nouvelles infestations et que toutes les douves ou paramphistomes sont arrivés à maturité. Ainsi, nous limitons le nombre de faux négatifs pour les trématodes (pas pour les strongles qui peuvent être en hypobiose larvaire) en prélevant les animaux à cette période-là.

2. Homogénéité de la technique

Un des points principaux pour la comparaison des techniques de diagnostic est de vérifier l'homogénéité de celles-ci. Cela a été mis en évidence par Levecke et al. (2012) : il a souligné que, même si la sensibilité entre deux techniques était la même, une différence de protocole pouvait être à elle seule à l'origine d'une différence dans le dénombrement. Il a donc fallu choisir des protocoles d'expériences répétables pour nos manipulations. Pour ce faire, tous les échantillons de fèces ont été pesés sur la même balance, tarée avant chaque pesée et avec une précision de 0,1 g. Les prélèvements étaient déposés dans des verres à pied identiques, et les différents liquides (solution de soude pour la méthode de sédimentation de Stoll, solution de PTS pour la méthode de flottation) étaient ajoutés après que nous ayons mesuré le volume dans une éprouvette graduée. Pour chaque méthode, 42 ml de solution étaient ajoutés aux matières fécales. Cependant, la précision de la graduation étant médiocre, malgré la rigueur de nos mesures, nous ne pouvons pas écarter une imprécision à ce stade des manipulations.

Tous les biais pouvant être reliés à la technique utilisée ont été au maximum éliminés, que ce soit par l'utilisation du même matériel, par les quantités (toujours 3g de matières fécales, dans 42 ml de solution), mais aussi par l'opérateur, puisque toutes les manipulations ont été réalisées par la même personne.

3. Recyclage du produit de flottation

La limite principale de notre étude est l'absence de développement d'un protocole de recyclage du PTS. En effet, si sa facilité d'utilisation, et sa sensibilité dans la détection des œufs de trématodes ont été mises en évidence clairement, son coût d'utilisation est conséquent. Il aurait été très intéressant d'élaborer un système permettant de filtrer les solutions fécales, afin de récupérer le PTS pour le réutiliser. Ainsi, cela permettrait de minimiser le facteur coût, même si la technique utilisant le PTS s'est montré être plus rentable que la technique de sédimentation de Stoll, du fait d'un temps d'analyse trois fois plus court. Une piste à étudier pour le recyclage du PTS semble être l'utilisation du charbon actif.

Cette technique de filtration, décrite par Six et al.(1999), utilise une colonne remplie de charbon actif pour retirer les contaminants organiques de la solution, mais également une résine permettant un échange de cations, pour éviter la formation de précipités insolubles. Les filtres à charbon actif sont utilisés pour filtrer la matière organique des eaux polluées notamment, particulièrement quand la charge moléculaire est importante. Les domaines d'application sont nombreux : traitement des eaux souterraines, des micropolluants, rétention du chlore, filtration pour piscines ou pour le rejet d'effluents. Le principe est l'adsorption, où un solide est employé pour enlever une substance soluble d'un liquide. Dans les filtres à charbon, le charbon actif (en poudre ou granulaire) couvre une surface interne très grande, entre 500 et 1500 m²/g. Le principe est le transfert d'une phase liquide (solution de PTS avec les matières organiques) contenant l'adsorbat vers une phase solide avec rétention des solutés à la surface du charbon actif appelé adsorbant (nous parlons d'adsorption car la substance est alors attachée à la surface interne du charbon actif).

Cette technique permet le retrait du carbone présent dans la solution de PTS après son utilisation (car de petites quantités de carbone peuvent passer de la matière organique étudiée dans la solution de PTS ; Six et al.,1999).

Les différentes étapes sont :

- 1 : Transfert de la particule
- 2 : Déplacement de l'eau liée jusqu'à être au contact du charbon
- 3 : Diffusion à l'intérieur du charbon sous l'influence du gradient de concentration
- 4 : Adsorption dans un micropore

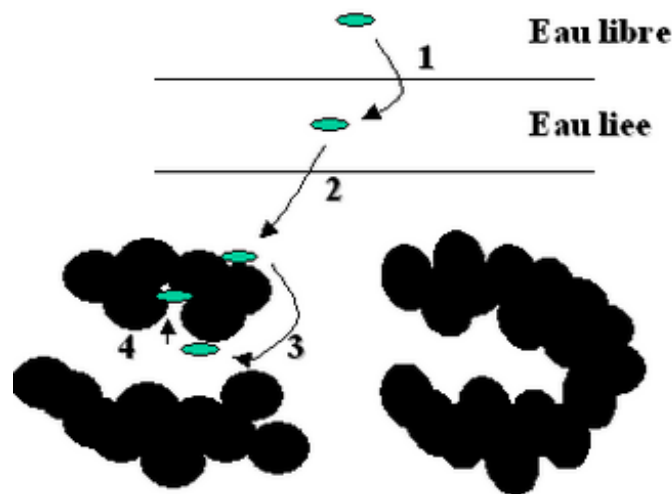


Figure 43 : différentes étapes de l'adsorption réalisée dans un filtre à charbon actif (d'après <http://www.lenntech.fr/>)

De plus, les ions sodium se dissocient du PTS en solution aqueuse, ce qui implique que certains cations présents dans les matières organiques, notamment le calcium, peuvent s'associer au PTS et engendrer des formes insolubles qui précipitent lors du recyclage et de la concentration de ce dernier.

Ainsi, Six et al. (1999) décrivent leur protocole comme suit :

- Rincer la colonne de charbon actif avec 2L d'eau désionisée pour retirer les cations présents dans le charbon actif, puis avec 5L de solution au sel pour convertir la résine en sa forme sodium, et enfin avec 2L d'eau désionisée pour retirer l'excès de sel.
- Centrifuger la solution de PTS obtenue après son utilisation si nécessaire, puis la filtrer en utilisant un filtre en microfibrilles de verre
- Passer la solution obtenue au travers de la colonne par percolation
- Concentrer la solution PTS à 55-60°C au fou. Le segment en résine de la colonne, servant à « l'échange de cations » n'est nécessaire que s'il y a une précipitation importante lors de la concentration.

La solution obtenue après filtration est souvent plus jaune que la solution d'origine. Il faudra également déterminer si les sels biliaires qui colorent la solution en brun sont retenus. Leur présence pourrait en effet gêner fortement la lecture s'ils viennent à assombrir de façon trop importante le liquide recyclé.

CONCLUSION

En médecine des animaux de production, le parasitisme représente un enjeu important, car il engendre des dépenses conséquentes en termes de traitement, mais aussi parfois des pertes importantes s'il n'est pas contrôlé. Les parasites du système digestif que nous avons étudiés dans ce travail sont ceux qui ont un impact majeur sur les ruminants. Il s'agit notamment des trématodes (avec *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium lanceolatum* et *Calicophoron daubneyi*), des Nématodes (principalement les strongles gastro-intestinaux), des Cestodes et des protozoaires digestifs tels que les coccidies du genre *Eimeria*.

Les éleveurs conduisent le plus souvent les traitements antiparasitaires de façon systématique selon un schéma répété chaque année. La tendance actuelle vise cependant à la rationalisation de ces traitements, en vue d'une utilisation raisonnée des antiparasitaires, c'est à dire non systématique, mais adaptée aux espèces parasitaires retrouvées, et à la charge parasitaire des animaux (c'est le cas des infestations par les strongles dont le but est de maintenir une faible charge parasitaire, suffisante à l'immunisation des animaux).

Dans cette optique, la réalisation de coproscopies, qui sont des examens simples et rapides pouvant être réalisés par le vétérinaire dans sa structure, peut être proposée aux éleveurs. La méthode la plus utilisée actuellement est la coproscopie utilisant la concentration des éléments parasitaires par flottation. Cependant, pour la détection des œufs de trématodes, qui sont des œufs de densité élevée, le manque de sensibilité de cette technique est évident si la densité de la solution utilisée est trop faible, et les solutions utilisables et efficaces sont plus rares depuis l'arrêt massif de l'utilisation de l'iodomercurate de potassium en raison de sa toxicité sanitaire et environnementale. Les techniques de sédimentation sont donc utilisées, mais présentent l'inconvénient d'être très longues à mettre en œuvre.

La réalisation de coproscopies comparatives au cours de notre travail, étudiant d'une part une technique de concentration par sédimentation (la méthode de Stoll utilisant une solution de soude), et d'autre part une technique de concentration par flottation (celle testant le nouveau liquide dense, le Polytungstate de sodium, ou PTS) a permis d'étudier les différences de sensibilité de ces méthodes en fonction des parasites recherchés.

L'analyse de nos résultats montre que quel que soit l'espèce cible étudiée, et quel que soit le parasite recherché, la méthode utilisant le nouveau liquide dense à tester, le PTS, montre une sensibilité significativement supérieure à la méthode de sédimentation de Stoll.

Il pourrait être intéressant, devant le coût du PTS, d'envisager de développer une technique de recyclage de ce dernier, applicable facilement, pour rendre moins onéreuse cette technique très simple et très sensible pour la détection des œufs de trématodes.

Dans notre étude, nous avons comparé une méthode de flottation à une méthode de sédimentation. A la lumière des articles étudiés et des différentes techniques existantes, il serait intéressant de comparer notre technique utilisant le PTS avec une autre technique de flottation comme le sulfate de zinc. La technique FLOTAC, inventée en Italie par Cringoli et al. (2004), semble être un bon candidat. Elle se base sur la technique de flottation-centrifugation,

en introduisant un dispositif particulier. Celui-ci permet de lire les œufs à la surface du liquide (ici le sulfate de zinc), sur une épaisseur de quelques millimètres, évitant ainsi de perdre ceux qui ne seraient pas totalement remontés à la surface (Knopp et al., 2009). Cette technique ayant été décrite comme étant la technique permettant d'obtenir le moins de faux négatifs (en comparaison avec les techniques de McMaster et de Wisconsin complète), donc comme étant la plus sensible, par Cringoli et al. (2004) et Rinaldi et al. (2011), il serait très intéressant d'envisager une comparaison de celle-ci avec la méthode utilisant le PTS, voire même d'étudier la sensibilité de la méthode FLOTAC en utilisant le PTS à la place du sulfate de zinc.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Je soussigné, **Emmanuel LIENARD**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **SOCHAT Fanny** intitulée « *Evaluation d'un nouveau liquide dense pour le diagnostic coproscopique des infestations des ruminants par les trématodes* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 16 novembre 2015
Docteur Emmanuel LIENARD
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN




Vu :
Le Président du jury :
Professeur Alexis VALENTIN

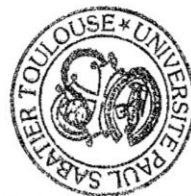


Vu et autorisation de l'impression :
Administrateur Provisoire de
l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Amal SAYAH

L'Administrateur Provisoire

Amal SAYAH

Mlle SOCHAT Fanny
a été admis(e) sur concours en : 2010
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 26/06/2014
a validé son année d'approfondissement le : 24/09/2015
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



BIBLIOGRAPHIE

- ABROUS, M., RONDELAUD, D. and DREYFUSS, G., 1999, Paramphistomum daubneyi and Fasciola hepatica : influence of temperatures changes on the shedding of cercariae from dually infected Lymnea truncatula. *Parasitology Research*. 85. 1999. p. 765–769.
- ALZIEU, J.P. and COUROUBLE, F., 2004, La hiérarchisation des trématodoses des bovins : fasciolose, paramphistomose, dicrocoeliose. *Journées nationales GTV*. Tours, 2004. p. 611–618.
- ALZIEU, J.P. and DORCHIES, P., 2007, Réémergence de la paramphistomose bovine en France: Synthèse des connaissances actuelles épidémiologiques, physiopathologiques et diagnostiques. *Bull. Acad. Vét. France*. 2007. No. 160, n°2, p. 93–99.
- ALZIEU, J.P. and MAGE, C., 1991, La fasciolose bovine ; pathogénie, épidémiologie, thérapeutique. *Bulletin GTV*. 6-B-395. 1991. p. 59–74.
- ALZIEU, J.P., DORCHIES, P., LEGOUPIL, V., BOUTET, M., GOYEAU, K., FERRIER, T., BONADEI, M., RAMEIL, M. and JACQUIET, Ph., 2011, Le parasitisme d'intérieur chez les bovins : actualités sur l'épidémiologie et les méthodes de diagnostic. *Journées nationales des GTV, Nantes 2011*. 2011. P. 503–514.
- ALZIEU, J.P., DUCOS DE LAHITTE, J., BOURDENX, L. and JACQUIET, Ph., 2002, La dicrocoeliose bovine : une parasitose émergente et pathogène. *Bulletin GTV*. 13. 2002. p. 133–136.
- ALZIEU, J.P., 2015, De l'usage optimal de la coproscopie dans la démarche diagnostique et dans l'appréciation du risque parasitaire. *Journées nationales GTV*. 2015.
- ANDERSON, N., LUONG, T. T., VO, N. G., BUI, K. L., SMOOKER, P. M. and SPITHILL, T. W., 1999, The sensitivity and specificity of two methods for detecting Fasciola infections in cattle. *Veterinary Parasitology*. 1999. Vol. 83, no. 1, p. 15–24.
- ASHRAFI, K., BARGUES, M. D., O'NEILL, S. and MAS-COMA, S., 2014, Fascioliasis: A worldwide parasitic disease of importance in travel medicine. *Travel Medicine and Infectious Disease*. November 2014. Vol. 12, no. 6, p. 636–649.
- BAILLENGER, 1982, *Coprologie Parasitaire et Fonctionnelle*. Bordeaux.
- BARRIGA, O., 1994, *Veterinary Parasitology*.
- BAUDIN, M., 2005, *L'infestation par Dicrocoelium lanceolatum dans les élevages de trois canton en Haute-Saône, résultats d'un enquête coprologique*.

BENNEMA, S.C., DUCHEYNE, E., VERCRUYSSSE, J., CLAEREBOUT, E., HENDRICKX, G. and CHARLIER, J., 2011, Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in a temperate climate zone. *International Journal for Parasitology*. February 2011. Vol. 41, no. 2, p. 225–233.

BENNEMA, S., VERCRUYSSSE, J., CLAEREBOUT, E., SCHNIEDER, T., STRUBE, C., DUCHEYNE, E., HENDRICKX, G. and CHARLIER, J., 2009, The use of bulk-tank milk ELISAs to assess the spatial distribution of *Fasciola hepatica*, *Ostertagia ostertagi* and *Dictyocaulus viviparus* in dairy cattle in Flanders (Belgium). *Veterinary Parasitology*. October 2009. Vol. 165, no. 1-2, p. 51–57.

BONNEFONT, M. and CANELLAS, A., 2014, *Optimisation des outils de diagnostic des strongyloses gastro-intestinales des ovins*

BORAY, J. C., 1969, Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. in Parasitol.* 7. 1969. p. 95–210.

BOSI, G., MAZZANTI, M. B., FLORENZANO, A., N'SIALA, I. M., PEDERZOLI, A., RINALDI, R., TORRI, P. and MERCURI, A.M., 2011, Seeds/fruits, pollen and parasite remains as evidence of site function: piazza Garibaldi – Parma (N Italy) in Roman and Mediaeval times. *Journal of Archaeological Science*. July 2011. Vol. 38, no. 7, p. 1621–1633.

BOSQUET, G., ALZIEU, J.P., CHAUVIN, A., CAMUSET, P., DORCHIES, P. and HESKIA, B., 2006, Maîtriser la Grande Douve : associer des mesures thérapeutiques et agronomiques. *Bulletin des GTV*. 37. 2006. p. 67–73.

BOWMAN, Dwight D., 1999, *Georgis' Parasitology for Veterinarians 7th edition*.

BUSSIERAS, J. and CHERMETTE, R., 1995, *Abrégé de parasitologie vétérinaire, fascicule III : Helminthologie*. Ed. Service de Parasitologie ENV Alfort.

CALAMEL, L., 1989, Etude d'efficacité comparée de 4 produits dicrocoelicides. *Revue de Medecine Veterinaire*. 140. 1989. p. 397–406.

CALLAHAN, J., 1987, A nontoxic heavy liquid and inexpensive filters for separation of mineral grains. *Journal of Sedimentary Petrology*. 57. 1987. p. 765–766.

CHARLIER, Johannes, DE MEULEMEESTER, Luc, CLAEREBOUT, Edwin, WILLIAMS, Diana and VERCRUYSSSE, Jozef, 2008, Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Veterinary Parasitology*. May 2008. Vol. 153, no. 1-2, p. 44–51.

CHARLIER, J., DUCHATEAU, L., CLAEREBOU, E., WILLIAMS, D. and VERCRUYSE, J., 2007, Associations between anti-Fasciola hepatica antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*. January 2007. Vol. 78, no. 1, p. 57–66.

COLIN, C., 2009, *Dicrocoeliose et fasciolose bovines : enquête épidémiologique en abattoir en région Bourgogne*. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.

COMITÉ FÉDÉRAL-PROVINCIAL-TERRITORIAL SUR L'EAU POTABLE (SANTÉ CANADA), 2012, *Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : document technique : protozoaires entériques giardia et cryptosporidium*.

COUROUBLE, F., 2007, La dicrocoeliose chez les bovins. *Bulletin GTV*. Hors série Parasitisme des bovins. 2007. p. 131–135.

CRINGOLI, G, RINALDI, L, VENEZIANO, V, CAPELLI, G and SCALA, A, 2004, The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Parasitology*. August 2004. Vol. 123, no. 1-2, p. 121–131.

DALTON, J.P., 1998, *Fasciolosis*.

DARGIE, J. D., 1987, The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep. *International journal for parasitology*. 1987. Vol. 17, no. 2, p. 453–463.

DORCHIES, P., DUNCAN, J., LOSSON, B. and ALZIEU, J.P., 2012, *Parasitologie clinique des bovins, Vade Mecum*.

DORCHIES, P., 2007, Réchauffement climatique et parasitisme. *Bulletin GTV*. Hors série Parasitisme des bovins. 2007. p. 15–22.

DUTHALER, U., RINALDI, L., MAURELLI, M. P., VARGAS, M., UTZINGER, J., CRINGOLI, G. and KEISER, J., 2010, *Fasciola hepatica*: Comparison of the sedimentation and FLOTAC techniques for the detection and quantification of faecal egg counts in rats. *Experimental Parasitology*. October 2010. Vol. 126, no. 2, p. 161–166.

EUZEBY, J., 1981, *Diagnostic expérimental des helminthoses animales Tome 1*.

EUZEBY, J., 2008, *Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire*.

EVERITT, B.S., 1989, Statistical methods for medical investigations. *Oxford Univ Press*. 1989. Vol. London.

FLORENZANO, A., MERCURI, A. M., PEDERZOLI, A., TORRI, P., BOSI, G., OLMI, L., RINALDI, R. and BANDINI MAZZANTI, M., 2012, The Significance of Intestinal Parasite Remains in Pollen Samples from Medieval Pits in the Piazza Garibaldi of Parma, Emilia Romagna, Northern Italy: SIGNIFICANCE OF INTESTINAL PARASITE REMAINS IN POLLEN SAMPLES. *Geoarchaeology*. January 2012. Vol. 27, no. 1, p. 34–47.

GAASENBEEK, C. P. H., MOLL, L., CORNELISSEN, J.B.W.J., VELLEMA, P. and BORGSTEEDE, F. H. M., 2001, An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary parasitology*. 2001. Vol. 95, no. 1, p. 37–43.

GIBSON, T.E., 1965, Examination of Faeces for Helminth eggs and larvae. *Veterinary bulletin*, vol. 35. 7. 1965. p. 403–410.

GIMARD, G., 2001, *Fasciolose bovine : enquête épidémiologique en abattoir et évaluation de la sensibilité des tests sérologiques*. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.

GLADYS, S., 2015, *Approche raisonnée du traitement de la paramphistomose bovine par l'oxyclozanide*. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

GREGORY, M.R. and JOHNSTON, K.A., 1987, A nontoxic substitute for hazardous heavy liquids-aqueous sodium polytungstate (3Na₂WO₄·9H₂O) solution. *N.Z.J. Geol. Geophys.* 1987. No. 30, p. 317–320.

HAPPICH, F. A. and BORAY, J. C., 1969, Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. *Aust. vet. J.* 1969. Vol. 45, p. 326–328.

INRS, LABORATOIRE DE CHIMIE ANALYTIQUE MINÉRALE., 2003, *Le mercure. Prévention de l'hydrargyrisme*. 2003.

JACQUIET, Ph. and DORCHIES, P., 2002, Les outils du diagnostic parasitologique : étude analytique, critique et prospective. *Journées nationales GTV*. Tours, 2002. p. 479–488.

JACQUIET, Ph., 2001, L'acquisition de l'immunité dans les strongyloses des Ruminants : bases théoriques. *Recueil de conférences des journées nationales GTV*. Clermont-Ferrand, 2001. p. 341–352.

KASSAI, T., 1999, *Veterinary helminthology*.

KNOPP, S., GLINZ, D., RINALDI, L., MOHAMMED, K. A., N'GORAN, E. K., STOTHARD, J. R., MARTI, H., CRINGOLI, G., ROLLINSON, D. and UTZINGER, J., 2009, FLOTAC: A promising technique for detecting helminth eggs in human faeces. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. December 2009. Vol. 103, no. 12, p. 1190–1194.

KRUKOWSKI, S. T., 1988, Sodium metatungstate: a new heavy-mineral separation medium for the extraction of conodonts from insoluble residues. *Journal of Paleontology*. 1988. P. 314–316.

LACROUX, C., 2006, *Régulation des populations de Nématodes gastro-intestinaux (Haemonchus contortus et Trichostrongylus colubriformis) dans deux races ovines, INRA 401 et Barbados Black Belly*. INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE.

LANDIS, J.R. and KOCH, G.G., 1977, The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977. No. 33, p. 159–174.

LEVASSEUR, G., 2002, la microcoeliose bovine : suivi de l'excrétion pendant l'hiver. *Bulletin GTV*. 13. 2002. p. 137–139.

LEVECKE, B., RINALDI, L., CHARLIER, J., MAURELLI, M.P., BOSCO, A., VERCRUYSE, J. and CRINGOLI, G., 2012, The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods. *Veterinary Parasitology*. August 2012. Vol. 188, no. 1-2, p. 194–199.

LEVINE, N.D., MEHRA, K.N., CLARK, D.T. and AVES, I.J., 1960, A comparison of nematode egg counting techniques for cattle and sheep feces. *American Journal of Veterinary Research*. 1960. p. 511–515.

LOYACANO, A. F., WILLIAMS, J. C., GURIE, J. and DEROSA, A. A., 2002, Effect of gastrointestinal nematode and liver fluke infections on weight gain and reproductive performance of beef heifers. *Veterinary parasitology*. 2002. Vol. 107, no. 3, p. 227–234.

MACKINNON, A., 2000, A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Comput Biol Med*. 2000. No. 30, p. 127–134.

MAGE, C. and CHAUVIN, A., 1997, Gestion agronomique et thérapeutique de l'infestation des ruminants par *Fasciola hepatica* : choix d'un schéma de prévention. *Point Veterinaire*. Numéro spécial 28. 1997. p. 139–146.

MAGE, C., BOURGNE, H., TOULLIEU, J.-M., RONDELAUD, D. and DREYFUSS, G., 2002, *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* : changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Veterinary Research*. September 2002. Vol. 33, no. 5, p. 439–447.

MAGE, C., 2008, *Parasites des moutons manuel pratique 2eme edition*.

MAS-COMA, S. and BARGUES, M. Dolores, 2005, Fasciolosis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 35. 2005. p. 1255–1278.

MEISSONNIER, E. and MAGE, Ch., 2007, LES MÉTHODES DE DÉTECTION DE FASCIOLA HEPATICA DANS LES TROUPEAUX BOVINS EN FRANCE. 2007.

MUNSTERMAN, D. and KERSTHOLT, S., 1996, Sodium polytungstate, a new non-toxic alternative to bromoform in heavy liquid separation. *Review of Palaeobotany and Palynology*. 1996. Vol. 91, no. 1, p. 417–422.

PHIRI, A.M., OWEN, B., PHIRI, I.K., SIKASUNGE, C.S., CHEMBENSOFU, M. and MONRAD, J., 2006, Comparative fluke burden and pathology in condemned and non-condemned cattle livers from selected abattoirs in Zambia. *Onderstepoort J. Vet.* 73. 2006. p. 275–281.

PRITCHARD, G.C., FORBES, A.B., WILLIAMS, D.J., SALIMI-BEJESTANI, M.R. and DANIEL, R.G., 2005, Emergence of fasciolosis in cattle in East Anglia. *The Veterinary Record*. 157. 2005. p. 578–582.

RAPSCH, C., SCHWEIZER, G., GRIMM, F., KOHLER, L., BAUER, C., DEPLAZES, P., BRAUN, U. and TORGERSON, P.R., 2006, Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International Journal for Parasitology*. September 2006. Vol. 36, no. 10-11, p. 1153–1158.

RAYNAUD, J.P. and BRUNAUT, G., 1974, Régénération de l'iodomercurate de potassium usagé pour favoriser son utilisation continue en coproscopie. *Annales de Parasitologie, tome 49*. 3. 1974. p. 349–356.

RAYNAUD, J.P., LAFAY, E., LEIMBACHER, F., BRUNAUT, G. and NICOLAS, J.A., 1974, Détection et numération des oeufs de *Fasciola* chez les ruminants. *Revue de médecine vétérinaire*. 1974. Vol. 125, p. 847–878.

RAYNAUD, J.P., 1970, Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. *Annales de Parasitologie, tome 45*. 3. 1970. p. 321–342.

REBILLARD, O., 2011, Actualités sur la gestion des paramphistomoses en élevage bovin. *Journées nationales GTV*. Nantes 2011.

REICHEL, M. P., 2002, Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Veterinary parasitology*. 2002. Vol. 107, no. 1, p. 65–72.

RIEU, E., RECCA, A., BÉNET, J.J., SAANA, M., DORCHIES, P. and GUILLOT, J., 2007, Reliability of coprological diagnosis of *Paramphistomum* sp. infection in cows. *Veterinary Parasitology*. May 2007. Vol. 146, no. 3-4, p. 249–253.

RIEU, E., 2004, *Les paramphistomoses gastroduodénales bovines : enquête épidémiologique en Champagne Ardenne et mise au point d'un test ELISA pour la détection de coproantigènes parasitaires*. Faculté de Médecine, Creteil.

RINALDI, L., COLES, G.C., MAURELLI, M.P., MUSELLA, V. and CRINGOLI, G., 2011, Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Veterinary Parasitology*. May 2011. Vol. 177, no. 3-4, p. 345–352.

RINALDI, L., MUSELLA, V., VENEZIANO, V., CONDOLEO, R. U. and CRINGOLI, G., 2009, Helminthic infections in water buffaloes on Italian farms: a spatial analysis. *Geospatial Health*. 3. 2009. p. 233–239.

ROJO-VÁZQUEZ, F.A., MEANA, A., VALCÁRCEL, F. and MARTÍNEZ-VALLADARES, M., 2012, Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology*. September 2012. Vol. 189, no. 1, p. 15–38.

SALEM, A., CHAUVIN, A., BRAUN, J. P., JACQUIET, Ph and DORCHIES, Ph, 2011, Comparaison de six méthodes de dépistage de *Fasciola hepatica* chez les bovins naturellement infestés. *Revue de Médecine Veterinaire*. 2011. Vol. 162, no. 1, p. 18.

SALIMI-BEJESTANI, M.R., MCGARRY, J.W., FELSTEAD, S., ORTIZ, P., AKCA, A. and WILLIAMS, D.J.L., 2005, Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Research in Veterinary Science*. April 2005. Vol. 78, no. 2, p. 177–181.

SAX, N.I., 1979, *Dangerous Properties of Industrial Materials*. 5th. Van Nostrand Reinhold Co., New York.

SCHWEIZER, G., BRAUN, U., DEPLAZES, P. and TORGERSON, P.R., 2005, Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record: Journal of the British Veterinary Association*. 157. 2005. p. 188.

SIX, J., SCHULTZ, P.A., JASTROW, J.D. and MERCKX, R., 1999, Recycling of sodium polytungstate used in soil organic matter studies. *Soil Biology and Biochemistry*. 31. 1999. p. 1193–1196.

SPASSKII, A.A., 1951, *Essentials of cestodology*.

STRIGUL, N., KOUTSOSPYROS, A. and CHRISTODOULATOS, C., 2010, Tungsten speciation and toxicity: Acute toxicity of mono- and poly-tungstates to fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. February 2010. Vol. 73, no. 2, p. 164–171.

STRIGUL, N.S., KOUTSOSPYROS, A. and CHRISTODOULATOS, C., 2009, Tungsten in the former Soviet Union: review of environmental regulations and related research. *J. Land Contam. Reclam.* 17. 2009. p. 189–215.

NOM : SOCHAT

PRENOM : FANNY

TITRE : EVALUATION D'UN NOUVEAU LIQUIDE DENSE POUR LE DIAGNOSTIC COPROSCOPIQUE DES INFESTATIONS DES RUMINANTS PAR LES TREMATODES

RESUME :

Les trématodoses des ruminants sont des parasitoses banales dont l'impact clinique et économique est important. Les méthodes de diagnostic sont généralement limitées à l'examen coproscopique. Les œufs de trématodes, lourds, requièrent des liquides de densité élevée pour leur recherche par flottation. Le polytungstate de sodium (PTS) est un liquide dense qui permet d'obtenir des solutions de haute densité sans les inconvénients de toxicité des autres liquides denses, comme l'iodomercurate de potassium.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'application possible de ce nouveau liquide dense, le PTS, dans le diagnostic coproscopique des infestations parasitaires intestinales des ruminants, en mettant l'accent sur les principaux trématodes (*Fasciola hepatica*, *Calicophoron daubneyi* et *Dicrocoelium lanceolatum*) présents en France métropolitaine.

La première partie bibliographique présente les principales espèces de parasites intestinaux des bovins et ovins en insistant sur les trématodes, ainsi que les moyens de contrôle et les différentes méthodes de diagnostic coproscopique.

La seconde partie, expérimentale, compare les performances du PTS (en flottation, méthode de McMaster) avec la méthode de Stoll (sédimentation) par l'analyse de 239 échantillons fécaux de bovins et ovins. Nos résultats montrent que quelle que soit l'espèce cible étudiée, et quel que soit le parasite recherché, la flottation avec le PTS a une sensibilité significativement supérieure à la méthode de sédimentation de Stoll.

MOTS CLES :

Trématodoses – ovins – bovins - *Fasciola hepatica* - *Calicophoron daubneyi* - *Dicrocoelium lanceolatum* – Polytungstate de sodium – Stoll

TITLE: EVALUATION OF A NEW HEAVY LIQUID FOR THE COPROLOGICAL DETECTION OF TREMATODE INFECTIONS IN RUMINANTS

ABSTRACT:

Ruminants' trematodiasis are common parasitosis, with often an important clinical and economic impact. Diagnostic methods are generally limited to coproscopical examination. Flotation methods involve high density liquids for trematode egg recovering. The sodium polytungstate (SPT) is a heavy liquid, which allows to obtain high density solutions without toxicity issues of other solutions such as the potassium iodomercurate.

The aim of the study is to evaluate the performances of the SPT as a flotation liquid to detect the intestinal parasitic infestations of ruminants, particularly the trematodiasis encountered in metropolitan France (*Fasciola hepatica*, *Calicophoron daubneyi* and *Dicrocoelium lanceolatum*).

In the first part, the review presents the main species of intestinal parasites of sheep and cattle, especially trematodes including available coprological diagnostic methods and their control. The second part is an experimental study, in which 239 fecal samples have been analyzed with two different methods: the flotation technique (McMaster) using SPT, and the Stoll sedimentation method. The two methods' performances were compared, and results showed that the SPT flotation method had a significantly highest sensitivity, for all hosts and all parasites recovered in the study.

KEY WORDS

Trematodiasis – sheep – cattle - *Fasciola hepatica* - *Calicophoron daubneyi* - *Dicrocoelium lanceolatum* – sodium polytungstate – Stoll