

COMPARAISON DES PERFORMANCES DE LA PCR ET DE LA TECHNIQUE D'ÉCRASEMENT DANS LA DÉTECTION DES FORMES LARVAIRES DE *FASCIOLA HEPATICA* CHEZ *GALBA TRUNCATULA* DANS LA RÉGION D'EL TARTF : RESULTATS PRELIMINAIRES

Reçu le 05/10/2008 – Accepté le 25/04/2009

Résumé

Parmi les affections sévissant dans la région d'El Tartf, la fasciolose représente un problème pathologique majeur.

De nombreux outils de diagnostic sont utilisés pour dépister la maladie chez l'hôte définitif. Cependant les méthodes relatives à la détection de l'infestation naturelle chez le mollusque reposent essentiellement sur l'écrasement, la dissection microscopique, l'observation de l'émission cercarienne. Une méthode, relativement récente, plus spécifique et hautement sensible a été mise au point en utilisant une séquence d'ADN spécifique du génome de *Fasciola sp.*

L'essai a porté sur 59 mollusques prélevés dans la région d'El Tartf, et a permis de mettre en évidence une prévalence de 18,64% (11 des 59 mollusques analysés se sont révélés porteurs de parasite «*Fasciola sp.*»). Cette prévalence est extrêmement élevée par rapport aux données rapportées par la littérature.

Par ailleurs, un échantillon de 50 mollusques prélevé dans le même site à la même période et testé par la méthode d'écrasement n'a révélé qu'un taux de 10%.

Mots clés : *Fasciola hepatica*, *Galba truncatula*, PCR, écrasement.

Abstract

Among the affections prevailing in the area of EL Tartf, the fasciolosis represents a major pathological problem.

Many tools for diagnosis are used to detect the disease at the final host. However the methods relating to detection of natural infestation in mollusc rest primarily on crushing, microscopic dissection and the observation of the cercaria emission;

A new more specific and highly significant method was developed by using a specific sequence of AND of the genome of *Fasciola hepatica*.

The test related to 59 molluscs taken in the area of EL Tartf, and made it possible to highlight a prevalence of 18, 64% (11 of 59 molluscs analysed appeared carrying the larval forms of *Fasciola hepatica*). This prevalence is extremely high compared to the data brought back by the literature.

In addition, a sample of 50 molluscs taken in the same site at the same period and tested by the method of crushing revealed only one rate of 10% of positivity.

Key words: *Fasciola hepatica*, *Galba truncatula*, PCR, crushing.

S. RIGHI¹
Y. CARON²
B. LOSSON²
A. BENAKHLA¹

¹ Laboratoire de Parasitologie et des maladies parasitaires, Institut des Sciences Vétérinaires, Centre Universitaire d'EL Tartf, Algérie.

² Laboratoire de Parasitologie et des maladies parasitaires, faculté de Médecine Vétérinaire, Université de liège, Belgique.

ملخص

يعتبر داء « la Fasciolose » من أكثر الأمراض انتشارا في ولاية الطارف. ولقد استخدمت عدة وسائل للكشف عن هذا الداء عند المضيف النهائي في حين أن الطرق المتعلقة بالكشف على الإصابة العادية عند الرخويات تقوم خاصة على كسر القوقعات مع الفحص المجهرى و متابعة خروج المذنبات .

ولقد اكتشفت طريقة جديدة أكثر اختصاصا و حساسية, مبنية على استخدام جزء من الحمض النووي خاص بمورثة *Fasciola hepatica* .

و أجريت هذه الدراسة على 59 رخوي من النوع « *Galba truncatula* » تم جمعها في منطقة الطارف وباستخدام طريقة « PCR » حيث تمكنا من إيجاد نسبة مرتفعة من إصابة الرخويات بطفيلي « *F. hepatica* » حيث قدرت هذه النسبة بـ: 18.54% . وتعتبر هذه الأخيرة جد مرتفعة مقارنة بتلك المحصل عليها في الدراسات الأخرى .

وفي ذات السياق أجريت في المختبر طريقة كسر القوقعات على 50 رخوي . أخذت من نفس الموقع و في نفس المدة وذلك للبحث على الطفيلي. وقد أسفرت هذه العملية على الحصول على نسبة 10% .

الكلمات المفتاحية : *Fasciola hepatica*, *Galba truncatula*, PCR, كسر القوقعات

La fasciolose constitue une dominante parasitaire chez les ruminants dans la région d'El Tarf [6]. En effet, cette dernière représente à l'instar des régions littorales d'Algérie un biotope favorable pour le développement de l'hôte intermédiaire (*Galba truncatula*) [5-8]. Seule la fasciolose à *F. hepatica* est présente en Algérie [7].

De nombreuses techniques sont utilisées pour détecter l'infestation du mollusque par les formes larvaires de différents trématodes; à titre indicatif citons : l'écrasement et/ou la dissection microscopique, l'observation de l'émission cercarienne [2] et l'histo-pathologie. Une technique plus récente faisant appel à la biologie moléculaire (PCR) a été mise au point et expérimentée en utilisant une séquence d'ADN spécifique du génome de *Fasciola* sp. [3]. Dans ce travail sont exposés les résultats préliminaires sur l'utilisation de cette technique pour la détection du parasite chez des mollusques et une comparaison de ses performances par rapport à la méthode d'écrasement.

MATERIELS ET METHODES

Les mollusques

Les échantillons de mollusques utilisés dans ces deux essais proviennent d'un lot de 230 spécimens (*G. truncatula*) prélevés le 14 avril 2007 dans des mares au niveau de Boutheldja, zone d'élevage bovin de type extensif. Cette dernière est située à 10 km d'El Tarf, région de l'extrême Nord Est algérien. Notons que pour l'identification nous nous sommes basé sur la clé de Rondelaud [9]. Un premier échantillon de 50 mollusques a été examiné au laboratoire de l'Institut des Sciences Vétérinaires (El Tarf) en utilisant la technique d'écrasement. Notons que pour le premier échantillon tous les mollusques ont été mesurés à l'aide de papier millimétré afin de comparer le taux d'infestation en fonction de la hauteur de la coquille. Le deuxième échantillon composé de 59 mollusques a été testé par PCR au sein du service de Parasitologie et Pathologie des Maladies Parasitaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège (Belgique).

Extraction d'ADN des mollusques

Les corps des 59 mollusques fixés dans l'éthanol à 70% ont été extraits, à l'aide d'une solution de Chelex (Biorad, Nazareth Eke) à 5% après broyage. Les échantillons ont ensuite été incubés une heure à 56°C et 30 minutes à 95°C, puis centrifugé à 14000 tr/min. Par la suite la concentration d'ADN a été mesurée au spectrophotomètre (Nanodrop) pour les différents tubes et une concentration moyenne de 400ng/µl a été obtenue.

Réaction de polymérisation en chaîne

Une PCR a été réalisée sur les mollusques à l'aide d'un Peltier Thermal Cycler et d'un kit Tac PCR Master Mix (Qiagen). Les amorces utilisées Fsh1 (sens) 5' GAT-CAA-TTC-ACC-CAT-TTC-CGT-TAG-TCC-TAC 3' et Fsh2 (antisens) 5' AAA-CTG-GGC-TTA-AAC-GGC-GTC-CTA-CGG-GCA 3' correspondent aux deux extrémités de

30 paires de bases (pb) d'un fragment d'ADN de 124 pb spécifique de *Fasciola* sp. De l'ADN de douve a été extrait avec la même procédure décrite ci-dessus et à fait office de témoin positif. Le mélange PCR est préparé selon les recommandations du fabricant avec 0,5 µl d'ADN pour un volume finale de 25 µl. Après les tubes ont été placés dans l'appareil avec le programme suivant : dénaturation initiale pendant 5 minutes à 95°C puis, pendant 40 cycles : dénaturation à 95°C durant une minute, hybridation à 56°C pendant une minute, et élongation à 72°C pendant une minute.

Electrophorèse

Après amplification, une électrophorèse a été réalisée sur un gel d'agarose à 2% préparé dans du tampon TAE contenant du bromure d'ethidium. Le rouge de crésol est utilisé pour visualiser le front de migration. L'électrophorèse est effectuée sous une tension de 90V (pendant : 1H30), puis le gel est visualisé sous UV et photographié (Figure 1).

Ecrasement des mollusques

Cinquante autres mollusques prélevés dans le même site et à la même période ont été analysés par écrasement. Il s'agit d'appliquer une pression ferme et progressive à un endroit bien précis de la coquille du mollusque (face supérieure du dernier tour de spire) pour libérer les formes larvaires du digène [1]. Les tissus sont observés sous une loupe binoculaire.

RESULTATS

Ecrasement

Cinq mollusques sur 50 (10%) contenaient des larves (sporocystes, rédies) de *Fasciola hepatica*. Parmi les mollusques infestés, il faut noter que le taux le plus élevé a été obtenu sur des mollusques dont la taille est comprise entre 7 et 8 mm (2/10), suivie de ceux dont la taille est comprise entre 6 et 7 mm (2/15). Les résultats sont consignés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Evaluation de l'infestation de *G. truncatula* prélevées dans la région de Boutheldja (El-Tarf) par les formes larvaires de *F. hepatica* selon méthode d'écrasement.

Taille	Nbre de <i>G truncatula</i> analysées	Nbre de <i>G truncatula</i> infestées
5-6 mm	21	1
6-7 mm	15	2
7-8 mm	10	2
8-9 mm	4	0
Total	50	5

La PCR

Sur les 59 mollusques analysés, 11 étaient positifs à *Fasciola hepatica* ce qui représente une prévalence de 18,64%. (fig. 1).

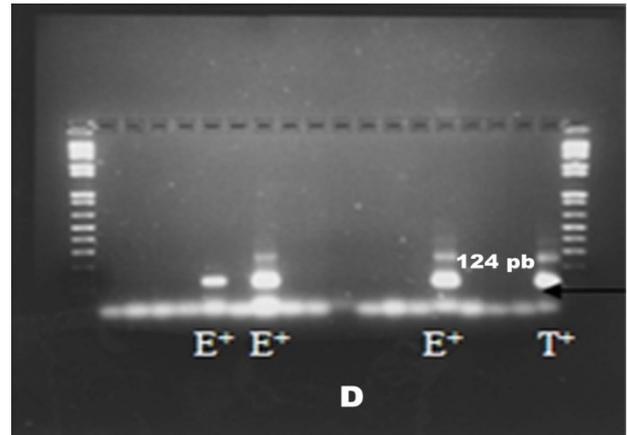
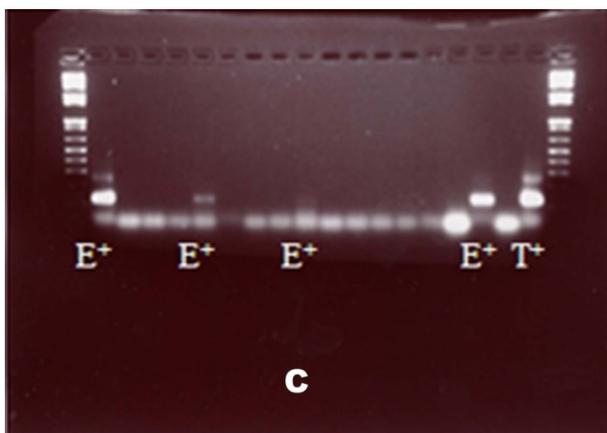
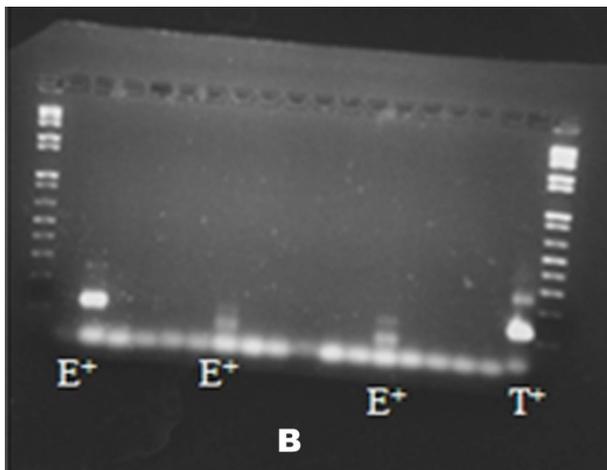
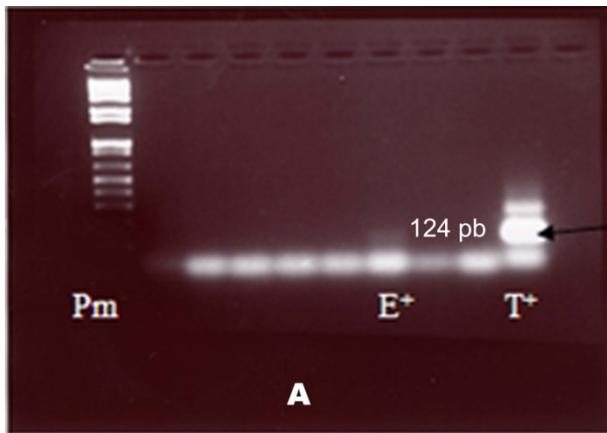


Figure 1 : Evaluation de l'infestation de *G. truncatula* prélevées dans la région de Boutheldja (El-Tarf) par *F. hepatica* selon la méthode PCR (gels d'électrophorèse obtenus suite aux PCR réalisées sur les 59 *G. truncatula* analysées), **A** : 1 *G. truncatula* positive ; **B** : 3 *G. truncatula* positives ; **C** : 4 *G. truncatula* positives ; **D** : 3 *G. truncatula* positives, Pm : Poids moléculaire ; E+ : échantillon positif ; T+ : Témoin positif.

DISCUSSION

A la lumière des résultats obtenus, il s'avère que la PCR est nettement plus sensible que la méthode d'écrasement, en effet le taux d'infestation des mollusques par *Fasciola hepatica* révélé par la PCR est de 18,64%. La méthode d'écrasement, quoique peu sensible (prévalence de 10%), peut être utilisée comme outil de diagnostic dans notre région car elle a l'avantage d'être rapide et peu onéreuse bien que peut être un peu laborieuse en routine.

Pour ce qui est de la prévalence en fonction de la taille, il apparaît globalement que plus les limnées sont grandes et plus elles sont susceptibles d'être infestées comme l'ont montré d'autres auteurs [4].

CONCLUSION

La région d'El Tarf, très favorable pour le développement de l'hôte intermédiaire constitue l'une des régions les plus hautement touchées par la fasciolose et cette prévalence élevée tient au fait que la région d'étude est une région humide par excellence avec un sous sol en grande partie argileux ce qui offre des conditions de vie plus appropriées pour le mollusque. De plus il faut noter aussi que la forte densité du cheptel bovin, la nature de l'élevage en grande partie de type extensif, l'application des traitements inappropriés ainsi que le rythme des traitements constituent des facteurs favorisant la grande fréquence de cette parasitose.

L'évaluation des performances, en matière de détection de formes larvaires de *F. hepatica*, par la PCR et la méthode d'écrasement met en évidence d'une part la grande sensibilité de la PCR par rapport aux méthodes microscopiques et d'autres part la possibilité d'analyser de grands échantillons. Toutefois son coût et son caractère laborieux restent les inconvénients majeurs.

REFERENCES

- [1]- Caron Y., Lassri S., Losson B., "*Fasciola hepatica*: An assessment on the vectorial capacity of *Radix labiata* and *R. balthica* commonly found in Belgium", *Vet. Parasitol.*, 149, (2007), pp. 95-103.
- [2]- Kaplan R. M., "Liver flukes in cattle: control based on seasonal transmission dynamics", *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.*, 16, (1994), pp. 687-693.
- [3]- Kaplan R. M., Dame J. B., Reddy G. R., Courtney C. H., "A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails", *Int. J. parasitol.*, 25, (1995), pp. 601-610.
- [4]- Kaplan R. M., Dame J. B., Reddy G. R., Courtney C. H., "The prevalence of *Fasciola hepatica* in its snail intermediate host determined by DNA probe assay", *Int. J. Parasitol.*, 27, (1997), pp. 1585-1593.
- [5]- Mekroud A., Benakhla A., Belatrache C., Rondeleaud D., Dreyfus J., "First studies on the habitat of *Galba truncatula* the snail hote of *Fasciola hepatica* and the dynamics of snail populations in Northeastern Algeria", *Rev. Méd. Vét.*, 153, (2002), pp. 181-188.
- [6]- Mekroud A., Benakhla A., Rondeleaud D., Dreyfus J., "Preliminary studies on the prevalences of natural fasciolosis in cattle, sheep and the host snail (*Galba truncatula*) in Northeastern Algeria", *Parasitol. Res.*, 92, (2004a), pp. 502-507.
- [7]- Mekroud A., Contribution à l'étude de la distomatose à *Fasciola hepatica* linnaeus 1785, dans le Nord Est Algerien. Recherches sur les ruminants et le mollusque hôte, Thèse d'Etat en Sciences Vétérinaires, Université de Constantine, (2004b), Algérie, 299 p.
- [8]- Mekroud A., Titi A., Benakhla A., Vignole P., Rondeleaud D., "*Fasciola hepatica* : la sensibilité des *Galba truncatula* du nord est algérien à l'infestation expérimentale avec des miracidiums sympatriques", *Rev. Méd. Vét.*, 157, (2006), pp. 1-6.
- [9]- Rondelaud D. 1998. Etat provisoire des connaissances sur les mollusques Lymnaeidae et leur détermination en France. (En Ligne). Adresse Url :http://abela.Club.fr/articles/limnées/Limnées_de_la_Faune_de_France.html.