



HAL
open science

Contribution à l'évaluation de la valeur santé des métabolites secondaires : mise au point du test anthelminthique LFIA

Ardety Adonis

► **To cite this version:**

Ardety Adonis. Contribution à l'évaluation de la valeur santé des métabolites secondaires : mise au point du test anthelminthique LFIA. Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. hal-02961572

HAL Id: hal-02961572

<https://hal.inrae.fr/hal-02961572>

Submitted on 8 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DES ANTILLES
UFR DES SCIENCES EXACTES ET NATURELLES
ANNEE UNIVERSITAIRE 2015-2016

**Contribution à l'évaluation de la valeur santé des
métabolites secondaires : mise au point du test
anthelminthique LFIA**



Rapport de stage réalisé par ADONIS Ardety
Licence BB – Parcours Santé

Maître de stage :
Mme MARIE-MAGDELEINE CHEVRY Carine

Tuteur de stage :
M. PHILIBERT Lucien

UNITE DE REHCERCHE ZOOTECHNIQUE DE L'INRA

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidé pendant ce stage :

Mme Carine MARIE-MAGDELEINE CHEVRY, mon maître de stage pour son encadrement et sa gentillesse et de m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Je tiens à exprimer mes sincères gratitude à Mme Nathalie MANDONNET, directrice de l'URZ, pour m'avoir accepté et accueilli au sein de son unité de recherche.

Mr Lucien PHILIBERT de m'avoir aidé tout au long de mon stage pour son encadrement et sa sympathie, pour les connaissances qu'il m'a transmises et pour sa bonne humeur.

Je remercie aussi Mme Suzitte CALIF, Mme Tatiana SILOU, Mr Yoann FELICITE, Mme Dalila FEUILLET.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de mon stage, Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

SOMMAIRE

Remerciements	<i>page 2</i>
Présentation de l'organisme d'accueil : L'INRA	<i>page 4</i>
Résumé	<i>page 5</i>
Introduction	<i>page 6</i>
I. Revue bibliographique	<i>page 7</i>
I.1. Le parasite : <i>Haemonchus contortus</i>	
I.1.1. Cycle du parasite	
I.4. Les différents tests anthelminthiques.....	<i>page 8</i>
I.4.1. Test d'éclosion (EHA)	
I.4.2. Test de développement larvaire (LDA)	
I.4.3. Test de dégainement	
I.4.4. Test de motilité	
I.5. Test LFIA.....	
II. Matériels et méthode	<i>page 10</i>
II.1 Problématique de l'étude	
II.2 Principe de l'optimisation	
II.3 Matériels	
II.3.1 Matériels biologiques	
II.3.2 Consommable et réactifs	
II.3.3 Equipements	
II.5 Méthode : Elaboration du test LFIA	
III. Résultats et discussions	<i>page 16</i>
IV. Conclusion	<i>page 21</i>
Annexes.....	<i>page 22</i>
Références bibliographiques.....	<i>page 25</i>

Présentation de l'organisme d'accueil : L'INRA

L'institut National de la Recherche Agronomique (INRA) est un organisme de recherche scientifique publique, fondé e 1946. Il est aujourd'hui le premier institut de recherche agronomique en Europe et le deuxième dans le monde en nombre de publications en sciences agricoles et en science de la plante et de l'animal. L'INRA mène des recherches finalisées concernant liées à l'agriculture, à l'alimentation et à la sécurité des aliments à l'environnement et à la gestion des territoires, dans une logique de développement durable.

Le centre inter-régional Antilles-Guyane est le seul centre Inra implanté en milieu tropical. Son siège est en Guadeloupe. Ses activités concernent principalement les 3 régions françaises d'Amérique (Guadeloupe, Guyane et Martinique) et au-delà tout l'outremer français et les pays des régions tropicales humides.

Il développe ses connaissances des milieux tropicaux, en collaboration avec les laboratoires des centres de France métropolitaine et ses partenaires régionaux et internationaux. La diversité des sols, des climats, des paysages, des productions, des contraintes agronomiques et économiques, offre un laboratoire naturel et exceptionnel pour les recherches sur l'agriculture, l'environnement et l'alimentation en milieu tropical humide. C'est la raison du développement, depuis plus de 60 ans, d'équipes de recherche ayant une expertise reconnue sur les solutions agronomiques et technico-économiques adaptées au développement des Antilles et de la Guyane Française, et des pays de la zone Caraïbe – Amériques tropicales.

L'unité de Recherches Zootechniques (URZ) vise à l'amélioration des productions animales dans la zone tropicale humide. Les espèces animales concernées sont les bovins, les caprins, les ovins et les porcins. Le projet de l'URZ vise à promouvoir des Systèmes d'élevage efficaces dans un milieu à fortes contraintes dans une perspective agro écologique. Dans cet objectif, l'URZ est organisé en 3 groupes de travail:

- * Adaptation et résilience des animaux pour les systèmes d'élevage tropicaux durables.
- * Optimisation de fonctions en vue de l'efficacité des systèmes d'élevage tropicaux.
- * Valorisation des savoirs, expertises et innovations.

Résumé

Partout dans les régions intertropicales, le parasitisme gastro-intestinal par les strongles cause des pertes très importantes aux éleveurs de petits ruminants au pâturage (de 30 à plus de 50% du potentiel de production). L'usage systématique de médicaments antiparasitaires (anthelminthiques) a sélectionné des populations de parasites résistants. C'est le cas du parasite *Haemonchus contortus* nématode infestant les petits ruminants d'élevage.

Dans le cadre de la recherche de molécules alternatives, plusieurs tests anthelminthiques *in vitro* sont réalisés. Ces tests visent à interrompre le cycle du parasite. Le test Larval Feeding Inhibition Assay (LFIA) a pour objectif d'interrompre le cycle en empêchant le parasite de se nourrir. Il s'agit d'observer la fluorescence des larves après ingestion d'une bactérie (*Escherichia coli*) marqué au FITC.

L'objectif du stage est d'optimiser la méthode LFIA retrouvée dans la littérature, afin de le mettre en place au laboratoire de l'URZ. Les facteurs de variation choisis sont le temps d'incubation et le nombre de rinçages. Les résultats de cet essai préliminaire montrent : Que pour assurer une bonne qualité d'échantillon et un confort de lecture, un rinçage suffit avec une durée d'incubation entre 18h et 20h. De plus, une durée d'incubation de 21h augmente l'intensité de la fluorescence.

Ce stage a constitué une première étape d'optimisation, qu'il convient de compléter par de nouvelles mises au point, notamment concernant la durée d'incubation à affiner et la centrifugation des larves à améliorer.

Introduction

La production des petits ruminants (ovins et caprins) fait face à une menace majeure dans le monde (Azando et al., 2011). L'impact des parasites sur la production et l'apparition de souches de parasites (helminthes) résistant aux anthelminthiques (médicament parasitaire) ont permis de préciser l'ampleur du phénomène pour les éleveurs de petits ruminants. En Guadeloupe, 80% de la mortalité des caprins avant le sevrage est lié aux strongles gastro-intestinaux et principalement à *Haemonchus contortus* (Marie-Magdeleine et al., 2010).

Pour faire face au parasitisme, différentes mesures préventives ont été mis en place et les plus courantes sont l'utilisation anthelminthique chimique et la rotation des pâturages. Ces méthodes ne sont pas sans risque, en effet l'utilisation intensive d'anthelminthique chimique entraîne des phénomènes de résistances des parasites.

L'URZ travaille à l'utilisation de la phytothérapie comme méthode alternative. En effet, certaines plantes contiennent des substances antiparasitaires, classées parmi leurs métabolites secondaires. Les métabolites secondaires sont des substances présentes chez les organismes mais qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante. Ces activités anthelminthiques des plantes sont mises en évidence par des tests in vitro et in vivo préalables à l'utilisation courante. Les tests in vitro sont des mesures indirectes et précises de la résistance, couramment utilisées pour leur facilité afin de s'assurer de l'effet avant l'essai in vivo (fondés sur l'observation de l'efficacité de l'anthelminthique chez les animaux hôtes des parasites). Ils sont de trois natures: test d'inhibition d'éclosion des œufs; test de développement larvaire et le test de paralysie des larves (Prof. BERRAG Boumadiane, 2008).

L'objectif de ce stage est de débiter la mise au point d'un test in vitro au laboratoire de l'URZ : le test Larval Feeding inhibition Assay (LFIA). Afin d'atteindre cet objectif d'optimisation de la méthode, nous commencerons par une brève description du parasite *Haemonchus contortus* ainsi que des différents tests anthelminthiques in vitro, puis nous expliciterons le test LFIA en lui-même ainsi que la problématique de la méthode et les voie choisies pour l'optimisation du test au laboratoire.

I. Revue bibliographique

I.1. Le parasite : *Haemonchus Contortus*

Haemonchus contortus est un parasite très commun et l'un des plus pathogènes nématodes de [ruminants](#) (Sendow, 2003). Le cycle biologique de développement des strongles [schéma 1] est constitué d'une phase externe libre (pâturage) et d'une phase interne, parasitaire.

Lors de la phase libre, les œufs de strongles sont éliminés dans les fèces de l'animal parasité. Sur le sol ces œufs se développent dans des conditions humides dans les fèces pour arriver au stade L1, puis évolue en larve L2, ensuite en larve L3. Les larves L3 sont des larves infestantes, mobiles, migrant sur l'herbe sont ingérées par les ruminants. Elles peuvent survivre sur le pâturage jusqu'à 2 mois en saison humide. Lors de la phase parasitaire, les larves L3 ingérées par l'animal pénètrent dans le tractus digestif, et vont évoluer en stade L4 sur leur site d'implantation dans la caillette (quatrième et dernier estomac). Elles se développent ensuite en larves adultes, stade L5 (maturité sexuelle), s'attachent à la caillette et se nourrissent de sang. Après reproduction, les femelles vont pondre leurs œufs (entre 5000 et 10000 œufs) dans le tractus digestif de l'hôte; ces œufs seront excrétés dans les fèces (matières fécales) et ont une température optimale de développement de 20-30°C. Ce parasite est responsable de l'anémie (la paupière de l'animal est totalement blanche), et la mort des moutons et des cabris, surtout pendant les mois d'été dans les climats chauds et humides.

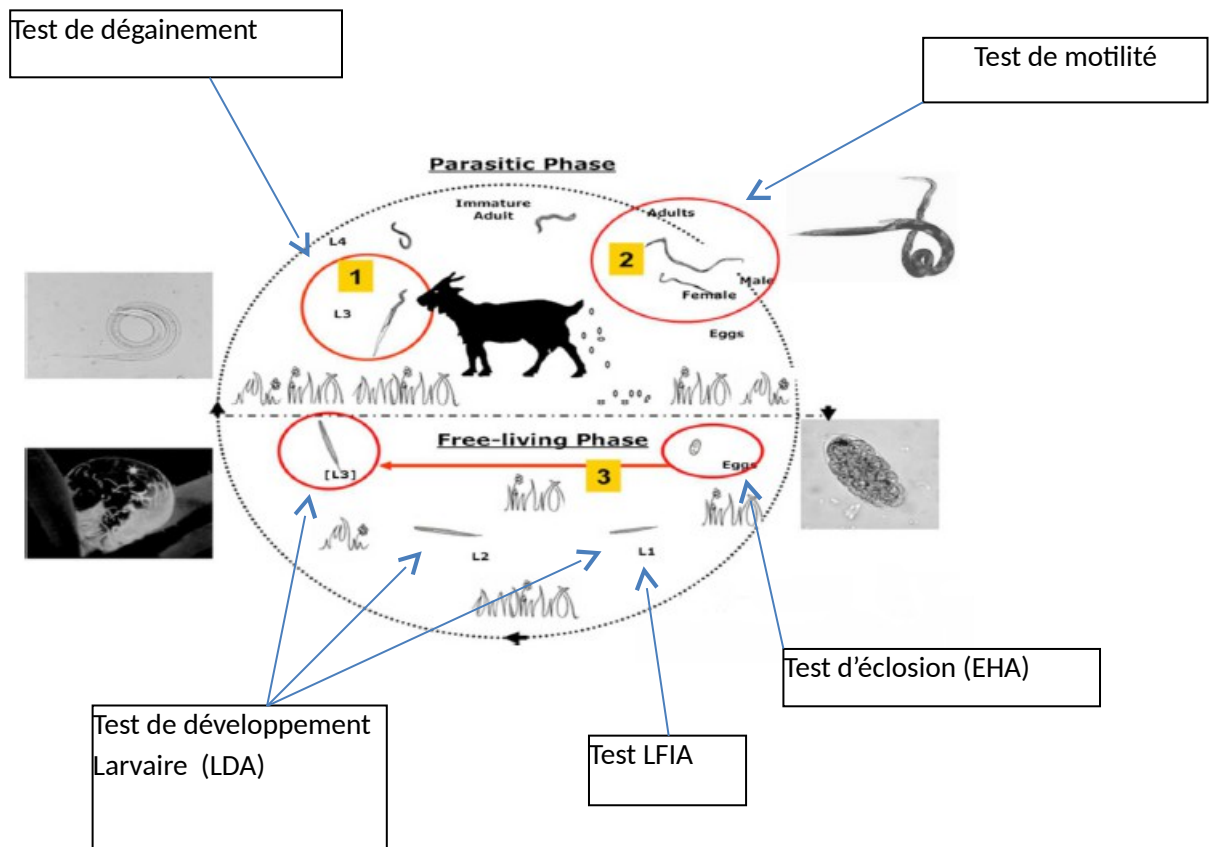


Schéma1. Cycle de développement du parasite nématode *Haemonchus contortus*

(H. Hoste et al. / Veterinary Parasitology 186 (2012) 18– 27, 2011)

I.4. Les différents tests anthelminthiques

I.4.1. Test d'éclosion (EHA)

Ce test a pour but d'examiner in vitro l'effet d'extrait de plante sur l'éclosion des œufs du parasite *Haemonchus contortus*. Les œufs sont récupérés dans les fèces frais d'animaux infestés. Après 24h-48h on dénombre les œufs qui n'ont pas éclos et on calcule le pourcentage d'inhibition d'éclosion. Cette technique est décrite par (Le Jambre et al., 1976).

I.4.2. Test de développement larvaire (LDA)

L'objectif de cette technique décrite par (Hubert and Kerboeuf, 1992) est de tester l'action des tanins condensés à inhiber le développement des larves du stade L1 au stade L3. Les larves L3 obtenues par coproculture, sont mises dans une solution d'extrait de plantes à différentes concentrations. Après 24 heures, les larves sont observées et

classées en normales (mobiles) et paralysées. Le pourcentage de larves paralysées est ensuite calculé pour chaque concentration.

I.4.3. Test de dégainement (LEA)

L'objectif est d'utiliser des extraits de plantes et la concentration la plus adéquate parmi les différents extraits de plantes sera utiliser pour interrompre le dégainement de la larve au stade L3. C'est la technique décrite par (Bahuaud et al., 2006).

I.4.4. Test de motilité

L'objectif est de test est d'observer le nombre de larves adultes (stade L5) actives à intervalles réguliers sous l'effet d'extraits de plantes. Des anthelminthiques paralysant comme matériel de témoins positif (ivermectin) sont utilisés. Les témoins négatifs (PBS) sont inclus. Cette technique est décrite par (Varady et al., 1999).

I.5. Test LFIA

Le but de ce test (Jackson et al., 2010) est d'évaluer l'effet de produits sur le comportement alimentaire des larves au stade L1. Les larves sont incubées à différentes concentrations de produits à tester puis sont mises en contact avec *Escherichia coli* lyophilisée marquée au FITC (L'isothiocyanate de fluorescéine). Les larves qui se sont nourries pourront être identifiées par la fluorescence d'*E.coli*.

Suite à une recherche bibliographique, ce test a été retrouvé dans la littérature [[Annexe](#)] et l'unité de recherches souhaite le mettre en place au laboratoire afin d'affiner l'évaluation de l'effet anthelminthique dans le cadre du programme de recherche sur la valorisation des métabolites secondaires des plantes en production animale.

II. Matériels et méthode

II.1 Problématique de l'étude

La méthode test LFIA retrouvée dans la littérature semble intéressante quant à son apport pour les recherches menées au sein du laboratoire de l'URZ. En effet, il pourrait permettre de compléter les essais concernant la problématique de la valorisation des métabolites secondaires des plantes en santé animale.

Cependant, le document trouvé [[Annexe 2](#)] nécessite une adaptation dû au fait que les matériels et méthode ne soient pas suffisamment détaillés. L'objectif du stage est donc d'optimiser le test LFIA trouvé dans la littérature afin de l'adapter et le mettre en place au laboratoire de l'URZ.

II.2 Principe de l'optimisation

Le test LFIA repose sur l'ingestion de la bactérie *E. coli* par les larves L1, qui permet de mettre en évidence l'efficacité de la substance testée (extrait de plante, produit anthelminthique, ...). Dans notre essai, l'optimisation du test anthelminthique LFIA se fera sur le témoin négatif (larves L1) selon les critères suivants :

- La visibilité des larves L1 ayant ingéré l'*E. coli*.
- L'ingestion complète de l'*E. coli* par les larves L1.
- Le meilleur confort de lecture au microscope.

Afin de mettre en évidence ces critères d'optimisation, les paramètres étudiés seront :

La **fluorescence**, le **temps d'incubation** et le **rinçage**.

La fluorescence est le révélateur de l'ingestion de l'*E.coli* par la larve. Elle est donc le moyen de voir les larves et de mettre en évidence la réussite du test.

Le temps d'incubation dans le fluorochrome est mesuré de manière à déterminer la **durée d'incubation optimale** pour l'**ingestion totale** d'*E.coli* par la larve L1. Cette durée optimale sera mise en évidence par la **distribution de cette fluorescence dans la larve L1**.

Le rinçage est important car c'est le lavage de l'échantillon qui permet d'assurer un **confort visuel** lors de la lecture. Il pourrait aussi influencer sur **l'intensité de la fluorescence**.

II.3 Matériels

II.3.1 Matériel biologique

Pour ce test les larves L1 utilisées sont issues de fèces de caprins infestés expérimentalement à l'INRA par une souche du parasite *Haemonchus contortus* sensible aux anthelminthiques. Les œufs du parasite sont extraits des fèces et mis en culture jusqu'au stade L1 pour la réalisation du test.

II.3.2 Consommables et réactifs

Moulin à légume

tamis (500, 250, 125, 63, 50 et 32 μm)

Solution *E.coli* lyophilisée

Isothiocyanate de fluorescéine (FITC)

Solution saline tamponnée au phosphate (PBS)

Fongizone 200 : médicament antifongique (élimine certains champignons)

Béchers

Flasque (culture des œufs)

Pipette jaugée (10 ml)

Poire à pipeter

Eprouvette graduée (100 ml)

Tube Ependorff® (2 ml)

Tube Falcon® (50 ml)

Micropipettes (p1000, p500, p200, p100, p20)

Agitateur magnétique

Barreau aimanté

Agitateur Vortex

Le fluorochrome Isothiocyanate de fluorescéine (FITC) :

Le FITC (fluorescein isothiocyanate, [Figure1] est un dérivé de la fluorescéine. La fluorescence qu'on observera est due au fluorochrome qui est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. Ce sont des substances composées de plusieurs noyaux aromatiques conjugués ou encore des molécules planes et cycliques qui possèdent une ou plusieurs liaisons π . Les fluorochromes sont utilisés dans plusieurs marquages immunologiques : cytométrie en flux, immunofluorescence.

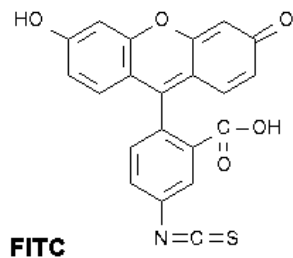


Figure 1. Structure chimique de la molécule fluorescein isothiocyanate (FITC)

II.3.3 Equipements

Centrifugeuses :

Les centrifugeuses permettent de séparer une solution pour obtenir un culot.

- Centrifugeuse Thermo Scientific® ST 40 R [Figure 2]

Capacité de centrifuger des tubes Falcon® de 50 ml et plus pour une force centrifuge relative maximum de 25000 x g et est réfrigérée pour les échantillons sensible à la température comprises entre -10° et +40°C.

- Centrifugeuse Thermo Scientific® MicroCL 17R [Figure 3]

Ce micro centrifuge réfrigérée offre des contrôles de précision avec incréments de 1° de -9° à 40°C. La force centrifuge relative maximum de 17000 x g.



Figure 2. Centrifugeuse contenant les tubes Falcons® 50 ml



Figure 3. Centrifugeuse contenant les tubes Epenforff® 2 ml

Microscope à fluorescence ZEISS® Axioskop HBO 50 [Figure 4] :

Le microscope à fluorescence permet de visualiser des objets qui sont naturellement fluorescents ou des molécules rendues fluorescentes pour mieux les observer (fluorochromes). Une technique utilisant ce microscope a développée, l'immunofluorescence (marquage à l'aide d'un anticorps couplé à un fluorochrome).

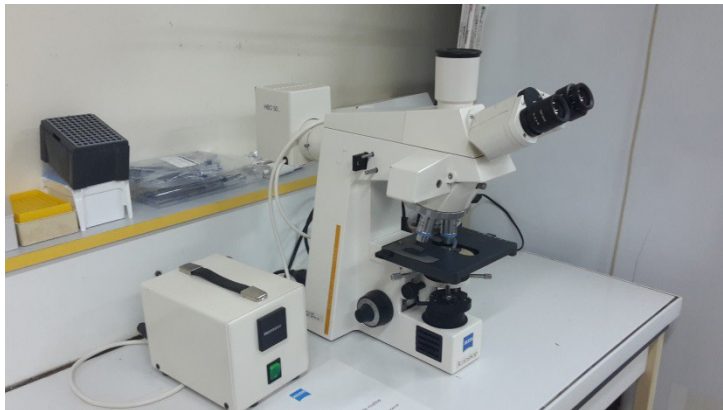


Figure 4. Microscope à fluorescence

II.5 Méthode : Elaboration du test LFIA

Extraction

Les fèces sont broyées au moulin à légumes avec de l'eau puis sont filtrés sur une passoire. Le filtrat, qui contient les œufs, est récupéré. Les œufs des parasites ayant un diamètre compris entre 32 et 50 µm, ils seront extraits grâce à un tamisage successif :

Le filtrat est passé sur différents tamis (500, 250, 125, 63, 50 et 32 µm) puis le résidu (contenant les œufs) retenu au 32 µm est récupéré lorsque l'eau est parfaitement claire. Ce résidu est lavé à l'eau distillée sur tamis de 32µm, puis récupéré dans un bécher contenant de l'eau distillée.

Une coproscopie est réalisée afin d'observer la présence d'œufs dans le résidu d'extraction.

Culture des œufs

Le contenu du bécher (contenant le résidu) est versé dans les tubes Falcons® de 50 ml stériles. On procède à une centrifugation pendant 15 min à 2800 tr/min ensuite on élimine le surnageant puis on ajoute 35 ml de solution NaCl à saturation (d=1.20) et on agite au vortex.

On centrifuge à nouveau 15 min à 2800 tr/min et on verse le culot sur le tamis de 32 µm puis on rince abondamment à l'eau du robinet ensuite à l'eau distillée.

Les œufs sont récupérés à l'aide d'eau distillée dans un tube Falcon 50 ml stérile.

En prélevant 10 fois 10 µl on compte 161 œufs pour 100 µl donc la concentration de cette suspension larvaire est de 1610 œuf/ml.

On prélèvera un volume Y d'œufs correspondant à 6000 œufs : $Y = 6000/C$. $Y < 15$

$Y = 3,72$ environ 4ml

Pour cela on ajoute 22,5 µl de solution *E.coli*, 9 µl de Fongizone 200 et on complète à 15 ml avec du PBS puis on verse la solution dans un flasque qui servira de culture. On obtiendra une suspension larvaire. Les œufs évolueront en larves durant les 24 heures.

Solution d'E coli marqué au FITC

Cette solution permet de visualiser les larves au microscope à fluorescence. Le FITC (fluorescein isothiocyanate) est un dérivé de la fluorescéine. La fluorescence qu'on observera est due au fluorochrome qui est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. . Ce sont des substances composées de

plusieurs noyaux aromatiques conjugués ou encore des molécules planes et cycliques qui possèdent une ou plusieurs liaisons π . Les fluorochromes sont utilisés dans plusieurs marquages immunologiques : cytométrie en flux, immunofluorescence.

Mode de préparation : Les cellules bactériennes (*E.coli*) sont récoltées par centrifugation à 10000 x g pendant 5 min à 4° puis ces cellules sont mises en suspension dans du tampon bicarbonate de sodium à 0.1M et sont diluées à 10^{10} cellules / ml dans un total de 1 ml de bicarbonate de sodium. Une quantité de FITC solution mère est ajoutée à la suspension de cellule puis ce mélange est agité au vortex. Les cellules sont incubées à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante puis sont lavées avec du PBS pour éliminer le colorant non liée et remettre en suspension dans 1 ml de PBS. Cette solution est mise dans un congélateur.

Réalisation du test

5 durées d'incubation seront évaluées (17h, 18h, 19h, 20h et 21h), à raison de 5 types de rinçage (de 1 à 5 rinçages) par durée et une seule répétition.

Dans les 30 tubes Ependorff® identifiés répartir:

100 μ l de suspension larvaire (distribué sous agitation magnétique)

1400 μ l d'eau distillée

10 μ l de solution d'*E.coli* marqué au FITC

On laissera les tubes incuber horizontalement selon les différents temps d'incubations.

Après l'incubation, la centrifugation est de 6000 x g pendant 20 secondes mais ce programme résulte d'un mauvais culot et il y a du résidu présent dans le surnageant.

Donc on a choisi de centrifuger à 11000 x g pendant 40 secondes.

Après les différents temps d'incubation, les microtubes sont passés à la centrifugeuse, puis on récupère le surnageant (750 μ l) et on rince avec 750 μ l de PBS avec et ainsi de suite selon la quantité de rinçage. Certains temps d'incubation possèdent plusieurs répétitions.

Après avoir rincé tous les tubes on procède à la lecture au microscope. Pour cela, un échantillon de 5 μ l a été prélevé pour observer les larves, en procédant de la manière suivante :

- L'intensité de la fluorescence sera notée suivant une note de 1 à 3 :
1 : forte 2 : faible 3 : très faible
- La distribution de la fluorescence dans la larve sera notée de 0 à 1 :
0 : partielle 1 : total

III. Résultats et discussions

Lors de la réalisation de l'essai, quelques difficultés ont été rencontrées : Le programme de centrifugation indiqué dans le mode opératoire de la référence bibliographique ne permettait pas de sédimenter complètement les larves. Il a donc été nécessaire de reprendre la centrifugation jusqu'à arriver à un résultat satisfaisant (11 000 g durant 40 sec). Cependant, les premiers tubes avaient déjà été traités et ont donc suivi le processus avec un nombre de larves récupéré parfois insuffisant [Annexe 1]. Ces tubes n'ont pas été considérés dans l'analyse des résultats.

Les résultats de l'optimisation du test anthelminthique LFIA réalisé sur le témoin négatif (larves L1 en tampon PBS) selon les critères choisis pour l'étude, sont présentés ci-après.

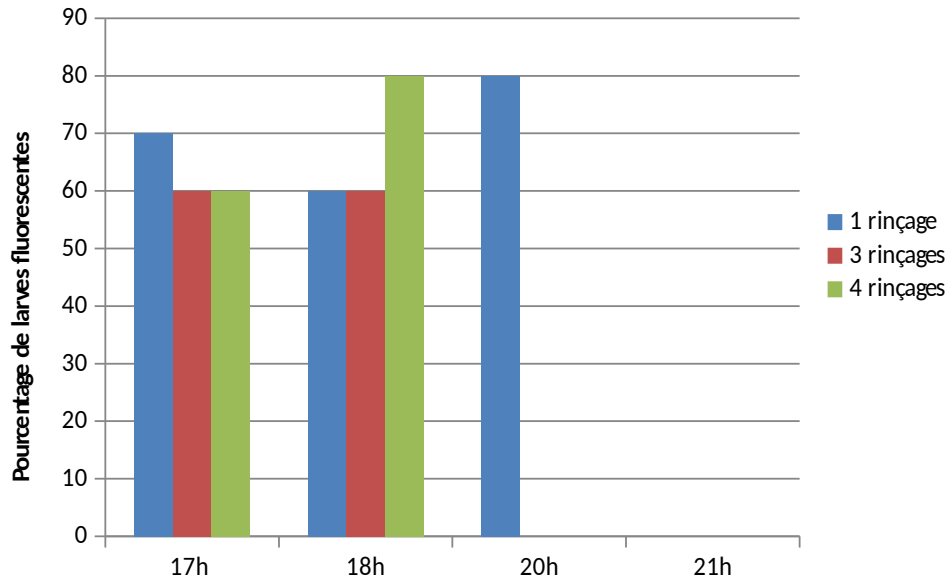
- Visibilité des larves L1 ayant ingéré l'E. coli.

L'observation au microscope des larves post incubation montre des larves fluorescentes [graphique 1]. Cela signifie que les larves ont bien ingéré l'*E.coli* marqué par le fluorochrome. Le test s'est donc bien déroulé.

- Ingestion de l'E. coli par les larves L1, durée d'incubation

De manière générale, il est observé une majorité (60 à 80%) de larves ayant ingéré l'*E. coli* marqué au fluorochrome [graphique 1]. Cela signifie que le test est utilisable pour la mise en évidence de l'effet d'un produit. En effet pour ce test le témoin négatif doit être majoritairement fluorescent, tandis que le témoin positif (ou un produit actif) donnera une majorité de larves non fluorescentes.

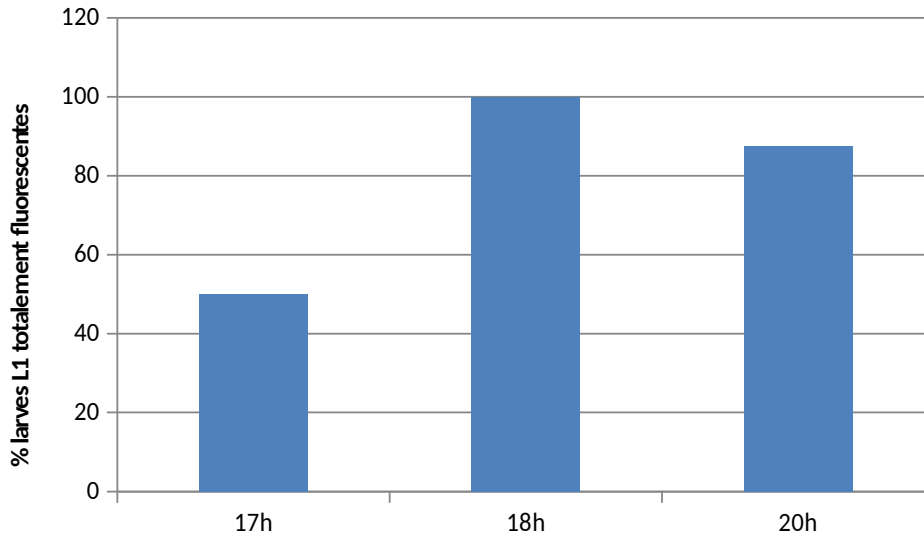
Pourcentage de larves L1 fluorescentes en fonction du temps et du nombre de rinçages



Graphique 1. Effet du nombre de rinçage et de la durée d'incubation sur le pourcentage de larves fluorescentes.

D'autre part, il est observé une augmentation de la distribution de la fluorescence dans la larve au fil du temps [graphique 2]. Cela montre que les larves ingèrent progressivement l'*E.coli*. Les résultats obtenus montrent que la durée d'incubation pour le test devrait se situer entre 18h et 20h afin d'avoir un maximum d'ingestion par la larve L1.

Pourcentage de larves L1 totalement fluorescentes en fonction du temps d'incubation



Graphique 2. Distribution de la fluorescence dans les larves L1 en fonction du temps d'incubation pour le test LFIA.

- Confort de lecture au microscope.

L'intensité obtenue assure un confort de lecture et permettra une meilleure discrimination. La différence d'intensité observée est due à la plus ou moins grande ingestion par les larves, d'*E.coli* marqué.

A l'issue de cet essai, la différence entre les larves fluorescentes et non fluorescentes est bien marquée [photo 1]. La fluorescence plus intense facilite l'appréciation qualitative visuelle de la fluorescence. Le confort de lecture est donc obtenu et la discrimination des larves rendue possible.

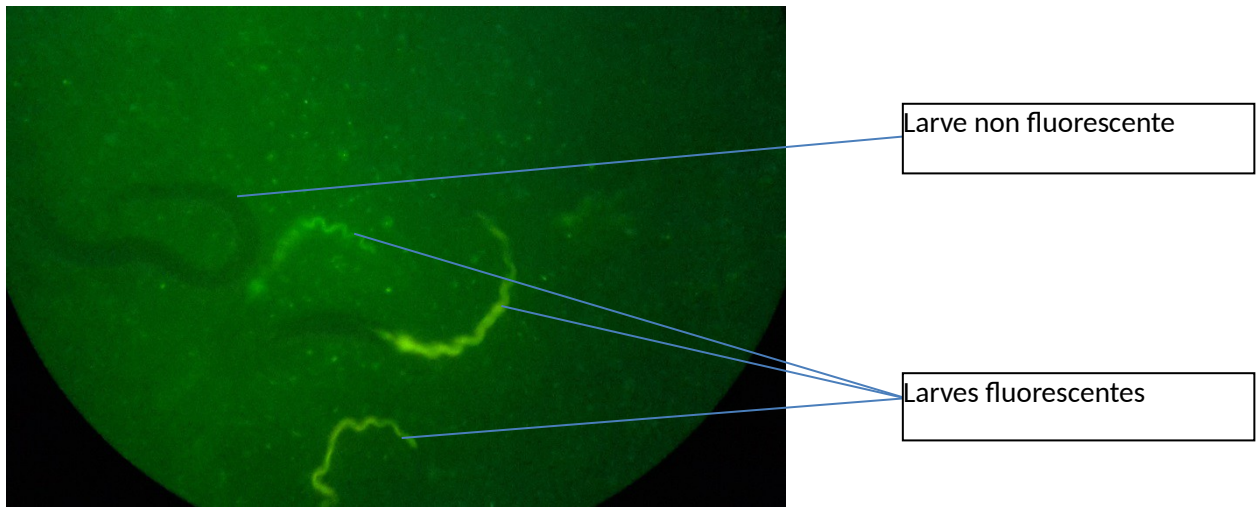
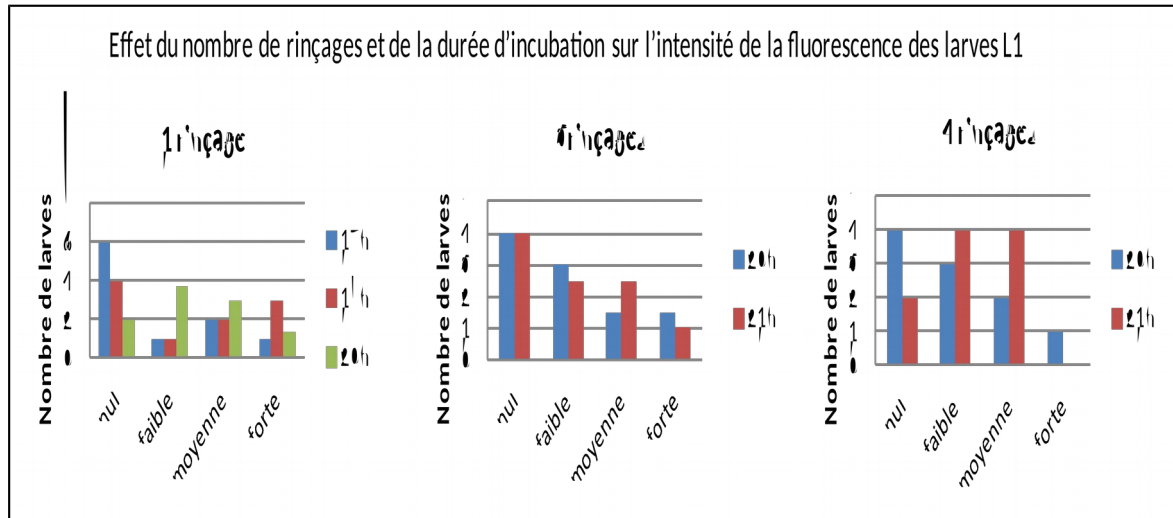


Photo 1. Larves au microscope à fluorescence.

A même durée d'incubation (20h), quel que soit le nombre de rinçages, il est toujours observé la même tendance [Graphique 3]. Il n'y a donc pas d'effet du rinçage sur l'intensité de la fluorescence.

Si l'on s'intéresse au nombre de larves fortement fluorescentes, il est observé une différence d'intensité de la fluorescence au bout de 21h d'incubation [Graphique 3]. Il semblerait qu'il y ait un effet de la durée d'incubation sur l'intensité de la fluorescence et que l'intensité augmente au bout de 21h d'incubation.

De plus, lors de l'observation il n'a pas été noté de différence significative de la qualité de l'échantillon et sa lisibilité (élimination de résidus) en fonction du nombre de rinçages. Un seul rinçage est donc satisfaisant.



Graphique 3. Effet du nombre de rinçages et de la durée d'incubation dans le fluorochrome sur l'intensité de la fluorescence des larves L1 *d'Haemonchus contortus*.

IV. Conclusion

L'objectif du stage était d'optimiser le test LFIA retrouvé dans la littérature afin de le mettre en place au laboratoire de l'URZ.

L'adaptation du test anthelminthique dans le but de permettre la réalisation d'un essai fiable et de qualité, portait sur deux paramètres : le temps d'incubation et le rinçage. La quantité de larves marquées (fluorescence globale) a mis en évidence la réussite du test.

A l'issue de cet essai, il est conclu que :

- 1 rinçage suffit pour assurer une bonne qualité d'échantillon et un confort de lecture.
- La durée d'incubation à choisir pour un bon confort de lecture se situerait entre 18h et 20h.
- Une durée d'incubation de 21h augmente l'intensité de la fluorescence.

Ce stage a constitué une première étape d'optimisation. Il s'agit là d'un essai préliminaire qu'il convient de compléter par de nouvelles mises au point, notamment concernant la durée d'incubation à affiner et la centrifugation des larves à améliorer.

Ce stage d'un mois a été très positif et m'a permis d'enrichir mes connaissances et mon savoir-faire pour la suite de mes études. J'ai acquis des expériences notamment dans le domaine du travail, créer des liens qui me permettront de peut-être de continuer dans cette voie qui est la microbiologie. Cependant il y a toujours divers difficultés dans ce domaine que ce soit dans les tests ou résultat qui font parties de la biologie.

Annexe 1

E.coli marqué au FITC (μ l)	Durée d'incubation	Nb rinçage	Répétition	Intensité fluorescence				Distribution fluo dans L1	
				0	1	2	3	0	1
10	17	1	1	6	1	2	1	2	2
10	17	2	1	0	2	3	5	2	8
10	17	3	2	0	0	0	0	0	0
10	17	3	2	0	0	0	0	0	0
10	17	4	1	0	0	0	0	0	0
10	17	5	1	0	1	0	0	1	0
10	18	1	1	4	1	2	3	0	6
10	18	2	1	0	0	2	0	0	2
10	18	3	2	0	1	0	0	1	0
10	18	3	2	0	0	0	0	0	0
10	18	4	1	0	0	0	0	0	0
10	18	5	1	0	0	0	0	0	0
10	19	1	1	0	0	0	0	0	0
10	19	2	1	2	0	0	0	0	0
10	19	3	2	0	0	0	0	0	0
10	19	3	2	0	0	0	0	0	0
10	19	4	1	1	0	1	0	0	1
10	19	5	1	0	0	0	0	0	0
10	20	1	1	2	3	2	1	2	6
10	20	2	1	2	0	1	0	0	1
10	20	3	1	5	2	0	3	0	5
10	20	3	2	3	4	3	0	0	7
10	20	4	1	4	3	2	1	2	4
10	20	5	1	8	0	1	1	1	1
10	21	1	0	0	0	0	0	0	0
10	21	2	0	0	0	0	0	0	0
10	21	3	1	3	3	3	1	1	6
10	21	3	2	5	2	2	1	0	5
10	21	4	1	2	4	4	0	0	8
10	21	5	1	6	2	2	0	0	4

Tableau 1. Tableau de valeurs avec l'intensité de la fluorescence des larves, le temps d'incubation et le nombre de rinçage

1.3. Larval feeding inhibition assay (LFIA)

The assay determines the effect of plant products on the feeding behaviour of first stage larvae [8-9]. First stage larvae that have been exposed to different concentrations of the test (plant) product are subsequently offered lyophilised *Escherichia coli* that are labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC). Larvae that have fed can be readily identified using an inverted fluorescence microscope by the presence of the labelled *E. coli* in their gut.

Materials

- Lyophilised *E. coli*
- Fluorescein isothiocyanate FITC
- Bicarbonate buffer (pH 9.6)
- Phosphate Buffered Saline (PBS)
- Inverted fluorescence microscope (Blue Filter 475–490 nm)

Procedures

Fluorescein isothiocyanate (FITC) labelling of lyophilised Escherichia coli for use in larval feeding inhibition assay (LFIA)

1. Incubate 1 ml of concentrated *E. coli* (2250 µg *E. coli* in 1 ml bicarbonate buffer containing 1 mg of FITC) in a 2 ml microcentrifuge tube at 20°C for 2 h.
- 2 Centrifuge *E. coli* suspension at 18000 x g for 2 min.
- 3 Remove supernatant using a vacuum line. Re-suspend *E. coli* pellet in 1 ml of PBS.
- 4 Repeat steps 2 and 3 twice.
- 5 Re-suspend *E. coli* in 1 ml of PBS.
- 6 Aliquot in 500 µl portions and store at -20 °C for subsequent use.

Larval Feeding Inhibition Assay (LFIA)

1. Add 100 first stage larvae in 100 µl of distilled water to 500 µl of the plant extract (at 10, 5, 2.5, 1.25 mg/ml in distilled water) and mix thoroughly with a further with 900 µl of distilled water. For negative control data add 100 µl of the larval suspension to 1400 µl of distilled water and for the positive ivermectin controls add 100 µl of the larval suspension to 1390 µl of distilled water and 10 µl of 1000 µg/ml ivermectin solution.
2. Incubate tubes horizontally at 25 °C for 2 h.
3. Add 10 µl of FITC labelled *E. coli* and incubate tubes horizontally for a further 18 h at 25 °C.

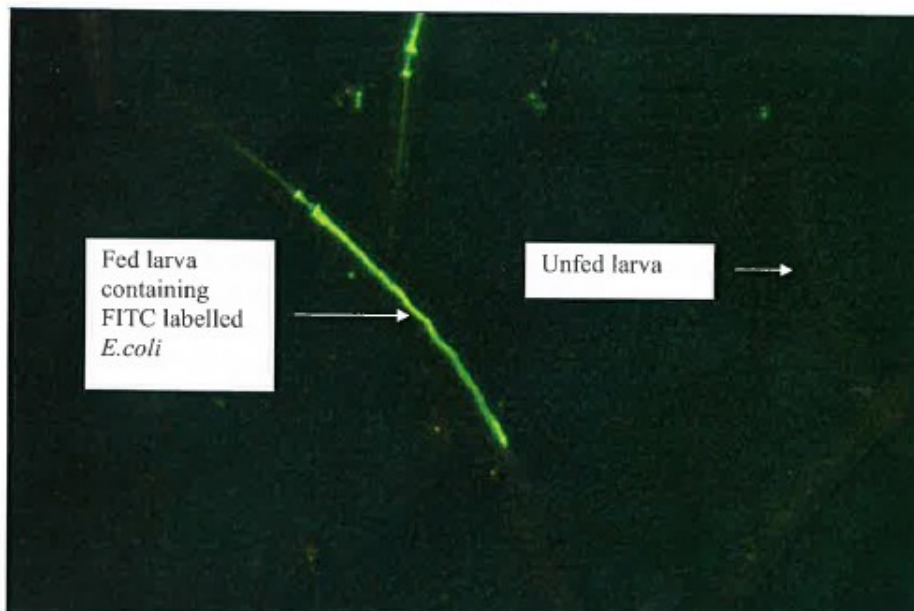
4. Microfuge tubes at 6000 g for 20 seconds to 'pellet' worms, remove 750 μ l of supernatant.
5. Examine larvae from the pellet under inverted fluorescence microscope fitted with blue filter.
6. Determine the number of feeding/fed and non feeding/unfed larvae at each test concentration, plate 3.

Calculate mean numbers of eggs and larvae at each concentration and the percentage hatch using the formula:

$$\text{Percentage feeding} = (\text{number of fed larvae}) \times 100 / (\text{number of fed and unfed larvae})$$

Plot the percentage feeding at each concentration on a graph and calculate the LF_{50} value (concentration of compound at which 50 % of the larvae fail to feed).

Plate 3 First stage larvae that have fed on FITC labelled *E. coli* (A) and those that have been unable to feed (B) as seen under a fluorescence microscope.



8. Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., & Hoste, H. (2005) Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology*, **131**, 531-538.
9. Geary, T.G., Sims, S.M., Thomas, E.M., Vanover, L., Davis, J.P., Winterrowd, C.A., Klein, R.D., Ho, N.F.H., & Thompson, D.P. (1993) *Haemonchus-contortus* - ivermectin-induced paralysis of the pharynx. *Experimental Parasitology*, **77**, 88-96.

Références bibliographiques

- Azando, E.V., Hounzangbe-Adote, M.S., Olounlade, P.A., Brunet, S., Fabre, N., Valentin, A., Hoste, H., 2011. Involvement of tannins and flavonoids in the in vitro effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. *Veterinary parasitology* 180, 292-297.
- Bahuaud, D., Martinez-Ortiz de Montellano, C., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the in vitro exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132, 545-554.
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F., Sandoval-Castro, C.A., 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary parasitology* 186, 18-27.
- Hubert, J., Kerboeuf, D., 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record* 130, 442-446.
- Jackson, Franck, and Hervé Hoste, 2010. In vitro methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. Chapter 3, 25- 45.
- Le Jambre, L.F., Southcott, W.H., & Dash, K.M. (1976) Resistance of selected lines of *Haemonchus contortus* to thiabendazole, morantel tartrate and levamisole. *International Journal for Parasitology*, 6, 217-222.
- Marie-Magdeleine, C., Udino, L., Philibert, L., Bocage, B., Archimede, H., 2010. In vitro effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology* 173, 85-92.
- Prof. BERRAG Boumadiane, 2008. La résistance aux anthelminthiques chez les ruminants : situation actuelle et mesures de contrôle. Transfert de technologie en agriculture, n°168.
- Sendow, J., 2003. *Haemonchus contortus*, Animal Diversity Web. University of Michigan Museum of zoology.
- Varady, M. & Corba, J. (1999) Comparison of six in vitro tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. *Veterinary Parasitology*, 80, 239-249.

http://transfaire.antilles.inra.fr/IMG/pdf/Controle_integre-1.pdf

<http://www.moredun.org.uk/vitro-methods-primary-screening-plant-products-direct-activity-against-ruminant-gastrointestinal-nem>

