

CONTRIBUTION A LA MISE AU POINT D'UN TEST ELISA SUR LE LAIT DE BREBIS POUR LE DIAGNOSTIC DE L'ŒSTROSE OVINE.

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2006
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Nicolas GAUDOUT
Né le 11 août 1979 à LILLE (Nord).

Directeur de thèse : M. le Professeur Michel FRANC

JURY

PRESIDENT :
M. Alexis VALENTIN

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Michel FRANC
M. Guy BODIN

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
M. Hervé HOSTE

Docteur Vétérinaire



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	A. MILON
Directeurs honoraires	M.	G. VAN HAVERBEKE
	M.	J. FERNEY
	M.	P. DESNOYERS
Professeurs honoraires	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	D. GRIESS
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	J. CHANTAL
	M.	J.-F. GUEIFI
	M.	M. EECKHOUTTE

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M.	BRAUN Jean-Pierre, <i>Physique et Chimie biologiques et médicales</i>
M.	CABANIE Paul, <i>Histologie, Anatomie pathologique</i>
M.	DARRE Roland, <i>Productions animales</i>
M.	DORCHIES Philippe, <i>Parasitologie et Maladies Parasitaires</i>
M.	EUZEBY Jean, <i>Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie</i>
M.	TOUTAIN Pierre-Louis, <i>Physiologie et Thérapeutique</i>

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

M.	AUTEFAGE André, <i>Pathologie chirurgicale</i>
M.	BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy, <i>Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie</i>
M.	CORPET Denis, <i>Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires</i>
M.	DELVERDIER Maxence, <i>Anatomie pathologique</i>
M.	ENJALBERT Francis, <i>Alimentation</i>
M.	FRANC Michel, <i>Parasitologie et Maladies Parasitaires</i>
M.	HENROTEAUX Marc, <i>Médecine des carnivores</i>
M.	MARTINEAU Guy-Pierre, <i>Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour</i>
M.	PETIT Claude, <i>Pharmacie et Toxicologie</i>
M.	REGNIER Alain, <i>Physiopathologie oculaire</i>
M.	SAUTET Jean, <i>Anatomie</i>
M.	SCHÉL CHER François, <i>Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour</i>

PROFESSEURS 2^e CLASSE

Mme	BENARD Geneviève, <i>Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale</i>
M.	BERTHELOT Xavier, <i>Pathologie de la Reproduction</i>
M.	CONCORDET Didier, <i>Mathématiques, Statistiques, Modélisation</i>
M.	DUCOS Alain, <i>Zootéchnie</i>
M.	DUCOS de LAHITTE Jacques, <i>Parasitologie et Maladies parasitaires</i>
M.	GUERRE Philippe, <i>Pharmacie et Toxicologie</i>
Mme	HAGEN-PICARD Nicole, <i>Pathologie de la Reproduction</i>
Mme	KOLF-CLAUW Martine, <i>Pharmacie - Toxicologie</i>
M.	LEFEBVRE Hervé, <i>Physiologie et Thérapeutique</i>
M.	LIGNEREUX Yves, <i>Anatomie</i>
M.	PICAVET Dominique, <i>Pathologie infectieuse</i>
Mlle	TRUMEL Catherine, <i>Pathologie médicale des Equidés et Carnivores</i>

INGÉNIEUR DE RECHERCHES

M.	TAMZALI Youssef, <i>Responsable Clinique équine</i>
----	---

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme	MICHAUD Françoise, <i>Professeur d'Anglais</i>
M.	SEVERAC Benoît, <i>Professeur d'Anglais</i>

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

Mlle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
M. NOUVEL Laurent-Xavier, *Pathologie de la reproduction*
M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VOLMER Romain, *Infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. RABOISSON Didier, *Productions animales*

A Monsieur le professeur Alexis VALENTIN

Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Zoologie et Parasitologie.

Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

A Monsieur le professeur Michel FRANCO

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Parasitologie et Maladies parasitaires.

Qui nous fait l'honneur d'accepter la direction de notre travail.

Qu'il trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

A Monsieur le professeur Guy BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie.

Qui nous fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde considération.

A Monsieur le docteur Hervé HOSTE

Chargé de recherche de l'UMR 1225 INRA /DGER
« Interactions Hôte Agents Pathogènes ».

Qui est à l'origine de ce travail, nous a aidé et soutenu.

Qu'il soit assuré de notre profonde gratitude.

A Emilie,

mon amour rencontré sur les bancs de l'école, pour ton soutien de chaque jour, pour tout ce que tu me donnes...

A Clotilde,

ma fille adorée.

A mes parents,

pour les sacrifices que vous avez consenti pour moi, pour votre confiance qui malgré les épreuves ne m'a jamais fait défaut, un merci est bien peu de chose.

A mes grand-pères.

A vous qui n'aviez sans doute pas choisi votre métier d'agriculteur mais qui me l'avez fait découvrir avec passion, à vous avec qui j'ai parcouru les champs et conduit les vaches, c'est en votre souvenir que j'exerce aujourd'hui mon métier avec tant de conviction.

A mes grand-mères,

vous qui êtes le relais de ma mémoire, puissé-je vous serrer encore longtemps dans mes bras.

A ma sœur Céline,

en souvenir de nos jeunes années.

A Léo et Gaby,

pour avoir fini de m'inscrire dans la ruralité, un grand merci.

A Yann, Mochouille et les autres,

à tous nos plaisirs partagés lors de nos années d'étude, en espérant que nos routes se recroisent le plus souvent possible.

A Christelle Duranton - Grisez, Françoise Prévot et Jean Paul Bergeaud,

pour leur aide de chaque jour dans la réalisation de ce projet.

Remerciements :

- Au docteur Anne-Claire RULIE, pour son aide précieuse dans la réalisation des prélèvements.
- A monsieur Jean-Paul GUITARD, responsable du troupeau ovin du lycée agricole de St Affrique et à Christophe PONS, son technicien, pour leur disponibilité et leur gentillesse.
- Aux docteurs Cécile GAYRIN et Corinne VIAL et à monsieur Jean-Marc ARRANZ, du Centre Départemental de l'Élevage Ovin 64, pour leur indispensable soutien dans l'organisation de la campagne de prélèvements.
- A messieurs Pochelu, Laraldia et Christy, éleveurs du Pays Basque, pour nous avoir aimablement permis de travailler sur leurs troupeaux.

**CONTRIBUTION A LA MISE AU POINT D'UN TEST ELISA
SUR LE LAIT DE BREBIS POUR LE DIAGNOSTIC DE
L'ŒSTROSE OVINE.**

Sommaire.

Table des Illustrations.	13
INTRODUCTION.	15
Première partie : Présentation d'<i>Æstrus ovis</i> (Linné 1761).	17
I – Morphologie.	17
I – 1. L'adulte ou imago.	17
I – 2. Larve de première âge (L1).	18
I – 3. Larve de deuxième âge (L2)	18
I – 4. Larve de troisième âge (L3)	18
I – 5. La puppe	18
I – 6. Classification.	20
II – Cycle biologique et épidémiologie.	20
III – Pathogénie et symptomatologie.	22
III – 1. Rôle pathogène.	22
III – 1.1- Action mécanique.	22
III – 1.2- Action phlogogène.	22
III – 2. Symptomatologie.	22
III – 2.1 - Harcèlement des troupeaux par les mouches en été.	22
III – 2.2 - Rhinite estivale.	23
III – 2.3 – Sinusite hivernale.	23
VI – Traitement.	24
VI – 1. Les douvicides.	24
VI – 2. les lactones macrocycliques	24
V – Diagnostic.	25
V – 1. Diagnostic clinique et différentiel.	25
V – 2. Diagnostic nécropsique.	25
V – 3. Diagnostic sérologique.	25
.....	26
Deuxième partie : Généralités et objectifs de l'étude.	27
I – Généralités.	27
II – Objectifs de l'étude.	29
Troisième partie : Matériel et méthodes.	31
I – Animaux.	31
II – Prélèvements.	32
II – 1. Nature des prélèvements.	32
II – 2. problèmes rencontrés.	32
III – Dosage de l'antigène.	33

IV - Protocole expérimental.	33
V – Choix des paramètres techniques du test ELISA lactosérum.	35
V – 1. Dilution de l'échantillon.	35
V – 2. Choix du seuil de positivité.	35
V – 3. Témoins positif et négatif.	35
VI – Outils statistiques.	36
VI – 1. Outils utilisés pour notre étude.	36
VI – 2. Caractéristiques d'un test diagnostic – Définition.	36
 Quatrième partie : Présentation des résultats.	 38
I – Etude du groupe R1.	38
II – Etude du groupe R2.	38
III – Elevage aveyronnais.	39
IV – Elevages du Pays Basque.	41
V – Corrélations entre les titres anticorps du tank et les moyennes des titres individuels lactosérum.	45
VI – Sensibilité et Spécificité de la technique sur le lait en comparaison à la technique sur le sang.	45
 Cinquième partie : Discussion.	 47
I – Validation de la méthode mise au point.	47
II – Utilisation de la méthode mise au point dans des suivis épidémiologiques.	50
II – 1. Suivi épidémiologique de l'œstrose.	50
II – 2. Intérêt de l'étude sur le lait de tank.	52
 CONCLUSION	 53
 Bibliographie.	 55

Table des Illustrations.

Figures.

Figure 1 : Représentation d'un adulte.	17
Figure 2 : Pièces buccales atrophiées d'un adulte.	17
Figure 3 : Photographie d'une larve de premier âge (L1).	19
Figure 4 : Photographie de larves de deuxième et troisième âge (L2 et L3).	19
Figure 5 : Photographie d'une larve de troisième âge (L3).	19
Figure 6 : Photographie d'une pupa.	19
Figure 7 : Cycle évolutif schématisé d' <i>Æstrus ovis</i>	21
Figure 8 : Représentation de deux populations distinctes pour le paramètre utilisé.	27
Figure 9 : Représentation de deux populations indissociables pour le paramètre utilisé.	28
Figure 10 : Représentation classique des populations de positif et de négatif pour le paramètre utilisé.	28
Figure 11 : Cinétique des anticorps sérum et lactosérum dans le groupe R1.	38
Figure 12 : Présentation des moyennes de DO et valeur de tank dans l'élevage aveyronnais.	40
Figure 13 : Comparaison des taux de positifs obtenus avec les techniques sérum et lactosérum dans l'élevage aveyronnais.	40
Figure 14a : Présentation des moyennes de DO lactosérum et sérum, et des valeurs de tank, pour l'élevage B1.	42
Figure 14b : Présentation des moyennes de DO lactosérum et sérum, et des valeurs de tank, pour l'élevage B2.	42
Figure 14c : Présentation des moyennes de DO lactosérum et sérum, et des valeurs de tank, pour l'élevage B3.	42
Figure 15a : Comparaison des taux de positifs obtenus avec les techniques sérum et lactosérum dans l'élevage B1.	43
Figure 15b : Comparaison des taux de positifs obtenus avec les techniques sérum et lactosérum dans l'élevage B2.	44
Figure 15c : Comparaison des taux de positifs obtenus avec les techniques sérum et lactosérum dans l'élevage B3.	44

Tableaux.

Tableau 1 : Méthodes de calcul des paramètres d'un test de dépistage par rapport à une méthode de référence.	36
Tableau 2 : Présentation des résultats d'autopsie et des titres anticorps des brebis du groupe R2.	39
Tableau 3 : Présentation des moyennes de DO sérum et lactosérum dans l'élevage aveyronnais et coefficients de corrélations des données individuelles.	41
Tableau 4 : Présentation des moyennes de DO sérum et lactosérum dans les trois élevages du Pays Basque et coefficients de corrélation des données individuelles.	45
Tableau 5 : Présentation des paramètres intrinsèques et extrinsèques du test ELISA lait en comparaison à l'ELISA sérum utilisée comme méthode de référence.	46

INTRODUCTION.

L'œstrose est une affection parasitaire provoquée par les larves d'une mouche, *Æstrus ovis* (Linné, 1761), qui se développent dans les cavités nasales et sinuales des petits ruminants.

Le diagnostic en est difficile et trop souvent tardif. Pour résoudre cette carence, des techniques ELISA sur le sérum de brebis ont été développées. Elles permettent de mesurer des taux individuels d'immunoglobulines de type G (IgG) : les antigènes utilisés sont soit des produits d'excrétion purifiés de larves, soit des composants généraux issus de broyats de larves à divers stades de développement.

La méthode ELISA développée par Yilma [43] dans notre laboratoire et qui utilise pour antigène des extraits non purifiés de larves L2 donne des résultats pertinents en terme de sensibilité et de spécificité d'un test de diagnostic de l'œstrose.

Cependant, l'utilisation comme fluide biologique du sérum présente des inconvénients qui limitent l'utilisation de cette méthode ELISA en pratique courante :

- la réalisation de prélèvement de sang de qualité nécessite du temps, une bonne contention des animaux et une dextérité technique faisant défaut à l'éleveur moderne qui travaille souvent seul.
- la conservation d'un prélèvement de sang nécessite sa centrifugation préalable à sa congélation. Le lait peut quant à lui être directement congelé.
- le diagnostic ELISA de l'œstrose n'a que peu d'intérêt au niveau individuel et l'appréciation du statut sérologique du troupeau nécessite le prélèvement d'un échantillon représentatif du troupeau en terme d'effectif, de classe d'âge et de stade physiologique.

Le lait est à ces égards un fluide biologique bien plus intéressant : il est facile d'accès pour l'éleveur en troupeau laitier et reste même plus accessible en troupeau allaitant. De plus, le lait de tank présente l'intérêt d'être le reflet de l'ensemble du troupeau et il est d'ailleurs à ce titre largement utilisé dans l'espèce bovine pour le diagnostic collectif de maladies telles que l'IBR ou encore la fasciolose.

Nous avons donc entrepris, en partant des travaux réalisés par Yilma [43] sur le sérum, de mettre au point une méthode ELISA de dépistage de l'œstrose à partir du lait de brebis.

Afin de valider l'outil de diagnostic mis au point, nous réalisons une étude épidémiologique de l'œstrose au cours d'une saison de production dans les deux principaux bassins français de production de lait de brebis, nous permettant de comparer les résultats obtenus sur sérum et sur lactosérum.

Enfin, nous tenterons d'évaluer l'intérêt de l'utilisation du lait de tank dans le diagnostic de troupeau de l'œstrose ovine.

Première partie : Présentation d'*Æstrus ovis* (Linné 1761).

I – Morphologie.

I – 1. L'adulte ou imago.

Difficile à observer, il s'agit d'une mouche de 10 à 12 mm de longueur dont l'appareil buccal est rudimentaire et non fonctionnel (Figure 2). En effet, les adultes ne se nourrissent pas au cours de leur vie d'imago qui n'excède guère une quinzaine de jours en conditions naturelles. La tête est globuleuse. Le thorax, gris bleuté, présente quatre bandes noirâtres longitudinales et mal délimitées, ainsi que de nombreux petits tubercules noirs (Figure 1). L'abdomen, gris-jaunâtre, laisse apparaître un oviscape effilé chez la femelle qui permet une différenciation aisée du sexe de l'individu. Les ailes, transparentes, sont marquées de trois taches blanches à leur base.

Figure 1 : Représentation d'un adulte. (Zumpt F. [44])

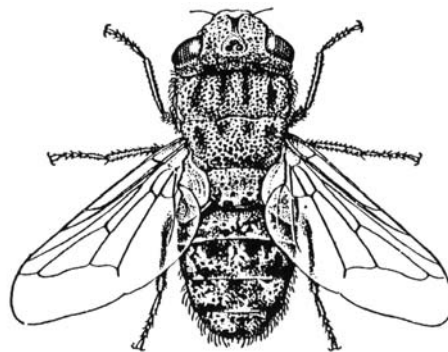
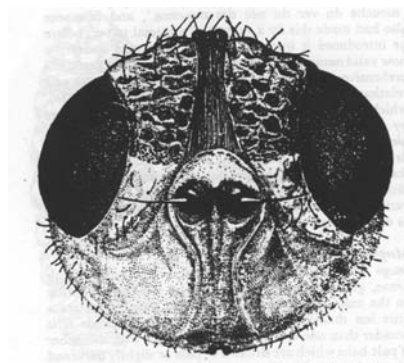


Figure 2 : Pièces buccales atrophiées d'un adulte. (Zumpt F.)



I – 2. Larve de premier âge (L1).

Elle est fusiforme, longue de 1 à 2 mm, translucide ou blanchâtre [42], [30]. Elle est munie, à l'avant, de deux crochets buccaux puissants ainsi que d'épines cuticulaires sur chacun des anneaux qui composent son corps [25]. Ces appendices facilitent ses déplacements et sa fixation dans la muqueuse nasale de l'hôte (Figure 3).

I – 3. Larve de deuxième âge (L2) .

Elle est blanc-jaunâtre et longue de 3 à 12 mm [30], [42]. Ses crochets sont moins puissants et ses épines beaucoup moins nombreuses que sur la L1 [25]. L'extrémité postérieure porte deux stigmates arrondis et brunâtres en forme de « D », percés de nombreux orifices (Figure 4).

I – 4. Larve de troisième âge (L3) .

Elle s'apparente morphologiquement à une L2 de grande taille (2 à 3 cm de longueur pour 6 à 10 mm de largeur). Cependant, sa forme est nettement hémicylindrique, due à sa face ventrale plane. La couleur varie selon l'âge : d'abord blanc-jaunâtre, son tégument dorsal s'obscurcit rapidement par bandes transversales [30]. Son dernier anneau constitue une chambre stigmatique à plaques pentagonales percées de nombreux pertuis, caractéristique des diptères de la famille des œstridés (Figure 5).

I – 5. La pupe .

De même forme que la larve L3, bien qu'un peu plus petite (15 à 16 mm de longueur), elle est de couleur noire [30]. L'éclosion de l'adulte se fait à l'extrémité antérieure par une ouverture circulaire, caractéristique des diptères de la section des cycloraphes (Figure 6).

Figure 3 : Photographie d'une larve de premier âge (Dorchies Ph. [15]).

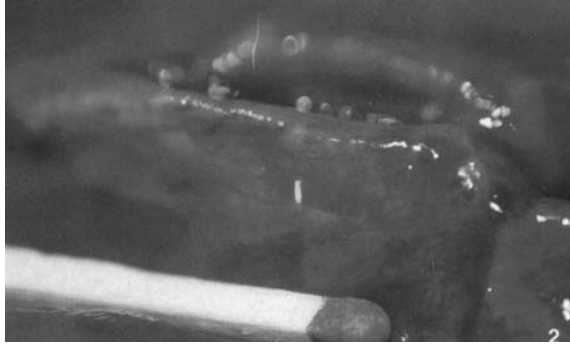


Figure 4 : Photographie de larves de deuxième et troisième âge (Dorchies Ph.).

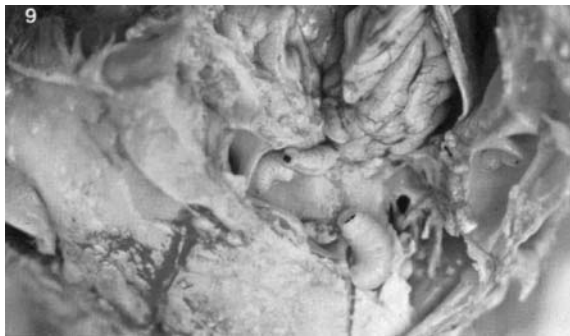


Figure 5 : Photographie d'une larve de troisième âge (Dorchies Ph.).



Figure 6 : Photographie d'une puce.(Dorchies Ph.)



I – 6. Classification.

Les différents détails morphologiques précités permettent de préciser la position systématique de l'espèce *Æstrus ovis* au sein de la classe des insectes [43] :

Ordre des Diptères : Insectes à deux ailes membraneuses

Sous-Ordre des Brachycères : Antennes plus courtes que la tête

Section des Cyclorhaphes : Branche postérieure de la nervure cubitale très courte et ouverture circulaire de la puppe.

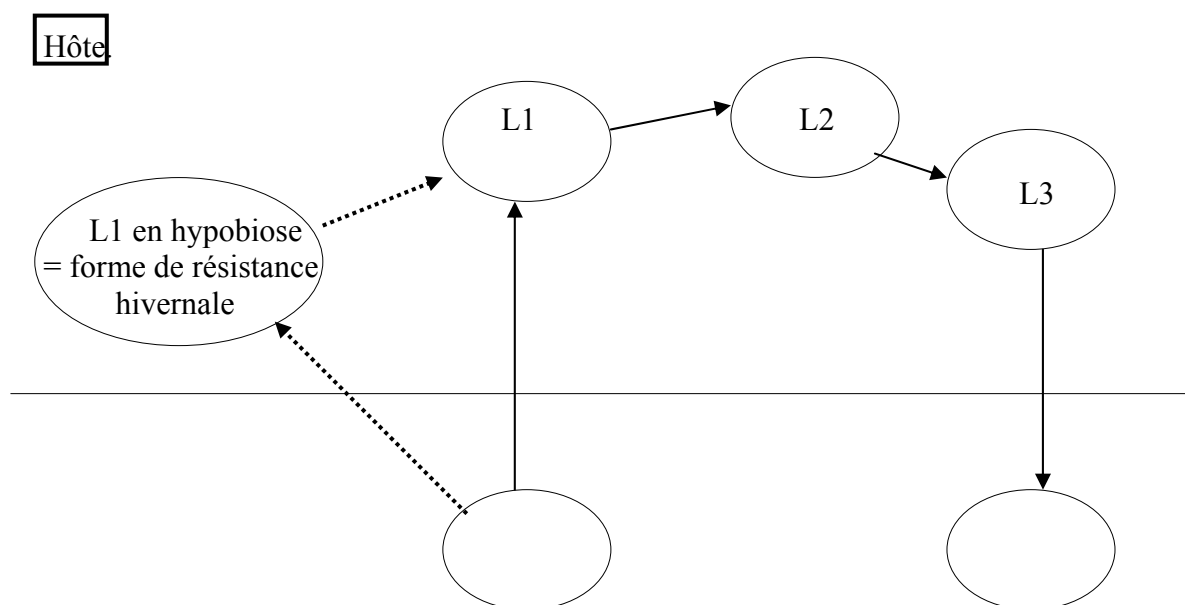
Sous-Section des Calyptères : Abdomen avec 4 segments apparents

Groupe des Œstroïdés : Trompe et bouche atrophiées.

Famille des Œstridés : Larves parasites de grands vertébrés.

Genre *Æstrus* : Cellule apicale de l'aile fermée.

II – Cycle biologique et épidémiologie.



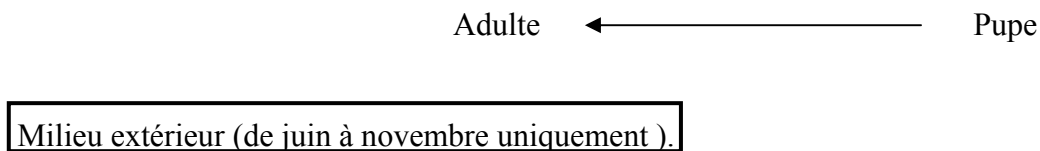


Figure 7 : Cycle évolutif schématique d'*Oestrus ovis*.

Les mouches adultes sont vivipares et déposent les larves à l'orifice des naseaux du mouton, de la chèvre et parfois dans les yeux de l'homme [23], [9]. Les larves du premier âge migrent activement dans les voies respiratoires supérieures où elles séjournent de 2 semaines à 10 mois (hypobiose ou non). Elles colonisent ensuite les sinus frontaux et elles muent en larves de deuxième puis de troisième âge (2 semaines à 1 mois). Les L3 mûres reviennent dans les cavités nasales d'où elles sont expulsées par les éternuements. Elles tombent sur le sol et s'enterrent pour se transformer en puppe. La période pupale dure de 30 à 34 jours.

Le mouton et la chèvre sont les hôtes préférentiels. L'homme est un hôte accidentel chez lequel les larves, souvent déposées au niveau des yeux [9] [23], ne dépassent guère le premier âge .

La durée du cycle varie selon la saison et les pays. Lorsque les conditions optimales sont réunies, l'évolution de la L1 à la L3 est de 4 semaines [30], [8]. Quand les conditions climatiques sont défavorables : température trop basse (hiver des pays tempérés méditerranéens) ou humidité trop faible (saison sèche des pays sahéliens), les L1 entrent en hypobiose. Leur développement est alors provisoirement arrêté au premier stade. Cette hypobiose est d'ordre physiologique et ne dépend pas de l'immunité de l'hôte : des essais de transfert de L1 de moutons naturellement infestés et donc ayant une certaine réaction immunitaire, à des agneaux indemnes non immunisés, n'ont pas permis d'observer une reprise de la maturation des larves [43]. Cela confirme le rôle de la saison dans l'arrêt du développement. En France, les L1 redeviennent majoritaires courant septembre avant d'entrer en hypobiose, bien que des variations selon les régions existent [17].

La vie imaginale d'*O. ovis* dépend aussi de la température et varie de quelques jours à deux mois [42]. En France, l'éclosion des premiers adultes a lieu au cours du mois de juin [9], parfois un peu plus tôt. Plusieurs générations se succèdent au cours d'une même saison d'activité. Dès que les femelles éclosent, elles se dirigent vers un site de rassemblement (interstices des murs...), géographiquement élevé, où les rejoignent les mâles. Après la fécondation, les femelles s'envolent vers l'hôte recherché, dans un rayon de 500 mètres environ [38], tandis que les mâles restent à la même place, attendant d'autres femelles.

La succession des générations de mouche au cours d'une même saison explique que l'on trouve fréquemment différents stades larvaires dans les cavités nasales de l'hôte. Cependant, seules des larves de premier stade assurent la continuité de l'espèce pendant la période d'hypobiose.

III – Pathogénie et symptomatologie.

III – 1. Rôle pathogène.

III – 1.1- Action mécanique.

La population larvaire est à l'origine des principales nuisances observées. En effet, lors de l'infestation, les larves L1 irritent la muqueuse avec leurs crochets buccaux et leurs épines cuticulaires au cours de leur ascension dans les voies nasales. Les L2 sont plus fixes et les dégâts engendrés moindres. Ce sont ensuite les L3, lors de leurs retours aux marges du nez, qui relancent les irritations. Les agressions continues des muqueuses nasales et pituitaires provoquent une intense inflammation congestivo-hémorragique et exsudative qui assurent l'alimentation des larves. Secondairement à cet affaiblissement des défenses primaires de l'hôte, des surinfections bactériennes à l'origine de bronchopneumonies sévères peuvent apparaître [19]. Cependant, les signes cliniques associés sont inconstants et, en début d'évolution de l'œstrose, la réaction inflammatoire est souvent sans commune mesure avec le faible nombre de L1 présentes.

III – 1.2- Action phlogogène.

L'œdème et la congestion importante de la pituitaire dans les cas de pauci-infestation par les œstres ont fait suspecter la participation d'un phénomène d'hypersensibilité dans le développement des manifestations pathologiques. Les produits d'excrétion-sécrétion des larves induisent localement des manifestations allergiques de type 1 auxquelles participent une importante population de mastocytes et d'éosinophiles [35], [22]. Ces cellules sont retrouvées de façon plus abondante dans le chorion sous épithélial, proche des parasites, que dans la sous-muqueuse [36]. La muqueuse des sinus, où ont lieu les mues L1-L2 et L2-L3 est également plus fortement infiltrée que la muqueuse des cornets et cavités nasales où se trouvent les L1, [15], [43].

Parallèlement à cette hypersensibilité, les produits d'excrétion-sécrétion relargués lors des mues successives induiraient chez l'hôte une immuno-dépression, démontrée in vitro par une diminution de synthèse d'ions nitreux chez les phagocytes [21], [15]. Ceci expliquerait la plus grande sensibilité de l'hôte à des pathologies pulmonaires infectieuses lors de parasitisme par *Oestrus ovis* [10], [19].

III – 2. Symptomatologie.

III – 2.1 - Harcèlement des troupeaux par les mouches en été.

En France, les premières mouches éclosent à partir du mois de mai et surtout en juin. Elles recherchent alors activement un hôte pour y déposer leurs larves ; elles sont surtout actives aux heures les plus chaudes de la journée, mais ne pénètrent jamais dans les bâtiments. Ainsi, seuls les troupeaux ayant accès à un parcours extérieur entre 11 heures et 18 heures sont réellement concernés par l'œstrose.

En début de saison, les mouches étant peu nombreuses, les brebis sont peu incommodées. Elles se répartissent uniformément sur le pâturage et il est difficile de soupçonner la présence

des œstres. Rapidement, la population de parasites adultes s'accroît et les brebis adoptent alors un comportement de défense. Sans cesse harcelées, les brebis tentent de se prémunir en gardant le nez près du sol ou dans la toison d'un congénère. Le troupeau est alors entièrement regroupé et aucune tête n'est visible [8]. Certaines brebis présentent déjà quelques étternuements dus aux irritations par les premières L1. Ce comportement permet certes aux brebis de se protéger mais les empêchent de pâturer librement, réduisant ainsi leur ingestion et donc probablement leur production. Si Horak [27] montre l'impact négatif de l'œstrose sur la croissance des agneaux, une étude récente dans le bassin de Roquefort n'a pas pu démontré un effet significatif de l'infestation par *Oestrus ovis* sur la production laitière [5].

III – 2.2 - Rhinite estivale.

Quelques semaines après les premières pontes, la présence des L1 induit une inflammation à l'origine d'écoulements séreux bilatéraux chez de nombreuses brebis. L'irritation mécanique provoque des étternuements de plus en plus fréquents. La rhinite ne tarde pas à survenir, avec un écoulement séro-muqueux, parfois purulent, voire hémorragique. L'expression clinique est variable, elle dépend surtout de la sensibilité individuelle aux phénomènes allergisants et aux surinfections bactériennes, mais assez peu du niveau d'infestation. Les brebis les plus atteintes, présentent une forte gêne respiratoire limitant la rumination et la prise de nourriture. De plus le développement des larves est responsable de la spoliation de l'hôte [27]. En cas d'infestation massive, on observe parfois des symptômes nerveux, de type amaurose et pertes d'équilibre [42]. A partir du mois d'août, les signes cliniques commencent à régresser du fait de l'entrée en hypobiose des larves.

A l'autopsie, tous les stades larvaires sont présents. La muqueuse pituitaire est congestionnée et plus ou moins œdématisée, les sinus et l'ethmoïde sont également concernés. Cependant, l'intensité des lésions n'est pas liée au nombre de larves présentes.

III – 2.3 – Sinusite hivernale.

En début d'hiver, les manifestations de l'œstrose sont discrètes et seuls quelques étternuements peuvent trahir la présence d'œstres au sein du troupeau : les larves L1 sont en diapause. Sous nos latitudes, c'est en février-mars que les L1 reprennent leur activité : deux mues successives ont lieu dans les sinus. Les brebis ressentent alors une forte gêne : les animaux appuient fréquemment leur tête contre les murs et ont en tous cas un port de tête anormal. Les écoulements nasaux muco-purulents bilatéraux reprennent également. Les étternuements sont plus rares qu'en été. Les signes cliniques s'estompent un à deux mois plus tard, lorsque toutes les L3 ont été rejetées.

A l'autopsie, les lésions les plus sérieuses, de type congestivo-hémorragiques, sont surtout observées au niveau des sinus.

VI – Traitement.

VI – 1. Les douvicides.

Le Nitroxynil (Dovenix®) et le Closantel (Flukiver® ; Seponver®) sont des douvicides efficaces qui ont une forte affinité pour les protéines plasmatiques. Certains parasites hématophages : *Hæmonchus contortus*, *Bunostomum spp* et les larves d'*Æsophagostomum* ou d'autres consommant des sérosités, comme *Æstrus ovis*, sont sensibles à ces substances qui provoquent le découplage de la phosphorylation oxydative [11],[12].

Le Closantel, dérivé des Salicylanilides, peut être administré à la dose de 10 mg/kg par voie buccale ou 5 mg/kg en injection sous cutanée. Il a une activité immédiate parasiticide et une rémanence prolongée. Son administration, une première fois en cours d'été aux premiers signes de rhinite puis deux mois plus tard, permet un excellent contrôle de l'œstrose [2],[34].

Le Nitroxinil, dérivé du Nitrophénol, est administré par voie sous cutanée à la dose de 20 mg/kg. Per os il est inactif car il est métabolisé par les bactéries du rumen [2].

VI – 2. Les lactones macrocycliques.

Elles agissent par libération de taux élevés d'un neurotransmetteur spécifique, l'acide-gamma-aminobutyrique (GABA) et par augmentation de la fixation de celui-ci à ses récepteurs post-synaptiques, ce qui induit l'ouverture des canaux des ions Cl⁻ et une réduction des fonctions cellulaires. Le résultat est une paralysie et, finalement, la mort du parasite.

L'Ivermectine, à la dose de 0,2 mg/Kg, par voie injectable (Ivomec®...) ou par voie orale (Oramec®), a une efficacité totale sur les nématodes gastro-intestinaux et pulmonaires ainsi que sur certains ectoparasites, notamment sur les larves d'*Oestrus ovis*, car elles se nourrissent de sérosités contenant le principe actif [14], [6].

La Moxidectine, à la dose de 0,2 mg/Kg en injection a un effet comparable et a probablement une rémanence importante [10].

Cependant, toutes ces molécules sont inutilisables au cours de la lactation. Une étude récente a montré l'efficacité de l'éprinomectine (Eprinex®) pour-on vis à vis d'*Oestrus ovis* [26]. C'est, à l'heure actuelle, le seul représentant de la famille des lactones macrocycliques à posséder une AMM en France chez la vache en lactation, mais pas encore chez la brebis. Cependant en l'absence de spécialité efficace autorisée, cette molécule semble la plus prometteuse pour le traitement des ovins en lactation, en application du principe de la « cascade » [5] .

V – Diagnostic.

V – 1. Diagnostic clinique et différentiel.

La constatation, pendant la belle saison, de la gêne provoquée par les mouches fait suspecter l'œstrose. De même, les éternuements, le jetage nasal bilatéral et l'absence d'hyperthermie sont caractéristiques de l'œstrose qui doit être distinguée d'autres étiologies telles :

- La rhinite causée par la poussière des chemins qui provoque des éternuements. Ces derniers cessent lorsque la poussière a disparu.

- La dictyocaulose (*Dictyocaulus filaria*) et les Protostrongylinoses qui se traduisent cliniquement par de la bronchite et des bronchopneumonies responsables de toux mais sans éternuements.

- La Coenurose cérébrale (*Cœnurus cerebralis*) facile à distinguer par la prédominance des troubles nerveux et les perturbations de la vision (nyctagmus ...). Cette cestodose larvaire ne provoque pas de jetage et elle est maintenant rarissime en France.

- La listériose par ses manifestations encéphaliques évoque aussi certains signes de l'œstrose .

- L'adénocarcinome de la pituitaire est responsable d'un écoulement nasal séreux très fluide et très abondant : son aspect et sa quantité excluent toute confusion .

V – 2. Diagnostic nécropsique.

Le diagnostic de certitude ne peut être posé que post-mortem par la mise en évidence de larves d'*Æstrus ovis* présentes dans les cavités nasales et les sinus frontaux.

Il est bien évident que ce diagnostic ne peut-être appliqué en élevage pour lui-même car il nécessite l'abattage de plusieurs animaux pour être concluant et son coût devient alors prohibitif.

V – 3. Diagnostic sérologique.

Des tests d'hémagglutination passive ont été mis au point lors de différentes études mais les résultats de spécificité et de sensibilité présentés sont disparates et souvent faibles. Cette technique n'est que peu utilisée.

La méthode ELISA, sur sérum, est actuellement la plus utilisée pour le dépistage de l'œstrose [43], [24], [7]. Sa grande sensibilité permet de suivre la cinétique d'apparition des anticorps spécifiques. Sur le même principe que l'ELISA, un Dot- ELISA a été mis au point [20], il permet une simplification de la méthode ELISA.

Deuxième partie : Généralités et objectifs de l'étude.

I – Généralités.

- Genèse d'un test diagnostic :

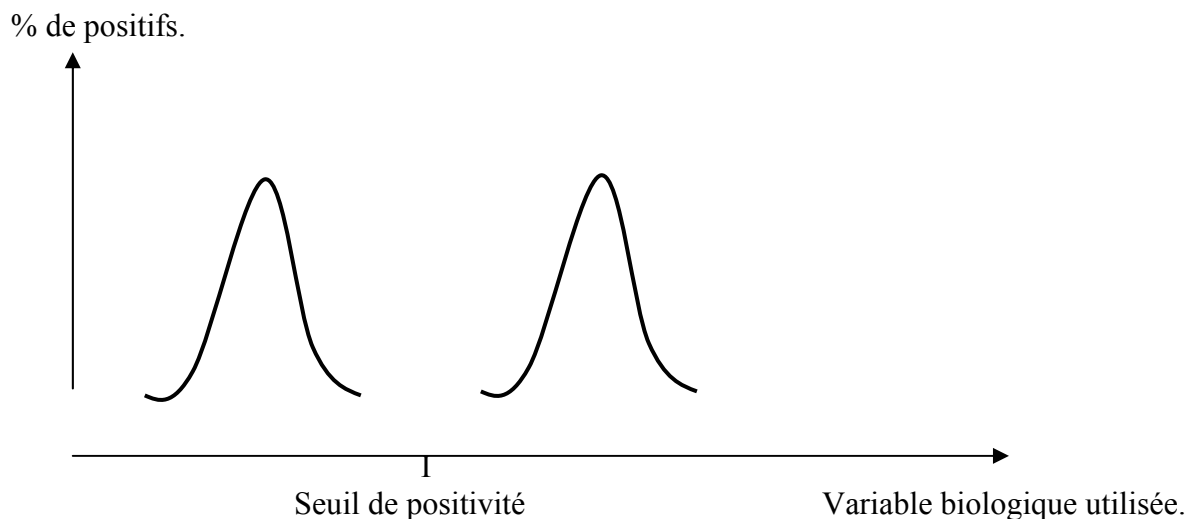
Un test diagnostic utilise une valeur biologique numérique afin d'évaluer de manière indirecte et simple si un individu est malade ou non, porteur potentiel ou non d'un agent pathogène. La principale difficulté réside dans la détermination du seuil de positivité : au dessus de cette valeur seuil, tout animal sera déclaré positif. Or, compte tenu de la variabilité des réponses biologiques de chaque individu, on ne peut éviter quelques réponses faussement positives ou faussement négatives par rapport à la réalité.

Il est couramment admis que dans une population bien définie, l'ensemble des valeurs individuelles obtenues pour une variable biologique décrit une loi normale, ce qui rend compte de la variabilité de réponse entre individus.

Nous nous intéressons ici à deux populations distinctes : celle des individus malades et celle des individus sains. Trois cas de figures peuvent alors se présenter.

- le cas idéal : les lois normales représentant l'ensemble des valeurs de ces deux populations ne se chevauchent pas.

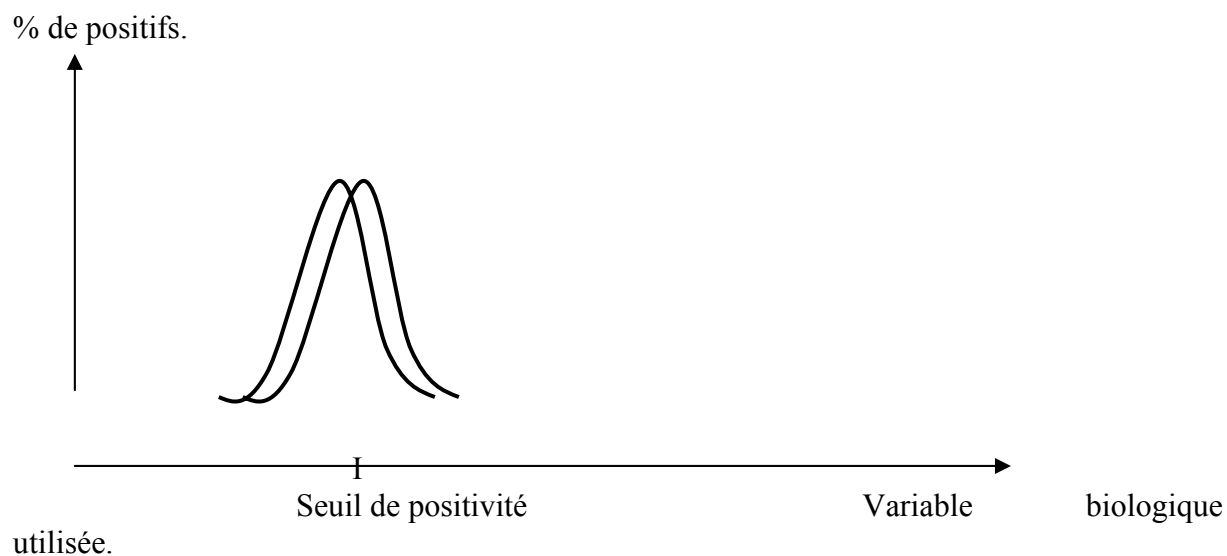
Figure 8 : Représentation de deux populations distinctes pour le paramètre utilisé.



Le seuil de positivité est facile à déterminer et on ne rencontre aucun faux positif ni faux négatif : en biologie cette situation ne se rencontre jamais.

- le cas non interprétable: les lois normales représentant les valeurs des deux populations se chevauchent fortement.

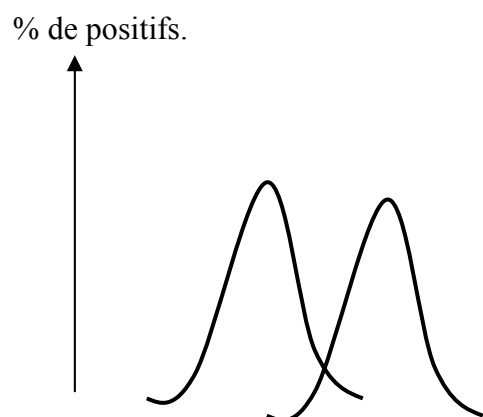
Figure 9 : Représentation de deux populations indissociables pour le paramètre utilisé.



Il apparaît tout de suite que ce test donne beaucoup de faux positif et de faux négatif. Sa sensibilité et sa spécificité sont donc mauvaises : la variable biologique utilisée n'est pas pertinente pour la question posée.

- le cas le plus fréquent : les lois normales représentant les valeurs des deux populations se chevauchent peu.

Figure 10 : Représentation usuelle des populations de positif et de négatif pour le paramètre utilisé.





Quel que soit le seuil de positivité choisi, on obtient toujours des faux positifs et des faux négatifs, mais les caractéristiques du test sont acceptables.

- Détermination des caractéristiques d'un test diagnostic :

Le choix du seuil de positivité apparaît déterminant pour la qualité d'un test. On choisit le plus souvent un seuil de positivité dit « technique » : à partir d'un échantillon représentatif de la population des animaux sains, et en admettant que l'ensemble des valeurs recueillies pour cette population suit une loi normale, on peut déterminer une valeur de la variable utilisée qui sera supérieure ou égale aux réponses de 95% des individus sains, avec la formule :

$$X = \text{moyenne de l'échantillon} + 3 \text{ écarts-type.}$$

Certes il est possible d'aller plus loin : si $X = \text{moyenne} + 4 \text{ écarts-type}$, le seuil de positivité est supérieur ou égal aux résultats de 99% des individus sains : le test donnera peu de faux positifs, la spécificité sera bonne, mais à l'inverse, puisque les lois normales se superposent toujours partiellement, on obtiendra beaucoup de faux négatifs, au détriment de la sensibilité. Or, l'intérêt d'un test diagnostic reste avant tout de détecter les positifs !!

Lorsque le choix du seuil de positivité est effectif, il convient de déterminer les caractéristiques intrinsèques et extrinsèques du test pour valider ou non son intérêt. Pour ce faire, il faut comparer les résultats obtenus avec la réalité : on fait alors référence au « Golden Standard », qui correspond à la méthode directe, dite méthode de référence, dans la détermination des malades et des sains. Dans le cas d'infestations parasitaires par des métazoaires, ce golden standard passe généralement par des autopsies d'animaux pour mesurer le nombre de parasites présents.

II – Objectifs de l'étude.

L'objectif de cette étude est donc de mettre au point une méthode ELISA utilisant le lait de brebis afin de rendre le diagnostic de l'œstrose plus accessible aux éleveurs et aux vétérinaires. Pour se faire, notre travail suit un développement logique afin d'aboutir à la validation de ce nouveau test diagnostic.

Il convient tout d'abord d'élaborer et de décrire une méthodologie répétable dans le temps et applicable par tout laboratoire disposant des équipements nécessaires à la réalisation d'un ELISA :

- choix et obtention d'un antigène,
- détermination de la dilution de lactosérum à utiliser lors de la sensibilisation,

- détermination d'un seuil de positivité de la variable biologique utilisée par notre test, à partir d'un groupe d'animaux indemne d'œstrose.

A la suite de cette étape de mise au point technique, nous avons vérifié le bon fonctionnement de notre méthode ELISA sur un petit groupe d'animaux (groupe R1). Les données obtenues ont permis d'envisager une étude à plus large échelle.

Nous avons ensuite utilisé l'outil développé au cours de suivis épidémiologiques préliminaires dans les deux bassins français de production de lait de brebis : en Aveyron (élevage A) et dans le pays basque (élevages B1, B2 et B3). Nous y avons effectué en parallèle des prélèvements de sang et de lait afin d'obtenir un nombre suffisant de données pour comparer les résultats obtenus par les deux méthodes ELISA.

A la suite du recueil de ces données, nous pouvons évaluer notre test en déterminant ses paramètres intrinsèques et extrinsèques, en comparaison au test ELISA sur le sérum. Nous tentons également cette évaluation en comparaison à la méthode de référence de diagnostic de l'œstrose qui correspond à l'autopsie des animaux (groupe R2). Enfin, en complément de notre étude, nous avons ébauché une comparaison de la moyenne des résultats individuels de chaque troupeau avec les valeurs obtenues sur le lait de tank correspondant.

Troisième partie : Matériel et méthodes.

I – Animaux.

Notre étude, menée le premier semestre de l'année 2002, a porté sur environ un millier de données, prélevées sur différents groupes d'animaux.

Dans le but de déterminer le seuil de positivité technique du test lactosérum, trente prélèvements de lait ont été réalisés sur des brebis assurément indemnes d'œstrose, puisque jamais sorties au pâturage, afin de constituer un pool d'échantillons négatifs. Ces antennaises, issues de l'élevage aveyronnais A, ont été prélevées en tout début de lactation (janvier 2002).

Une pré-étude a été réalisée sur 16 brebis de réforme, issues d'un exercice d'enseignement du service de pathologie de la reproduction (travaux pratiques de césarienne) de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT). Ces brebis ont été entretenues et prélevées chaque semaine pendant dix semaines (en mars et avril 2002), avant d'être restituées au service de pathologie de la reproduction. Lors du septième prélèvement, les brebis ont été déparasitées avec une lactone macrocyclique, efficace contre l'œstrose (Oramec®). Ces brebis, appelées groupe « **R1** », ont été maintenues avec leurs agneaux, ce qui nous a permis d'entretenir leur lactation.

Les autres animaux sont issus de quatre élevages, dont les effectifs varient de 250 à 350 brebis, situés dans les deux bassins majeurs de production de lait de brebis : Roquefort et Pays Basque. Au sein de ces élevages, 60 brebis, tirées au sort, ce qui représente entre un quart et un sixième de l'effectif de chaque élevage, ont été régulièrement prélevées.

L'élevage « **A** » est issu du bassin aveyronnais, situé dans la région sud du massif central, entièrement dévolue à la production du fromage de Roquefort. La collecte du lait y a lieu de début janvier à la fin juillet. Cinq séries de prélèvements ont été effectués aux dates suivantes : 30/01- 12/03- 12/04- 12/05- 12/06. Un groupe de 14 brebis de réforme a également été acquis dans cet élevage A en juillet 2002. Ce groupe, appelé « **R2** », a été prélevé en juillet 2002, puis sacrifié et autopsié afin de dénombrer les larves d'*Æstrus ovis* présentes.

Les trois autres élevages, appelés « **B1, B2 et B3** », sont issus du Pays Basque, deuxième bassin de production laitier, situé dans les Pyrénées (essentiellement sur les départements des Hautes Pyrénées et des Pyrénées atlantiques). La production de lait y est utilisée dans l'élaboration de fromages locaux (Etorki et fromages des Pyrénées). Trois séries de prélèvements ont été réalisés : les 15/02- 29/03- 15/05 de l'année 2002 : ces élevages ont donc été suivis pendant trois mois.

Il est à noter que les prélèvements ont été moins nombreux dans les élevages du pays basque car ce sont là de « vrais élevages » où notre étude, coûteuse en temps et en main d'œuvre, bouleverse les plannings, à plus forte raison en fin de campagne de ramassage du lait, lorsque démarrent les travaux des champs. En Aveyron, nous étions accueillis dans la ferme expérimentale d'un lycée agricole où ces problèmes sont moins aigus, ce qui nous a permis d'effectuer des prélèvements mensuels.

L'ensemble des prélèvements réalisés nous a donc permis de traiter un nombre conséquent de données d'environ 980.

II – Prélèvements.

II – 1. Nature des prélèvements.

Nous avons réalisé deux prélèvements par brebis et par date :

- un prélèvement de 5 mL de sang à la veine jugulaire sur tube sec. Chaque prélèvement est centrifugé dans les trois jours à 2000 tours par minute pendant deux minutes, à 15°C. Le sérum obtenu est ensuite congelé à - 18°C, en attendant les analyses.
- un prélèvement de 30 mL de lait est réalisé à la main en salle de traite, avant le branchement de la machine à traire. Ce lait est ensuite ramené dans les 48 heures à Toulouse, ou congelé si la durée d'acheminement est plus longue. Décongelé à température ambiante, il est immédiatement traité pour obtenir du lactosérum. Pour ce faire, nous additionnons 50 µL de présure de veau à 15 mL de lait. L'ensemble est centrifugé à 3500 tours/minutes, pendant 10 à 15 minutes à 37°C. Le lactosérum est récupéré, puis congelé à - 18°C, en attente d'analyse.

II – 2. Problèmes rencontrés.

Nous pouvions nous attendre à recueillir environ un millier de données, cependant, nous n'avons pu en exploiter que 850 environ. Deux raisons expliquent ces divergences.

Les prélèvements s'effectuent au cours de la traite à un rythme soutenu, afin de ne pas rallonger le temps de traite du troupeau. Ainsi quelques prélèvements de sang ou de lait ne sont parfois pas réalisés. De plus, les brebis suivies ne sont pas toujours présentes ou disponibles : les brebis malades ne sont pas prélevées, mais sont réintégrées dans l'étude le mois suivant. Quelques brebis sont également mortes au cours de la période de prélèvement et ne sont pas remplacées.

Certains prélèvements de lait ne permettent pas d'obtenir du lactosérum en quantité normale et suffisante : après centrifugation, nous obtenons un magma épais ne présentant qu'une seule phase, ou très peu de lactosérum. Ces prélèvements sont écartés. Ces difficultés sont attribuées à des mammites débutantes ou en fin d'évolution. La modification du lait, bien

que non perceptible lors de la traite, nous empêche d'obtenir un caillé ferme et un lactosérum exploitable.

III – Dosage de l'antigène.

Nous avons choisi d'utiliser pour antigène de l'extrait brut de L2 car, bien que parfois contesté [29], il a donné de bons résultats pour YILMA [43], dont nous avons adapté le protocole ELISA. Des études montrent que des extraits protéiques purifiés issus des produits d'excrétion-sécrétion ou de composants cuticulaires des larves donnent également des bons résultats [40], [28], [39], [29].

Vingt larves L2, récoltées sur des têtes de brebis provenant de l'abattoir de Pamiers ont été broyées et homogénéisées dans 20 mL d'une solution « tampon-phosphate » (PBS) à pH 7.2, en utilisant un broyeur dans de la glace. Le broyat a été centrifugé à 10 000 g à 4°C pendant 30 minutes. Les protéines du surnageant ont été dosées grâce à la méthode de Lowry [33] sur micro-plaques NUNC ELISA, avec de l'albumine bovine (BCA protein Assay Reagent, PIERCE-ROCKFORD, USA) comme référence. La densité optique a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption à 570 nanomètres. La concentration de l'antigène était de 3278 µgrammes/mL. L'extrait antigénique a ensuite été conservé à -70°C, en aliquot, jusqu'à son utilisation.

IV - Protocole expérimental.

Ces travaux sur le lait de brebis font suite à ceux de Yilma [43] qui sont à l'origine de la mise au point de la méthode ELISA sérum vis à vis d'*Æstrus ovis* chez la brebis. Nous détaillerons donc le protocole utilisant le sérum pour ensuite mettre en avant les adaptations qui ont été nécessaires à la mise au point du test sur le lait.

- Microplaques :

Nous utilisons des microplaques 96 puits (Microwell NUNCLON, fond plat, sans couvercle, ref. polylabo 13123). Les puits des lignes supérieures et inférieures sont inutilisés car les résultats à la lecture y sont peu précis. Chaque échantillon à tester est déposé dans trois puits en colonne (triplicata).

- Sensibilisation :

Nous déposons dans chaque puit 100 μL d'une solution antigénique à 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les plaques sont placées pendant une heure à l'étuve à 37°C, en chambre humide. Les plaques, couvertes, sont ensuite laissées toute une nuit au réfrigérateur à 4°C, afin d'être utilisées le lendemain matin. Elles sont alors vidées puis rincées par trois fois avec du PBS Tween 20 à 0.1%.

- Saturation :

Afin de saturer les sites laissés vacants par l'antigène, nous utilisons du lait demi-écrémé Régilait® à 10% en PBS Tween 20 à 0.1%, à raison de 200 μL par puit. Les plaques restent alors pendant 30 minutes à l'étuve à 37°C, en chambre humide. Les plaques sont ensuite simplement vidées.

- Sérums :

Ils sont dilués au 1/200^{ème} dans du PBS Tween 20 à 0.1% et 100 μL sont distribués dans chaque puit. Les plaques sont placées pendant une heure à l'étuve à 37°C, en chambre humide, puis vidées et rincées trois fois au PBS Tween 20 à 0.1%.

Rq : nous distribuons pour chaque plaque un témoin positif, un négatif et un blanc.

- Immunoconjugaison :

Chaque puit reçoit 100 μL de peroxydase conjuguée à l'anti-immunoglobuline G d'ovins, dilué au 1 millième en tampon carbonate. Les plaques sont placées pendant une heure à l'étuve à 37°C, en chambre humide, puis vidées et rincées trois fois au PBS Tween 20 à 0.1%.

- Révélation :

Chaque puit reçoit 100 μL de révélateur ABTS (Ethylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) préparé extemporanément à raison de 100mL de citrate Buffer pour un comprimé de 2,2'-azino-bis et 25 microlitre d' H_2O_2 à 10 volumes. Les plaques sont ensuite placées pendant une heure à l'étuve à 37°C, en chambre humide.

- Arrêt de la réaction :

Les plaques sont ensuite placées pendant 15 minutes à 6°C.

- Les témoins :

Pour chaque série de mesure, nous utilisons un témoin positif et un témoin négatif dont les densités optiques sont connues, ils seront comparés à l'ensemble des résultats de la série.

Nous utilisons également un témoin blanc qui permet de vérifier l'absence de résultats non spécifiques.

- Lecture :

La mesure de la densité optique (DO) est réalisée au spectrophotomètre à 405 nm.

V – Choix des paramètres techniques du test ELISA lactosérum.

V – 1. Dilution de l'échantillon.

La méthode que nous avons adoptée est très proche de celle utilisée pour le sérum : seule l'étape de dépôt de l'échantillon varie. En effet, en lieu et place du sérum dilué au 1/200^{ème}, nous utilisons 100 µL de lactosérum pur. Il faut dire que plusieurs essais de dilution sur le lactosérum ont été réalisées et que le choix s'est porté sur du lactosérum pur car, outre la facilité de mise en œuvre, nous obtenons ainsi une large répartition des valeurs de densité optique mesurées par le test, tout en conservant des valeurs très faibles chez les animaux négatifs. Nous espérons ainsi majorer la précision des mesures de densité optique de notre méthode.

V – 2. Choix du seuil de positivité.

Pour choisir un seuil de positivité technique de la méthode, nous avons extrapolé la valeur en dessous de laquelle se trouve la majorité des valeurs négatives.

Considérant que l'ensemble des valeurs obtenues, par ce test, dans une population animale indemne d'œstrose, suit une loi normale, une formule mathématique nous permet d'obtenir cette valeur = moyenne des valeurs de la population + 3 écarts-types. 95% des résultats obtenus dans cette population sont inférieurs à cette valeur.

Pour notre étude nous avons réalisé un échantillonnage de la population indemne comprenant 30 individus choisis au hasard. Après application du test lactosérum, nous obtenons pour cet échantillon les valeurs suivantes (exprimées en densité optique) :

$$\begin{aligned} \text{Moyenne} &= 0,0303. \\ \text{Ecart-type} &= 0,0249. \end{aligned}$$

Soit un seuil de positivité technique de :

$$\text{Seuil de positivité} = 0,0303 + 3 \times 0,0249 = \mathbf{0,105}.$$

Ce seuil nous a servi pour classer positivement ou négativement les animaux selon leur valeur individuelle de densité optique obtenue par notre méthode .

V – 3. Témoins positif et négatif.

Afin de maîtriser au cours du temps la qualité de nos mesures, nous avons choisi de toujours utiliser les mêmes témoins négatifs et positifs, en sérum et en lactosérum. Ceci ont été conservés en aliquot à -70°C durant toute la durée de notre étude. Ainsi une variation importante des valeurs de densité optique obtenues pour les témoins nous permet de suspecter un problème dans la réalisation d'un lot de mesures.

VI – Outils statistiques.

VI – 1. Outils utilisés pour notre étude.

Pour les trois études (groupe R1, Aveyron et Pays Basque), les valeurs individuelles obtenues sur les sérums et les lactosérums ont été comparées en calculant le coefficient de corrélation de Pearson, à chaque date. Ce coefficient de corrélation a également été calculé entre les titres mesurés sur les prélèvements de lait de tank et sur les moyennes des valeurs individuelles correspondantes.

Afin d'obtenir une estimation d'ensemble de la correspondance entre les deux méthodes ELISA, la sensibilité et la spécificité de la méthode ELISA sur les titres « lait » ont été calculées en comparaison avec la méthode ELISA « sérologique », considérée ici comme la méthode de référence.

VI – 2. Caractéristiques d'un test diagnostic – Définition.

Tableau 1: Méthodes de calcul des paramètres d'un test de dépistage par rapport à une méthode de référence.

		ELISA lactosérum	
		+	-
Test de référence	+	VP	FN
	-	FP	VN

VP = Vrai Positif.
FN = Faux Négatif.

FP = Faux Positif.
VN = Vrai Négatif

- Paramètres intrinsèques :

- Sensibilité (Se) : aptitude d'un test à fournir une réponse positive chez un animal infecté. On l'obtient par le calcul suivant :

$$Se = VP / (VP + FN).$$

- Spécificité (Sp) : aptitude d'un test à fournir une réponse négative chez un individu sain. On l'obtient par le calcul suivant :

$$Sp = VN / (VN + FP).$$

Ces deux données sont exprimées en pourcentage: il est couramment admis qu'un bon test diagnostic possède une sensibilité et une spécificité supérieures ou égales à 80%.

- Paramètres extrinsèques :

- Valeur prédictive positive (VPP) : elle se définit comme la proportion de vrais positifs parmi toutes les réponses positives. Elle dépend donc de la spécificité et de la sensibilité du test, mais aussi de la prévalence de l'affection recherchée . On l'obtient par le calcul suivant :

$$VPP = VP / (VP+FP)$$

- Valeur prédictive négative (VPN) : elle se définit comme la proportion de vrais négatifs parmi toutes les réponses négatives. Elle dépend donc de la sensibilité et de la spécificité du test, mais aussi de la prévalence de l'affection recherchée. On l'obtient par le calcul suivant :

$$VPN = VN / (VN+FN)$$

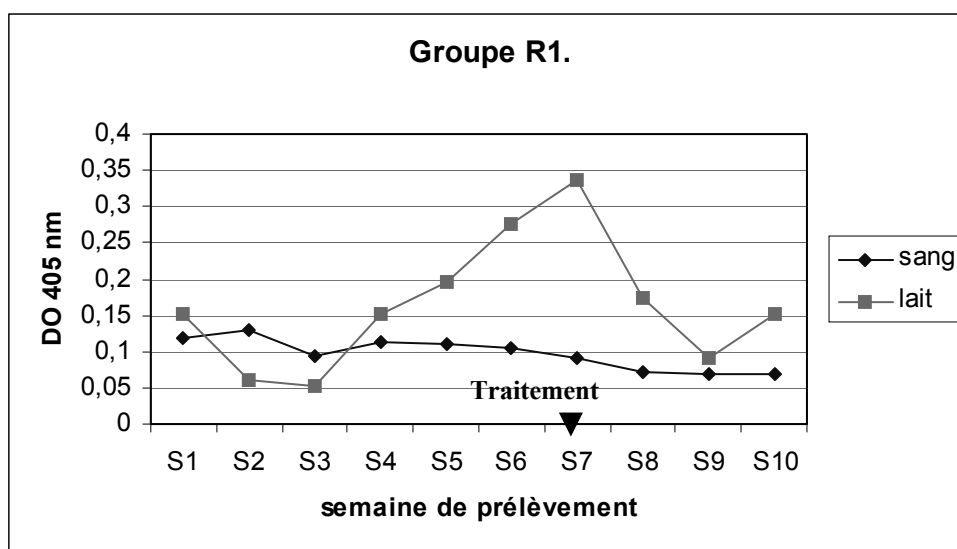
Ces deux paramètres s'expriment en pourcentage. On cherche pour un bon test à en obtenir des valeurs élevées. Cependant ces valeurs sont également influencées par la prévalence de la maladie recherchée : ainsi une faible prévalence favorise une VPN élevée. Tandis qu'une forte prévalence favorise une VPP élevée.

Quatrième partie : Présentation des résultats.

I – Etude du groupe R1.

L'évolution des titres d'anticorps sur les sérums et lactosérums individuels prélevés sur les brebis issues de l'ENVT est présentée dans la Figure 11. Alors que la mise en place du traitement après la septième semaine est associée à une diminution du taux d'anticorps dans le lait, cette variation est moins prononcée pour le sérum. Le coefficient de corrélation entre les titres « sang » et « lait » a été calculé : $r = +0.386$ ($n = 70$; $P < 0.01$). Pour le calcul de ce coefficient de corrélation, nous ne disposons que de 70 données, car plusieurs agneaux étant morts, leurs mères se sont tarées.

Figure 11 : Cinétique des anticorps sérum et lactosérum dans le groupe R1.



Après cet essai préliminaire sur un petit nombre d'animaux vérifiant la relation des valeurs obtenues sur les deux fluides biologiques, « l'outil » semble prêt pour une comparaison à plus large échelle.

II – Etude du groupe R2.

Lors de l'autopsie des brebis du groupe R2, six brebis présentent des larves d'*Æstrus ovis* à différents stades de développement (Tableau 2). Trois seulement sont positives pour les techniques sang et lait. Les trois autres sont négatives pour les deux techniques et ne

présentent que des larves au premier stade de développement. Les huit brebis ne présentant pas de larve sont négatives pour les deux techniques ELISA.

Tableau 2 : Présentation des résultats d'autopsie et des titres anticorps des brebis du groupe R2.

Numéro	LAIT	SERUM	Larves présentes		
			L1	L2	L3
79	Négatif	Négatif	10		
108	Négatif	Négatif			
137	Positif	Positif		2	
141	Négatif	Négatif			
687	Négatif	Négatif	2		
738	Positif	Positif		1	2
764	Négatif	Négatif			
824	Négatif	Négatif	1		
869	Négatif	Négatif			
897	Négatif	Négatif			
941	Négatif	Négatif			
943	Positif	Positif		1	
4120	Négatif	Négatif			
4122	Négatif	Négatif			

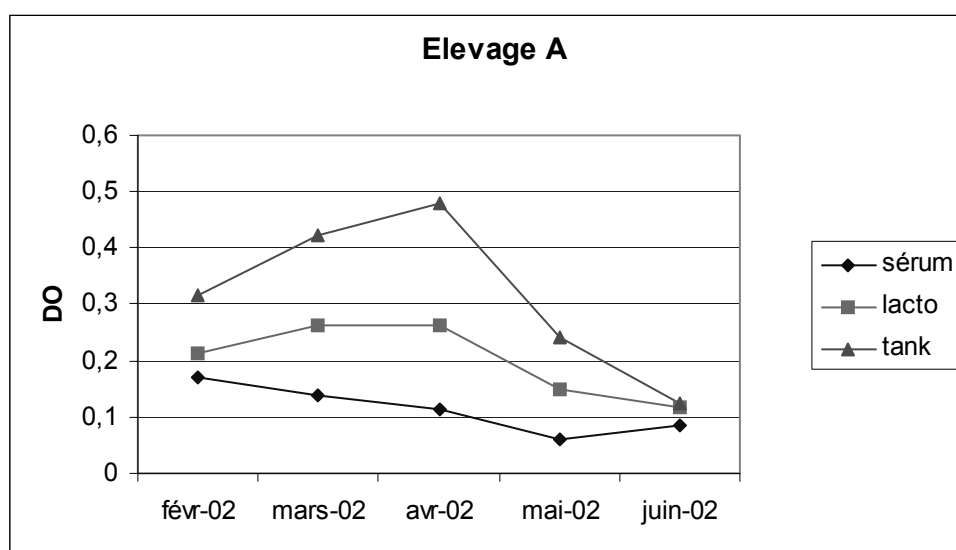
Les résultats obtenus par les deux techniques ELISA sont rigoureusement identiques. Une divergence est obtenue avec les résultats d'autopsie est observée que nous évaluons par le calcul des paramètres du test lactosérum en comparaison avec ces autopsies :

Sensibilité : 50%
 Spécificité : 100%
 Valeur prédictive positive : 100%
 Valeur prédictive négative : 73%

III – Elevage aveyronnais.

La figure 11 présente les cinétiques d'anticorps sérum et lactosérum au cours de la lactation. On observe une décroissance globale des moyennes de DO au cours de la période de prélèvement. Ces moyennes restent cependant toujours supérieures aux seuils de positivité laissant présager une forte prévalence de l'œstrose dans cet élevage.

Figure 12 : Présentation des moyennes de DO et valeur de tank dans l'élevage aveyronnais.



Ce sentiment est confirmé par la figure 12 qui présente les taux de positivité pour les deux techniques à chaque date : ces taux sont toujours supérieurs à 35%. On note que les résultats obtenus par les deux méthodes sont très proches même si la prévalence estimée à partir du lait est souvent supérieure à celle obtenue sur le sang. Les coefficients de corrélation entre les valeurs individuelles de DO sang et lait sont présentées dans le tableau 3. Le coefficient de corrélation global est $r = +0.74$ ($n=212$; $P<0.01$).

Figure 13 : Comparaison des taux de positifs obtenus avec les techniques sérum et lactosérum dans l'élevage aveyronnais.

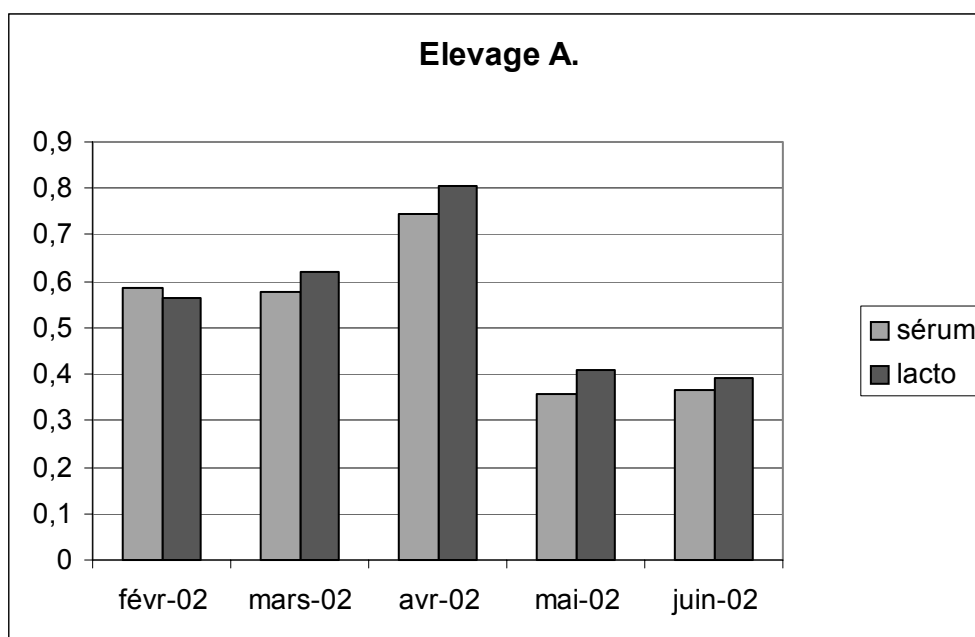


Tableau 3 : Présentation des moyennes de DO sérum et lactosérum dans l'élevage aveyronnais et coefficients de corrélations des données individuelles.

	2002				
	Février	Mars	Avril	Mai	Juin
Sérum	0,1695	0,1397	0,114	0,061	0,0841
Lait	0,2130	0,2622	0,2612	0,1489	0,1184
Lait de tank	0,315	0,360	0,478	0,243	0,295
Coefficient de corrélation r	0,819	0,657	0,783	0,807	0,781
n	40	43	44	36	41
	**	**	**	**	**

NB : les valeurs de DO du lait de tank à chaque date de prélèvement sont également indiquées. Signification statistique des coefficients de corrélation : * $P < 0,05$; ** $< 0,01$.

IV – Elevages du Pays Basque.

La figure 13 présente les cinétiques d'anticorps sérum et lactosérum pour les trois élevages de ce bassin de production. Pour les élevages B1 et B3, les courbes des deux techniques suivent globalement les mêmes variations, les moyennes de DO étant toujours supérieures aux seuils de positivité. Dans l'élevage B2, les variations des moyennes de DO sont beaucoup plus faibles (l'échelle graphique est plus petite) : les valeurs obtenues à chaque date sont inférieures aux seuils de positivité des deux techniques.

Figure 14a : Présentation des moyennes de DO lactosérum et sérum, et des valeurs de tank, pour l'élevage B1.

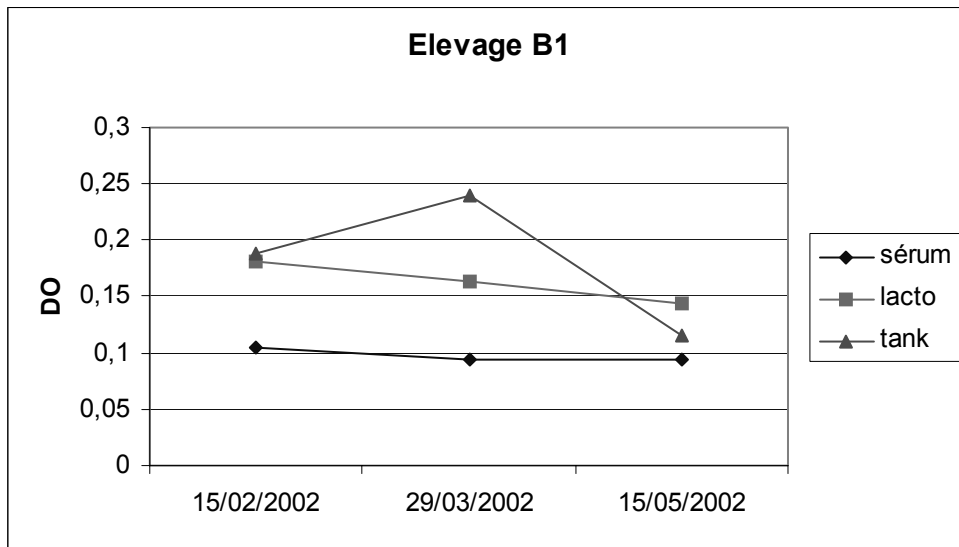


Figure 14b : Présentation des moyennes de DO lactosérum et sérum, et des valeurs de tank, pour l'élevage B2.

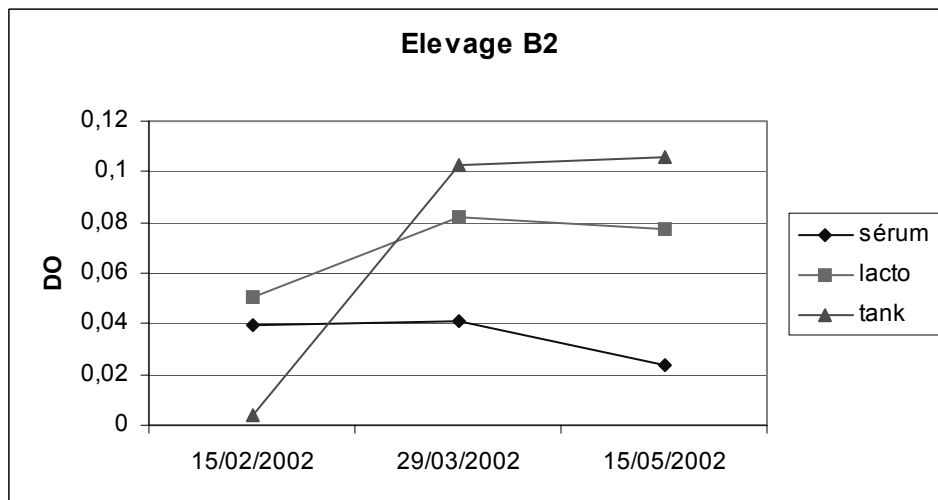
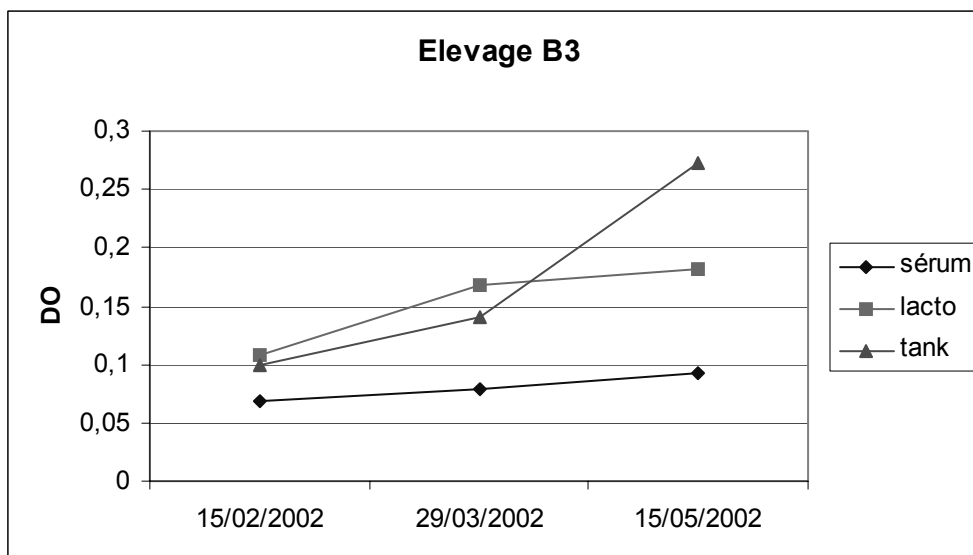


Figure 14c : Présentation des moyennes de DO lactosérum et sérum, et des valeurs de tank, pour l'élevage B3.



Cette différence entre fermes est confirmée lorsque l'on observe les données de prévalence (figure 15). Dans l'élevage B2, le taux de positif quelle que soit la technique ne dépasse pas les 30% alors que pour les élevages B1 et B3, la prévalence est toujours supérieure à 30%.

Quel que soit le taux de prévalence, on constate que les résultats obtenus par les deux techniques sont comparables et les écarts constatés sont toujours inférieurs à 10 points. Cependant, la prévalence obtenue à partir de la technique lactosérum est régulièrement supérieure à celle obtenue à partir de la technique sérum.

Figure 15a : Comparaison des taux de positifs obtenus avec les techniques sérum et lactosérum dans l'élevage B1.

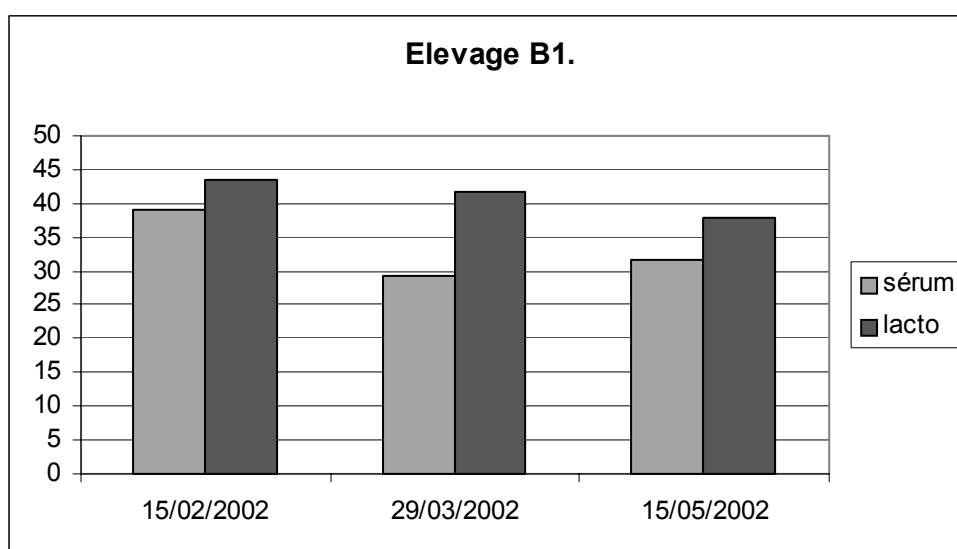


Figure 15b : Comparaison des taux de positifs obtenus avec les techniques sérum et lactosérum dans l'élevage B2.

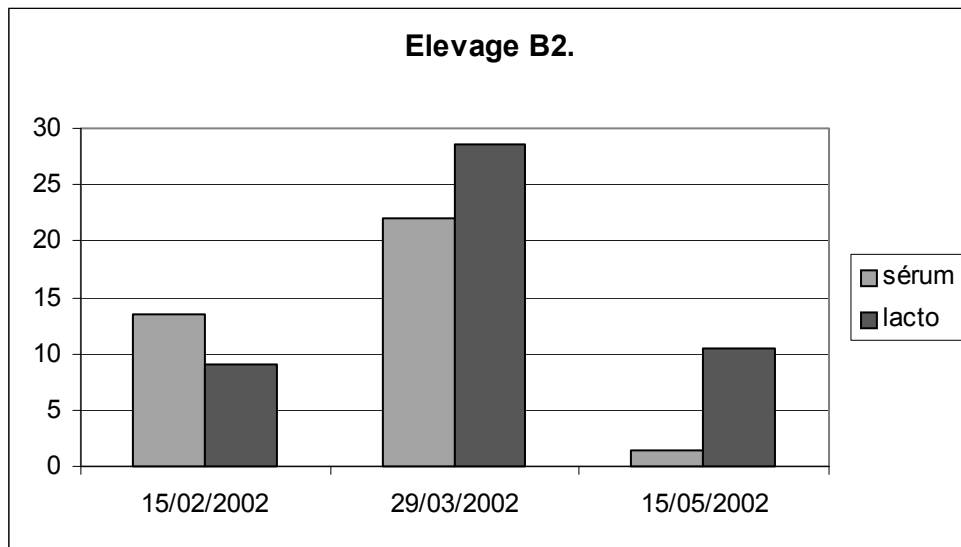
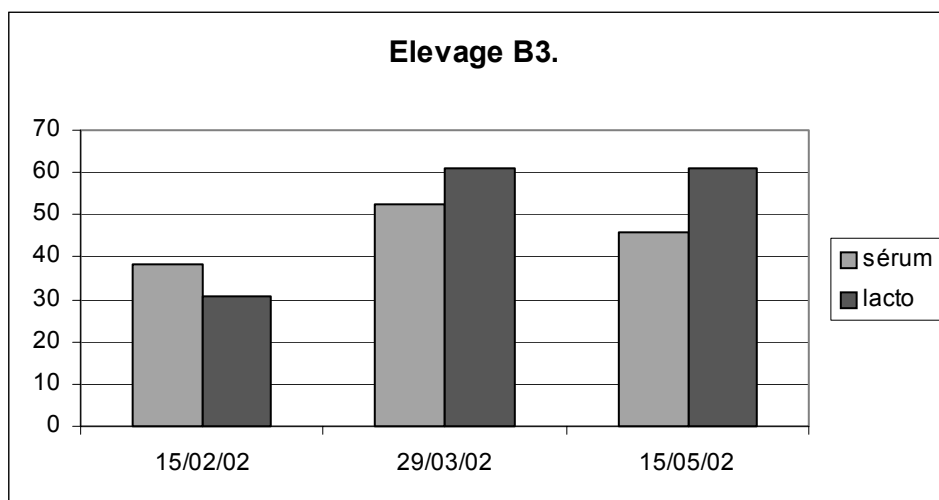


Figure 15c : Comparaison des taux de positifs obtenus avec les techniques sérum et lactosérum dans l'élevage B3.



Les coefficients de corrélations individuels calculés date par date pour les trois fermes sont présentés dans le tableau 4. Nous obtenons ainsi des résultats significatifs sauf dans l'élevage B2, à la première date. En réunissant les données de ces trois élevages, on obtient un coefficient de corrélations entre les résultats obtenus par ces deux techniques tel que

$$r = +0.476 (n = 480 ; P < 0.01)$$

même si on constate une grosse différence entre ferme puisque bien qu'étant significatif, les coefficients de corrélation de chaque ferme varient de 0.846 pour l'élevage B1, à 0.244 et 0.106 pour les élevages B3 et B2.

Tableau 4 : Présentation des moyennes de DO sérum et lactosérum dans les trois élevages du Pays Basque et coefficients de corrélation des données individuelles.

	Elevage B2			Elevage B1			Elevage B3		
	Février	Mars	Mai	Février	Mars	Mai	Février	Mars	Mai
Sérum	0,039	0,041	0,024	0,104	0,095	0,094	0,073	0,080	0,092
Lait	0,050	0,082	0,077	0,183	0,164	0,144	0,144	0,168	0,183
Lait de tank.	0,004	0,103	0,106	0,189	0,239	0,116	0,102	0,140	0,272
Coefficient de corrélation r	0,057	0,303	0,319	0,867	0,767	0,936	0,380	0,410	0,769
ddl	53	56	55	52	53	54	33	57	55
	ns	*	*	**	**	**	*	**	**

NB : les valeurs de DO du lait de tank à chaque date de prélèvement sont également indiquées. Signification statistique des coefficients de corrélation : *P<0,05 ; **<0,01.

V – Corrélations entre les titres anticorps du tank et les moyennes des titres individuels lactosérum.

Le coefficient de corrélation entre les DO obtenues sur les échantillons de lait de tank et les moyennes de DO obtenues sur les prélèvements individuels de lait donne la valeur suivante (tableau 3 et 4) :

$$r = +0.829 (n = 14 ; P < 0.01).$$

VI – Sensibilité et Spécificité de la technique sur le lait en comparaison à la technique sur le sang.

Le tableau 5 présente une synthèse de l'ensemble des données recueillies lors de cette étude. On y trouve les valeurs intrinsèques du test ELISA lait en comparaison avec le test sur le sang qui représente notre test de référence.

Nous obtenons une sensibilité de 80.5% et une spécificité de 85%.

Tableau 5 : Présentation des paramètres intrinsèques et extrinsèques du test ELISA lait en comparaison à l'ELISA sérum utilisée comme méthode de référence.

	Pays Basque	Aveyron	TOTAL
Sensibilité	75	87,2	80,5
Spécificité	86,8	84,3	85
VPP	61,8	63,55	60,5
VPN	92,4	95,45	93,9
n	487	360	847

Cinquième partie : Discussion.

I – Validation de la méthode mise au point.

I – 1. Critiques techniques.

Malgré l'intérêt de l'ELISA sur sérum, son utilisation pour le diagnostic de l'œstrose n'est pas courante. Cela est dû pour partie aux contraintes liées aux prélèvements. En effet, pour être intéressante, cette recherche doit être réalisée sur un échantillon représentatif du troupeau, soit au moins 10 à 20 prélèvements. De plus, la technicité des prises de sang requiert la présence de personnel assurant la contention, ce qui alourdit le coût de l'analyse. Enfin, ces prélèvements sont à acheminer rapidement au laboratoire afin d'éviter l'hémolyse qui, en colorant le sérum, altère les résultats obtenus par ELISA.

Le lait est bien plus accessible pour l'éleveur : il peut le recueillir seul en salle de traite, sans que cette opération soit coûteuse en temps ou en main d'œuvre, et cela sans stress pour les animaux. Ces prélèvements peuvent être congelés dans la foulée pour un acheminement différé au laboratoire sans risque d'altération des résultats. Des démarches comparables à la nôtre ont d'ailleurs été entreprises avec de bons résultats, concernant le diagnostic des nématodoses [31] et de la fasciolose [3] par ELISA sur le lait de vache. Enfin, l'utilisation du lait offre aussi la possibilité de travailler sur lait de tank qui offre plusieurs avantages : facile et rapide, elle permet avec un seul prélèvement de représenter l'ensemble du troupeau.

Dans un but de simplification de la méthode, l'utilisation du lait comme liquide biologique est donc intéressante. Toutefois, elle rencontre aussi quelques difficultés techniques. En effet, les protéines du lait entrent en compétition avec les anticorps pour l'adhésion aux antigènes. Le lait est d'ailleurs habituellement utilisé dans les techniques ELISA sérum pour saturer les sites antigènes laissés vacants après l'étape de dépôt du sérum, dite de sensibilisation. Le lait ne peut donc être utilisé directement pour l'ELISA. L'obtention de lactosérum, emprisonnant les protéines insolubles dans le caillé et ne laissant en solution que les immunoglobulines, permet de résoudre le problème.

L'obtention d'un lactosérum clair suite à un caillage efficace du lait est donc une condition *sine qua non* de la réalisation des tests. Sur environ, un millier de prélèvement de lait, une cinquantaine n'ont pu être exploités de ce fait : ces échecs sont attribués à des mammites débutantes sur les animaux prélevés ou à un tarissement en cours. Il est donc à noter que si le prélèvement de lait est plus facile à obtenir, il doit être réalisé dans de bonnes conditions pour être exploitable, et que la présence d'infections mammaires subcliniques est suspectée d'altérer la réalisation et l'interprétation du test.

I – 2. Validation statistique.

Les paramètres du test que nous avons mis au point, ont été comparés avec le test ELISA sur le sérum. Toutefois, il faut rappeler que ce test sur sérum est également une estimation indirecte de la prévalence de l'œstrose. Pour affiner les paramètres de notre test, il conviendrait de le comparer au « golden standard » qui correspond au test direct de mesure de la prévalence de l'œstrose, c'est à dire le comptage des larves *d'Oestrus ovis* présentes dans les cavités nasales et sinusales des brebis. Cela passe par l'abattage des animaux et par la fente de tête. Cette comparaison au golden standard est donc difficilement réalisable à grande échelle ce que la valeur d'une brebis laitière en lactation ne permet pas raisonnablement d'envisager. Nous avons cependant pu réaliser cette approche sur un petit groupe d'animaux destinés à la réforme.

Pour quatorze animaux abattus, six présentaient des larves *d'Oestrus ovis*. Seuls trois de ces animaux porteurs se sont révélés positifs en ELISA sang et lait. Les huit brebis ne présentant pas de larve étaient aussi négatives aux tests ELISA. La spécificité du test ELISA lait est donc de 100% tandis que sa sensibilité n'est que de 50%. Cependant, les trois animaux déclarés négatifs par l'ELISA n'étaient infestés que par des larves au premier stade de développement tandis que les trois autres présentaient des larves à tous les stades. Nous pouvons donc supposer que ces trois animaux faux négatifs étaient sujet d'une contamination récente qui n'a pas laissé le temps de développer une immunité humorale et une synthèse d'anticorps de type G détectable par méthode ELISA.

En effet, notre technique permet la révélation des immunoglobulines de type G (IgG) et pas de type M (IgM), certes plus précoces, mais aussi plus fugaces puisque ne persistant en général que 15 jours lors d'une stimulation antigénique appropriée. Cela met en évidence les limites de l'ELISA qui ne met en évidence une stimulation antigénique qu'avec un délai de deux à quatre semaines. L'utilisation de notre test doit donc se raisonner à l'échelle d'un troupeau afin d'être pertinente. En effet, le prélèvement de plusieurs animaux permet de s'affranchir de cette période de 15 jours où le test ne détecte pas encore la présence du parasite [41].

L'étude de ce petit groupe d'animaux autopsiés, même si elle correspond à la comparaison idéale de notre test au golden standard reflétant la réalité des infestations, ne peut qu'illustrer un début de validation de la méthode mise au point mais demeure très préliminaire. En effet, le faible effectif de cette étude ne permet en aucun cas de tirer des conclusions générales sur notre travail bien que les résultats obtenus semblent relativement convaincants. Cependant, lors d'une démarche similaire visant à valider les tests sur sérum, en comparaison des niveaux d'infestations révélés sur plus d'un millier d'autopsies [1], des difficultés similaires d'interprétation des résultats des tests ELISA sérum ont été constatées. Aucune corrélation significative n'a pu être observée entre les titres individuels d'anticorps et le nombre de larves trouvées dans les cavités nasales par autopsie. De plus, des variations de la sensibilité et de la spécificité de la méthode ont été observées entre les données recueillies en hiver ou en été. Cette variabilité est probablement à mettre en relation avec les caractéristiques saisonnières de la biologie du parasite, notamment l'hypobiose des L1 en hiver. Les données ici obtenues comparant les résultats nécropsiques et des tests ELISA sur le lait ne permettent pas de répondre à ces questions, puisque ces données ont été recueillies sur un nombre limité de brebis laitières, en été seulement, puisque ces brebis ont été acquises en fin de campagne de lactation, alors qu'elles étaient destinées à la réforme. Du fait de leurs

valeurs économiques élevées, il est particulièrement difficile d'obtenir des informations sur un nombre suffisant d'autopsies de ces brebis laitières afin d'apporter une démonstration plus directe de la relation entre les titres dans le lait et les niveaux d'infection. Les résultats de notre étude, bien que réalisée sur un nombre réduit, suggèrent donc que les limites constatées pour la méthode ELISA sur le sérum existent également avec la mesure des anticorps dans le lait.

La comparaison avec les résultats du test ELISA sérum visait à évaluer l'outil innovant développé à celui habituellement employé et offrait l'avantage de pouvoir disposer d'un nombre suffisant de données pour évaluer correctement notre outil.

Nous constatons d'emblée, sur les cinétiques d'anticorps, des évolutions comparables des moyennes de densité optique obtenues par les deux techniques (figure 11, 12 et 14). Toutefois, les valeurs dans le lait semblent décrire des variations plus marquées que dans le sang. Cela s'explique certainement par le choix de ne pas diluer l'échantillon de lactosérum lors de l'étape de sensibilisation: nous obtenons ainsi une échelle des réponses en densité optique qui est de plus du double de celle obtenue avec la technique sur sérum. Nous en avons d'ailleurs une illustration lors de l'étude du groupe R1. Après traitement, la moyenne des titres en anticorps dans le lait baisse fortement tout en restant proche du seuil de positivité de la technique. Cette variation, si elle s'explique en partie par ce que nous venons d'évoquer, pourrait être due à une meilleure réponse de la cinétique d'anticorps dans le lait suite au traitement, conférant un avantage supplémentaire à la nouvelle méthodologie développée. Cependant, le faible nombre d'animaux de ce groupe R1 ne permet pas de conclure quant à la persistance ou non des titres anticorps dans le lait après traitement. De plus, bien que cette constatation soit intéressante, il est pour l'instant impossible de la vérifier à grande échelle puisqu'à l'heure actuelle, aucun traitement contre l'œstrose n'est autorisé en lactation.

L'étude des coefficients de corrélation, en comparant individuellement et à chaque date la correspondance entre les données obtenues par les deux techniques, offre une évaluation plus précise de la méthode ELISA sur lactosérum. Ces coefficients sont élevés et fortement significatifs pour les données obtenues dans les élevages à forte prévalence d'œstrose (ferme aveyronnaise et ferme B1). Dans les fermes B3 et B2, les valeurs des coefficients de corrélation sont plus variables mais la corrélation entre les deux lots de données reste significative.

Les coefficients généraux, calculés à partir de l'ensemble des données recueillies pour chaque situation épidémiologique (les deux régions enquêtées) confirment la relation étroite entre les valeurs obtenues par les deux techniques. Les valeurs observées (bassin aveyronnais $r = 0.740$; Pays Basque : $r = 0.476$) peuvent d'ailleurs être comparées aux valeurs obtenues lors d'études antérieures sur des vaches laitières en comparant les taux d'anticorps dans le lait et le sérum pour détecter l'hypodermose ($r = 0.444$) [4] ou la présence de nématodes gastro-intestinaux (r variant de 0.41 à 0.67) [30] [32].

Ces résultats positifs significatifs permettent de répondre en partie à une question liée à l'exploitation du lait, sur la possible dilution des titres anticorps dans le lait en fonction des niveaux de production. En effet, les effectifs prélevés au hasard représentent un quart à un sixième de chaque troupeau. Nos résultats concernent donc pour parts sensiblement égales des brebis fortes et faibles productrices. Les corrélations significativement positives obtenues permettent de confirmer que le niveau de production n'influence que faiblement les titres en anticorps dans le lait et qu'en terme d'appréciation de la moyenne d'un troupeau, l'outil paraît fiable.

Les paramètres intrinsèques obtenus pour le test sur le lait en comparaison du test sérum pris comme référence permettent une analyse plus précise des qualités du test mis au point. La spécificité de 85% est bonne, la sensibilité de 80.5% est acceptable. Cela signifie que sur 10 animaux positifs avec la technique sérum, 8 seront détectés par notre technique sur le lait.

Ce résultat est satisfaisant car notre technique n'a pas pour but le dépistage individuel de l'œstrose. En effet, en élevage, les maladies parasitaires sont appréhendées à l'échelle du troupeau et un résultat pertinent s'obtient toujours à partir d'un échantillon représentatif d'une population, variant en général de 5 à 20 individus. Dans ces conditions, notre test devrait permettre de dépister un cheptel où l'œstrose sévit et d'en suivre l'évolution au cours des saisons ainsi qu'à la suite de traitements.

Concernant les paramètres extrinsèques du test, donc ceux dépendant de la prévalence de l'affection, la valeur prédictive négative du test sur le lait est très bonne. La valeur prédictive positive semble quant à elle un peu faible puisque $VPP = 60.5$. Toutefois, ce résultat n'est pas surprenant. En effet, en comparant les taux de positifs obtenus pour chaque élevage par les deux techniques, nous observons régulièrement que les taux de positifs obtenus par la technique ELISA sur le lait sont légèrement supérieurs à ceux estimés par la technique sur sérum. Même si l'écart de prévalence constaté par les deux techniques est rarement supérieur à 10%, cette différence influence négativement la VPP de notre test, en comparaison au test sérum. Cela a surtout son importance en cas de prévalence réelle de l'œstrose faible : notre test aura alors tendance à surestimer la prévalence des infestations.

II – Utilisation de la méthode mise au point dans des suivis épidémiologiques.

II – 1. Suivi épidémiologique de l'œstrose.

Face à l'impossibilité de diagnostic direct de l'œstrose au sein d'un troupeau, l'ELISA sur sérum était jusqu'à présent le seul moyen pertinent de suivi de l'épidémiologie de cette affection parasitaire. Notre étude montre que l'ELISA sur le lait permet d'atteindre également cet objectif.

La première étude réalisée sur le groupe R1, sur un nombre réduit d'animaux avait surtout pour but de valider la méthode mise au point. Elle montre toutefois une cinétique des anticorps comparable dans les deux fluides biologiques, notamment lors de la décroissance des valeurs de DO à la suite du traitement antiparasitaire effectué en septième semaine. Nous notons cependant que cette chute du taux d'anticorps apparaît rapide et qu'il serait intéressant de confirmer cette observation par des études complémentaires.

L'étude plus complète des cinétiques d'anticorps dans les troupeaux aveyronnais et basques, correspondant à deux situations épidémiologiques différentes, montre des évaluations comparables au cours du temps des valeurs mesurées sur le sang et le lait qui confirment l'intérêt de l'ELISA lait dans le suivi épidémiologique de l'œstrose. Les taux de prévalence comparables obtenus par les deux méthodes en sont une confirmation. Les

prévalences les plus faibles sont observées en mai-juin. La prévalence moyenne constatée lors de notre étude est assez importante. Seul l'élevage B2 présente des taux de contamination moyens proches de 10%, mais cet élevage est le seul à avoir traité ses brebis au Closantel® en cours d'hiver. Dans l'élevage aveyronnais, le taux d'infestation est supérieur à 40%, tandis que dans les élevages B1 et B3, les taux d'infestation moyens respectifs sont de 35 et 50%. Ces taux restent bien inférieurs à ceux observés en Afrique par Dorchies [15] ou en Grèce [35], [12] où les taux de prévalence avoisinent les 100%. Par contre, ils sont plus proches des données constatées en France. Dorchies [1], lors d'une enquête épidémiologique par diagnostic direct (fente des têtes à l'abattoir de Rodez/ Aveyron) en 1994, a ainsi décrit des taux de prévalence faibles en avril autour de 12% pour une prévalence maximale en août de 52%, suite aux dépôts de larves à la belle saison .

Les résultats que nous obtenons au mois d'avril dans l'élevage aveyronnais sont nettement supérieurs et peuvent s'expliquer de deux manières : l'élevage suivi ne réalise pas de prévention systématique de l'œstrose, ce qui peut favoriser une prévalence résiduelle importante de cette parasitose. De plus, l'activité parasitaire annuelle peut varier en fonction du climat. Ainsi, l'année 2001 a pu être favorable à *Æstrus ovis*, ce qui expliquerait des taux d'anticorps élevés en début d'année 2002. Cette hypothèse semble confirmée par l'étude récente réalisée par Jacquiet [28] : lors d'un suivi sérologique de l'œstrose dans les Pyrénées Atlantiques entre 1999 et 2002, cet auteur observe des taux moyens de prévalence relativement faible, autour de 15%, sauf en automne 2001, où le taux moyen est de 35%. Les résultats au printemps 2002 sont en moyenne de 18%, mais recouvrent une réalité plus tranchée : sur 32 élevages, 20 sont quasiment indemnes tandis que 12 présentent des taux positifs compris entre 27 et 100%. On peut donc supposer que face à une recrudescence de l'œstrose en 2001, de nombreux élevages ont réalisé des traitements antiparasitaires tandis que d'autres n'ont pu juguler efficacement l'œstrose, ce qui explique chez eux, une prévalence importante en début 2002, comme dans l'élevage aveyronnais que nous avons suivi.

Pour le Pays Basque, il apparaît intéressant de comparer nos résultats à ceux obtenus par Jacquiet [28], grâce à l'ELISA sérum, à la même époque et dans la même région. Les taux de prévalence que nous obtenons dans les élevages B1 et B3 sont supérieurs à ceux observés par Jacquiet en 1999, 2000 et 2001, mais sont compatibles avec ceux qu'il obtient en 2002 suite à une recrudescence de l'œstrose en automne 2001.

A travers l'étude sur ces 4 élevages, nous pouvons constater que la prévalence de l'œstrose reste importante dans les deux bassins majeurs de production laitière ovine français.

Les élevages A, B1 et B3, qui ne pratiquent pas de prévention systématique de l'œstrose, présentent des taux de prévalence entre 30 et 50 % au cours de notre étude, sans pour autant connaître de problème dû aux manifestations cliniques de cette parasitose.

Dans l'élevage B2, le taux de prévalence n'excède pas 20%, confirmant ainsi par comparaison l'efficacité des traitements appliqués.

II – 2. Intérêt de l'étude sur le lait de tank.

La mise au point de cette méthode de dépistage de l'œstrose à partir du lait offre de nouvelles perspectives. En particulier, il devient envisageable d'utiliser le lait de tank pour appréhender l'évolution de l'œstrose au sein d'un troupeau à partir d'une valeur unique reflétant peu ou prou la moyenne des animaux.

Notre étude présente à cet égard un point positif : bien qu'obtenue sur seulement quatorze prélèvements, nous observons une excellente corrélation entre les moyennes de DO troupeau et les valeurs des prélèvements de tank correspondant ($r = +0.829$, $n = 14$, $P < 0.01$). Ce résultat est similaire à ceux obtenus par Boulard [3] dans le cas de la fasciolose bovine.

Cette relation nécessite toutefois d'être confirmée par une étude à plus grande échelle. Si elle est confirmée, elle permettrait d'envisager grâce à un prélèvement unique répété de vérifier l'efficacité des mesures de contrôle de l'œstrose au sein d'un troupeau, notamment suite à un traitement antiparasitaire réalisé avant le début de la campagne de lactation. L'étude de la décroissance du taux d'anticorps post-traitement en est cependant un préalable indispensable. Enfin, et dans la perspective de l'autorisation d'un traitement efficace de l'œstrose en cours de lactation (Eprinex® [26]), l'utilisation de notre technique ELISA appliquée au lait de tank pourrait être une composante importante de la décision de traitement.

CONCLUSION

Cette étude a permis de mettre au point une technique ELISA pour la détection de l'œstrose ovine à partir de prélèvements de lait.

Les corrélations positives et les taux de prévalences comparables à ceux obtenus par la technique sur le sérum attestent de la pertinence du nouvel outil mis au point par rapport à celui sur sérum.

L'utilisation du lait dans le diagnostic de l'œstrose ouvre de nouvelles perspectives dans la simplification du dépistage de cette affection, en raison de la facilité de réalisation et de stockage des prélèvements. Par ailleurs, les quelques résultats comparatifs obtenus sur le lait de tank sont encourageants pour l'évaluation du statut parasitaire d'un troupeau de brebis vis à vis de l'œstrose à partir d'un prélèvement unique, répétable dans le temps

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

M. GAUDOUT Nicolas

a été admis(e) sur concours en : 1998

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 9 Juillet 2004

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, M. FRANC, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

autorise la soutenance de la thèse de :

M. GAUDOUT Nicolas

intitulée :

Contribution à la mise au point d'un test Elisa sur le lait de brebis pour le diagnostic de l'oestrose ovine

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Michel FRANC**



**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Alexis VALENTIN**



**Vu le : 16 NOV. 2006
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



Bibliographie.

- 1/ BERGEAUD (J.P.), DURANTON (C.), DORCHIES (Ph.) - L'œstrose ovine en aveyron : résultat d'une enquête sur 1036 têtes à l'abattoir de Rodez. - Revue Med. Vet., 1994, **145**, 11 : 863-866.
- 2/ BERNOLLIN (B.) - Œstrose : c'est le moment de traiter. - Cultivar Paris, 1990, **28** : 47.
- 3/ BOULARD (C.), BOUVRY (M.), ARGENTE (G.) - Comparaison de la détection des foyers de fasciolose par test Elisa sur lactosérum et sérum et par coproscopie. - Ann. Rech. Vet., 1985, **16**(4): 363-368.
- 4/ BOULARD (C.), VILLEJOURBERT (C.) - Use of pooled serum or milk samples for the epidemiological surveillance of bovine hypodermosis. - Vet. Parasitol, 1991, **39** : 171-183.
- 5/ CODE DE LA SANTE PUBLIQUE – Principe de la cascade. L5143 – 4.
- 6/ DAKKAK (A.), ROBI (B), KACHANI (M.) - Efficacité de l'ivermectine dans le traitement des broncho-pneumonies vermineuses, des strongyloses digestives et de l'œstrose du mouton. - Revue Med Vet, 1986, **137**, 11 : 781-786.
- 7/ DOMBRE (K.) - Mise au point d'un test Elisa pour le dépistage sérologique de l'œstrose caprine. - Thèse pour le doctorat vétérinaire, Toulouse 2000.
- 8/ DORCHIES (P.) - *Oestrus ovis* chez la brebis et la chèvre. - Bulletin des GTV, hors série parasitologie, 2004 : 303-309.
- 9/ DORCHIES (Ph.) - Physiopathologie comparée de la myiase à *Oestrus ovis* chez l'homme et chez les animaux. - Bull. Acad. Nale Med., 1997, **181**, n°4, 673-684.
- 10/ DORCHIES (Ph.), ALZIEU (J.P.) - L'œstrose ovine : revue. - Revue Med. Vet. 1997, **148**, 7, 565-574.
- 11/ DORCHIES (Ph.), ALZIEU (J.P.), BICHET (H.), CHIARISOLI (C.)- Traitement et Prévention de l'œstrose ovine par le closentel. - Revue Med Vet, 1989, **140**, 1 : 1121-1124.
- 12/ DORCHIES (Ph.), ALZIEU (J.P.), CADIERGUES (M.C.) - Comparative curative and preventive efficacies of ivermectin and closantel on *Oestrus ovis* in naturally infected sheep. – Vet. Parasitol. ,1997, **72** : 179-184.
- 13/ DORCHIES (Ph.), BERGEAUD (J.P.), TABOURET (G.), DURANTON (C.), PREVOT (F.), JACQUIET (Ph.) - Prevalence and larval burden of *Oestrus ovis* in sheep and goats in northern mediterranean region of France. - Vet. Parasitol., 2000, **88** : 269-273.
- 14/ DORCHIES (Ph.), DUCOS de LAHITTE(J.) - Traitement antiparasitaire des ovins par l'ivermectine injectable. - Revue med. Vet., 1986, **137**, 7 : 485-490.
- 15/ DORCHIES (Ph.), DURANTON (C.), JACQUIET (Ph.) - Physiopathology of *Oestrus ovis* infection in sheep and goats : a review. - Vet. Records (1998) **142** : 487-489.

- 16/ DORCHIES (Ph.), PREVOT (F.), DURANTON (C.) – Œstrose du mouton et de la chèvre en Afrique : résultats d'une enquête sur 3204 sérums provenant de 9 pays. - Revue Med. Vet. 1999, **150**, 5, 463-466.
- 17/ DORCHIES (Ph.), TABOURET (G.), DURANTON (C.), JACQUIET (Ph.) - Relation hôte parasite : l'exemple d'*Oestrus ovis* chez le mouton et la chèvre. - Revue Med. Vet., 1999, **150**, 6, 51-516.
- 18/ DORCHIES (Ph.), WAHETRA (S.), LEPETITCOLIN (E.), PREVOT (F.), GRISEZ (C.), BERGEAUD (J.P.), HOSTE (H.), JACQUIET (Ph.) – The relationship between nasal myiasis and the prevalence of enzootic nasal tumours and the effects of treatment of *Oestrus ovis* and milk production in dairy ewes of Roquefort cheese area. - Vet. Parasitol., 2003, **113**: 169-174.
- 19/ DORCHIES (Ph.), YILMA (JM.), SAVEY (J.) - Prevalence of lung abscesses and interstitial pneumonia in ovine œstrosis. - The Vet Record, September 25, 1993, **133** : 325.
- 20/ DURANTON (C.), BERGEAUD (J.P.), DORCHIES (Ph.) - Le Dot Enzyme – Linked Immunosorbent Assay : méthode de dépistage rapide de l'œstrose ovine. - Revue Med. Vet. 1995, **146**, 4, 283-286.
- 21/ DURANTON (C.), DORCHIES (P.), GRAND (S.), LESURE (C.), OSWALD (I.) - Changing reactivity of caprine and ovine mononuclear phagocytes throughout part of the life cycle of *Oestrus ovis* : assessment through spontaneous and inductible NO production. - Vet. Res., 1999, **30**: 371-376.
- 22/ FRUGERE (S.) - Essai d'immunisation de 24 agneaux contre l'œstrose à partir de produits d'excrétion et de sécrétion de larves de stade III d'*Oestrus Ovis*. - Rapport de stage CEAV pathologie animale en région chaude, Toulouse 1998-1999.
- 23/ Le FICHOUX (Y.), MARTY (P.), DENIS (G.), COUTURIER (P.), DELLAMONICA (P.)- Ophtalmomyiase externe à *Oestrus ovis* contractée sur la plage de Nice. - Acta Tropica, 1981, **38** : 461 – 468.
- 24/ GODDARD (P.), BATES (P.), WEBSTER (A.) - Evaluation of a direct ELISA for the serodiagnosis of *Oestrus ovis* infection in sheep. - Vet. Record, 1999, **144** : 497-501.
- 25/ GUITTON (Ch.), DORCHIES (Ph.) - Etude des larves d'*Oestrus ovis* en microscopie électronique à balayage. - Revue Med. Vet., 1993, **144**, **8-9** : 687-692.
- 26/ HOSTE (H.), LESPINE (A.), LEMERCIER (P.), ALVINERIE (M.), JACQUIET (P.), DORCHIES (P.) - Efficacy of Eprinomectin pour-on against gastrointestinal nematodes and the nasal bot fly (*Oestrus ovis*). - The Vet. Record, June 19, 2004: 782-785.
- 27/ HORAK (I.G.), SNIJDERS (A.J.)- The effects of *Oestrus ovis* infestation on Merino lambs. - The Vet Record, January 5, 1974 : 12-16 .

- 28/ INNOCENTI (L.), LACCHESE (P.), GIOGI (F.) - Integument ultrastructure of *Oestrus ovis* larvae: host immune response to various cuticular components. - International Journal for Parasitology, 1997, 27(5): 495-506.
- 29/ INNOCENTI (L.), MASETTI (M.), MACCHIONI (G.), GIORGI (F.) - Larval salivary gland proteins of the sheep nasal bot fly (*Oestrus Ovis*) are major immunogens in infested sheep. - Vet. Parasitol., 1995, **60**: 273-282.
- 30/ JACQUIET (P.), ALZIEU (J.P.), CABARET(J.), VIAL-NOVELLA (C.), GRIZET (C.) - Epidémiologie comparée en Ariège et dans les Pyrénées-Atlantiques des brebis à l'herbe par les helminthes et par *Oestrus ovis*. - Bulletin des GTV, hors série parasitologie, 2004 : 303-309.
- 31/ KLOOSTERMAN (A.), VERHOEFF (J.), PLOEGER (H.W.), T.J.G.M. Lam - Antibodies against nematodes in serum, milk, and balk milk samples as possible estimators of infection in dairy cows. - Vet. Parasitol, 1993, **47**: 267-278.
- 32/ KLOOSTERMAN (A.), PLOEGER (H.W.), PIEKE (E.J.), T.J.G.M. Lam, VERHOEFF (J) - The value of bulk milk Elisa *Oestertagia* antibody titres as indicators of milk production response to anthelmintic treatment in the dry period. - Vet. Parasitol., 1996, **64**: 197-205.
- 33/ LOWRY (O.H.), ROSBROUGH (N.J.), FARR (A.L.), RONDAL (R.J.) - Protein measurement with folin phenol reagent. - J. Biol. Chem., 1951, **193** : 265-275.
- 34/ MAGE (C.) - Le Seponver : un antiparasitaire rémanent pour les ovins. Cultivar Paris,1990 – supplément élevage n°25 : 28-29.
- 35/ N GUYEN (V.K.), DELVERDIER (M.), JACQUIET (Ph.), AMARDEILH (M.F.), DORCHIES (Ph.) - Expression tissulaire de l'épitope Ki-67 dans le compartiment épithélial de la muqueuse nasale du mouton et de la chèvre infestés naturellement par *Oestrus ovis*. - Revue Med. Vet., 1998, **149**, 12 : 1109-1113.
- 36/ N GUYEN (V.K.), JACQUIET (Ph.), DURANTON (C.), BERGEAUD (J.P.), PREVOT (F.), DORCHIES (Ph.) - Réactions cellulaires des muqueuses nasales et sinusales des chèvres et des moutons à l'infestation naturelle par *Oestrus ovis*. - Parasite, 1999, **2** : 87-95.
- 37/ PAPADOPOULOS (E.), PREVOT (F.), HIMONAS (C.), DORCHIES (Ph.) - Prévalence d'*Oestrus ovis* chez la chèvre en Grèce : enquête sérologique par Elisa. - Revue Med. Vet. 1997, 148, **8-9**, 721-724.
- 38/ SEMENOV (P.V.), GOMOYUNOVA (N.P.), TARASENKO (N.N.) - (Portée de vol d'*Oestrus ovis*). - Veterinariya Moscow USSR, 1975, **8** : 58-59.
- 39/ SKELLY (P.J.), HOWELLS (A.J.) - The humoral immune response of sheep to antigens from larvae of the sheep blowfly (*Lucilia caprina*) - International Journal for Parasitology, 1987, **17**(6) : 1081-1087.
- 40/ TABOURET (G.), PREVOT (F.), BERGEAUD (J.P.), DORCHIES (Ph.), JACQUIET (Ph.) - *Oestrus ovis* : sheep humoral immune response to purified excreted/secreted salivary gland 28 kDA antigen complex from second and third instar larvae. - Vet. Parasitol., 2001, **101**: 53-66.

41/ TABOURET (G.) - *Oestrus ovis* chez les ovins: activité trophique des larves et réponse immunitaire muqueuse. – Thèse universitaire, Toulouse III, 5 mai 2001.

42/ TESTE (C.) - L'oestrose des petits ruminants. - Les dossiers de l'élevage, 4, 3, sept-oct 1980 : 39-47.

43/ YILMA (J.M.) - Contribution à l'étude de l'épidémiologie, du diagnostic immunologique et de la physiopathologie de l'oestrose ovine. - Thèse doctorat 1992, Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 218 pages.

44 / ZUMPT (F.) – Myiasis in man and animals in the old world. – 1965 - 267 pages. Publishers: Butterworth, London.

Toulouse, 2006
Nom: GAUDOUT

Prénom : Nicolas

TITRE : Contribution à la mise au point d'un test ELISA sur le lait de brebis pour le diagnostic de l'œstrose ovine

Résumé : Cette étude vise à fournir un nouvel outil de dosage des anticorps anti *Æstrus ovis* dans le lait de brebis. Les titres en anticorps ont été comparés dans des prélèvements individuels de sang et de lait, obtenus à partir d'un groupe maintenu en bergerie et de deux enquêtes épidémiologiques réalisées en France. Les résultats fournis par ces trois séries de mesures montrent une évolution comparable des moyennes de DO ainsi que des taux de prévalence très proches. Les titres en anticorps obtenus dans les échantillons de sérum et de lactosérum déterminent également des corrélations positives significatives, avec des valeurs s'échelonnant de +0,74 à +0,47. De plus, les corrélations obtenues sur le lait, entre les valeurs moyennes de troupeau et les prélèvements de tank correspondants sont-elles aussi significatives. Ces résultats suggèrent que les prélèvements de lait peuvent être utilisés en remplacement du sang dans le suivi individuel et collectif de l'œstrose chez la brebis laitière.

Mots-clés : *Æstrus ovis*, ELISA, lait, brebis, diagnostic, suivi épidémiologique.

TITLE : Contribution to the development of an ELISA on ewe milk test to detect ovine oestrosis.

Abstract: The study aims at providing a new tool of dosing antibody against *Æstrus ovis* in ewe milk. Measurements of antibodies against *O. ovis* were compared in serum and lactoserum samples of dairy ewes. Comparisons were obtained from an indoor study and from two epidemiological surveys performed in France. The results from these studies showed a similar pattern in mean OD values and prevalence rate of infection when estimated by use of ELISA test performed on individual blood or milk samples. They also indicated highly significant positive correlations between the antibody titres in milk and those in serum with values ranging from +0.74 to +0.47. Last, correlations between the mean values obtained from individual milk samples and bulk milk samples from the same flocks were also highly significant. Those results suggest the feasibility to use milk samples instead of blood ones for the surveillance of oestrosis in dairy ewes both at the individual and at the flock levels.

Keywords: *Æstrus ovis*, ELISA, Milk, dairy ewe, diagnosis, epidemiological survey.

Imp. SARL NOTREL – 31300 TOULOUSE