

**Contribution à l'étude des modalités de la réaction inflammatoire chez le mouton lors de co-infestations par *Oestrus ovis* et par des nématodes : *Haemonchus contortus* ou *Teladorsagia circumcincta*.**

Dosage de la protéinémie et de deux protéines positives de la phase aiguë : la céruloplasmine et l' $\alpha$ -1-antitrypsine

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2005  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Alexandra CUCCUINI**  
Née, le 24 décembre 1979 à NÎMES (Gard)

---

**Directeur de thèse : Mme le Docteur Lydie BRET-BENNIS**

---

**JURY**

PRESIDENT :  
**M. Alexis VALENTIN**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
**Mme Lydie BRET-BENNIS**  
**M. Philippe JACQUIET**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Toulouse, 2005

Nom : Cuccuini

Prénom : Alexandra

**Titre :** Contribution à l'étude des modalités de la réaction inflammatoire, chez le mouton, lors de co-infestations par *Cestrus ovis* et/ou par des nématodes : *Hæmonchus contortus* et *Teladorsagia circumcincta*. Dosage de la protéinémie et de deux protéines positives de la phase aiguë : la céruloplasmine et l' $\alpha$ -1-antitrypsine.

**Résumé :** La réaction inflammatoire est caractérisée par de nombreuses modifications biochimiques et cellulaires, et en particulier par une élévation, non spécifique, de la concentration en protéines totales ainsi qu'une modification du métabolisme de certaines protéines de la phase aiguë, telles que la céruloplasmine ou l' $\alpha$ -1-antitrypsine. Dans cette étude, la céruloplasmine apparaît comme étant un bon marqueur de poly-infestations par des larves d'*Cestrus ovis*, pouvant avoir d'éventuelles applications pratiques en médecine vétérinaire, alors que l' $\alpha$ -1-antitrypsine ne semble présenter aucun intérêt dans la détection de foyers inflammatoires d'origine parasitaire. Les expériences présentées ont également permis d'explorer les effets du parasitisme à distance. Ainsi, il ressort que les infestations répétées par des larves d'œstres ont des conséquences défavorables sur le développement et la fécondité des strongles. A l'inverse, les strongles ne semblent pas interférer avec la biologie des larves de diptères. Les œstres confèreraient donc à l'hôte une résistance à l'infestation par certains nématodes. Ceci a pu être confirmé par le suivi de paramètres sanguins tels que l'hématocrite, l'éosinophilie sanguine et la concentration en protéines totales.

**Mots-clés :** réaction inflammatoire, ovins, céruloplasmine,  $\alpha$ -1-antitrypsine, *Cestrus ovis*, *Teladorsagia circumcincta*, *Hæmonchus contortus*, résistance parasitaire.

---

**Title :** Study of modalities of the inflammatory response, in sheep, co-infected with *Cestrus ovis* larvae and/or by nematodes larvae such as *Hæmonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta*. Titration of proteinemia and of two positive acute phase proteins : ceruloplasmin and  $\alpha$ -1-antitrypsin.

**Abstract :** The inflammatory response is characterised by numerous biochemical and cellular variations and especially by a non specific rise of total serum protein concentration as well as metabolism modifications of acute phase proteins such as ceruloplasmin and  $\alpha$ -1-antitrypsin. In this study, ceruloplasmin appeared to be a good marker of sheep poly-infestation by *Cestrus ovis* larvae. Thus, several applications to veterinary medicine can be considered whereas  $\alpha$ -1-antitrypsin serum concentration evaluation does not present any interest in detecting parasitological inflammatory phenomena. This study was also performed to examine reciprocal effects of these two types of parasites. These results tend to demonstrate that repeated infections by *O. ovis* larvae have a prominent influence on the growth and egg laying capacity of a subsequent *H. contortus* or *T. circumcincta* infection. On the other hand, the presence of nematodes in sheep abomasa has no marked influence over the development of *O. ovis* larvae in the upper respiratory tract. Diptera larvae seem to confer protective immunity against nematode infections. This type of research can also permit to develop genetic selection in order to obtain sheep resistant to specific parasites and to reduce the use of anti-parasitic drugs.

**Keywords :** inflammatory reaction, sheep, ceruloplasmin,  $\alpha$ -1-antitrypsin, inflammatory indicator, acute phase proteins, total serum proteins, mixed infections, *Cestrus ovis*, *Hæmonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, parasitic resistance.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	<b>P. DESNOYERS</b>
Directeurs honoraires.....	: M.	<b>R. FLORIO</b>
	M.	<b>J. FERNEY</b>
	M.	<b>G. VAN HAVERBEKE</b>
Professeurs honoraires.....	: M.	<b>A. BRIZARD</b>
	M.	<b>L. FALIU</b>
	M.	<b>C. LABIE</b>
	M.	<b>C. PAVAU</b>
	M.	<b>F. LESCURE</b>
	M.	<b>A. RICO</b>
	M.	<b>A. CAZIEUX</b>
	Mme	<b>V. BURGAT</b>
	M.	<b>D. GRIESS</b>
	M.	<b>J. CHANTAL</b>
	M.	<b>J.-F. GUELF</b>
	M.	<b>M. ECKHOUTTE</b>

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

---

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

---

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy-Pierre**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

**PROFESSEURS 2<sup>e</sup> CLASSE**

---

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

**PROFESSEUR ASSOCIE**

---

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*

**INGENIEUR DE RECHERCHES**

---

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique équine*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

---

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

## MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

---

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

## MAÎTRE 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, *Productions animales*  
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*  
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. MARENDI Marc, *Pathologie de la reproduction*  
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*  
Mme MESSUD-PETIT Frédérique, *Pathologie infectieuse*  
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*  
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*  
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*  
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*  
M. SANS Pierre, *Productions animales*  
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*  
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

## MAÎTRE DE CONFERENCES CONTRACTUELS

---

M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*  
N. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*  
M. LEON Olivier, *Elevage et santé en productions avicoles et porcines*

## MAÎTRE DE CONFERENCES ASSOCIE

---

M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

## ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

---

M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*  
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*  
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*  
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*  
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*

**A notre président de jury :**

Monsieur le Professeur Alexis Valentin,  
Professeur de parasitologie à la Faculté de pharmacie de l'Université Paul Sabatier Toulouse-III  
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.  
Remerciements et hommages respectueux.

**A notre jury de thèse :**

Madame le Docteur Lydie Bennis-Bret,  
Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Physique et Chimie biologiques et médicales  
Un grand merci à celle qui nous a beaucoup soutenu et guidé dans l'élaboration de ce travail.  
Qu'elle trouve ici l'expression de notre vive reconnaissance.

Monsieur le Docteur Philippe Jacquet,  
Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Parasitologie et maladies parasitaires  
Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.  
Qu'il soit assuré de toute notre gratitude.



Remerciements aux équipes de recherche du projet franco-britannique ALLIANCE, centre UMR 1225, "Interactions Hôtes-Agents Pathogènes", de l'INRA de Toulouse, et du "Moredun Research Institute" d'Edinburgh.





A mes parents,  
pour leur amour, pour m'avoir toujours soutenue en toutes circonstances, dans la joie et dans la tristesse,  
pour m'avoir toujours encouragée à aller au bout de mes rêves et de mes ambitions,  
qu'ils trouvent ici la modeste récompense de leurs efforts,  
je vous aime.

A Olivier,  
merci pour ton soutien de chaque instant,  
à notre amour résistant à toute épreuve, même à la distance,  
merci pour toutes les joies de la vie que tu me fais découvrir,  
à ton optimisme, à mon rayon de soleil,  
à notre vie future,  
Je t'aime.

A celui par qui tout a commencé, Roland, mon grand-père.

A ma famille,  
Aux dominicaines, Miette et Sylvie, merci d'avoir toujours cru en moi,  
à tous les moments d'affection et de câlins partagés,  
à votre nouvelle vie, malgré la distance, vous garderez toujours une très grande place dans mon coeur.  
A Kathia, Stéphan, Christophe, Nathalie et Gérard,  
merci d'avoir toujours été là pour moi,  
à toutes les bonnes bouffes bien arrosées et à tous les moments passés tous réunis, en famille.  
A mon neveu et toutes mes nièces : Sébastien, Léa, Eva, Margot et Emma.

A toute la bande, Michou, Isa, Ade, Mô, Cécile, Mathilde, Charlotte, Elodie et tous les autres,  
à toutes ces préchauffes partagées, à toutes les personnalités délurées ainsi révélées, à Ricard et à Get, nos amis de toujours, aux trous noirs et aux sauts dans le vide. En espérant que nos chemins ne s'éloignent pas trop et que la vie nous rassemble à nouveau !

A Steph, pour ton amitié et ta générosité, mille mercis.

A Adrien et Ano,  
malgré des débuts difficiles, merci d'avoir été présents dans les coups durs, merci de votre soutien,  
merci pour ... Weaver!

A toute la famille d'Olivier,  
merci pour tous ces agréables moments partagés, à Toulouse comme à l'autre bout du monde,  
merci pour m'avoir toujours acceptée telle que je suis.

# Table des matières

Liste des figures	18
Liste des tableaux	19
Table des abréviations	21
<b>Introduction</b>	<b>25</b>
<b>1<sup>ère</sup> partie : Etude bibliographique</b>	<b>27</b>
<b>I La réaction inflammatoire systémique</b>	<b>29</b>
A Définition . . . . .	29
B Dynamique de la réaction inflammatoire . . . . .	30
1 Les différentes étapes de la réaction inflammatoire . . . . .	30
2 Synthèse et recrutement des médiateurs de la RI . . . . .	32
3 Modifications hormonales et métaboliques au cours de la RI . . . . .	34
C Les PPA . . . . .	35
1 Définitions . . . . .	35
2 Classification des PPA . . . . .	35
3 Structure des principales PPA du mouton . . . . .	37
4 Fonctions . . . . .	39
5 Dosage des marqueurs de l'inflammation . . . . .	41
<b>II La RI au cours d'infestations parasitaires</b>	<b>47</b>
A L'œstrose ovine : définition et manifestations cliniques . . . . .	47
1 Présentation . . . . .	47
2 Cycles externe et interne du parasite <i>Æstrus ovis</i> . . . . .	48
3 Manifestations cliniques . . . . .	50
4 Pathogénie de l'œstrose ovine . . . . .	52
B Infestation par <i>T. circumcincta</i> et <i>H. contortus</i> . . . . .	53

1	Classification . . . . .	53
2	Morphologie . . . . .	54
3	Biologie . . . . .	54
C	Modalités de la RI lors d'infestations parasitaires . . . . .	57
1	Importance de l'immunité naturelle . . . . .	57
2	RI et immunité acquise face à des infestations par des nématodes et des larves de diptères . . . . .	57
<b>2<sup>ème</sup> partie : Etude expérimentale</b>		<b>81</b>
<b>I</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>83</b>
A	Animaux . . . . .	83
B	Analyses . . . . .	85
1	Validation des infestations parasitaires . . . . .	85
2	Mise en évidence de la réaction inflammatoire . . . . .	86
3	Analyses statistiques . . . . .	90
<b>II</b>	<b>Résultats</b>	<b>91</b>
A	Confirmation des infestations parasitaires . . . . .	91
1	Infestations par <i>Cæstrus ovis</i> . . . . .	91
2	Infestations par <i>Teladorsagia circumcincta</i> et <i>Hæmonchus contortus</i> . . . . .	92
B	Réactions organiques face aux différentes infestations . . . . .	97
1	Comptage éosinophilique et hématocrite . . . . .	97
2	Protéines totales : dosage par réfractométrie et par le bleu de Coomassie . . . . .	99
3	Dosage de la céruloplasmine . . . . .	101
4	Dosage de l' $\alpha$ -1-antitrypsine . . . . .	102
C	Corrélation entre les différents marqueurs analysés . . . . .	102
<b>III</b>	<b>Discussion</b>	<b>105</b>
A	Mise en évidence des infestations parasitaires . . . . .	105
B	Modalités de la RI face à une ou plusieurs infestations . . . . .	108
1	Profil des variations des paramètres organiques étudiés . . . . .	108
2	Eosinophilie sanguine et hématocrite . . . . .	108
3	Les protéines sériques : témoins d'atteinte de l'intégrité tissulaire . . . . .	110
C	Interactions hôte-parasites, influences réciproques . . . . .	116
1	Mécanismes de la RI mis en jeu au cours de l'œstrose . . . . .	116
2	La RI mise en jeu lors du parasitisme gastro-intestinal . . . . .	118
3	Mécanisme de la RI mis en jeu lors de co-infestations parasitaires . . . . .	119

<i>TABLE DES MATIÈRES</i>	15
<b>Conclusion</b>	<b>123</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>127</b>
<b>Annexes</b>	<b>137</b>
<b>I Caractéristiques métrologiques d'une méthode</b>	<b>137</b>
A Répétabilité et reproductibilité . . . . .	137
B Sensibilité . . . . .	137
C Limites de détection et de quantification . . . . .	137
D Limite supérieure de linéarité . . . . .	137
E Exactitude . . . . .	138
<b>II Caractéristiques des méthodes utilisées</b>	<b>139</b>
A Caractéristiques métrologiques du dosage de la Cp . . . . .	139
B Caractéristiques métrologiques du dosage de l' $\alpha$ -1-AT . . . . .	141



# Table des figures

1	Mécanisme général de l'induction de la synthèse des protéines de la phase aigüe	33
2	Cycle parasitaire d' <i>Cestrus ovis</i>	49
3	Cycle parasitaire d' <i>Hæmonchus contortus</i> et de <i>Teladorsagia circumcincta</i>	55
4	Polarisation de la réaction inflammatoire vers un type TH1	61
5	Polarisation de la réaction inflammatoire vers un type TH2 après parasitoses des muqueuses respiratoire et gastro-intestinale	62
6	Protocole d'administration	84
7	Evolution de la concentration moyenne en IgG anti- <i>Cestrus ovis</i> (% ELISA), pour chaque lot, au cours du temps	93
8	Evolution de la concentration moyenne en pepsinogène sérique, en mU tyrosine/L, pour chaque lot au cours du temps	96
9	Evolution de l'éosinophilie sanguine moyenne, en pourcentage, pour chaque lot, au cours du temps	98
10	Evolution de l'hématocrite moyen, en pourcentage, pour chaque lot, au cours du temps	98
11	Concentration moyenne en protéines totales, en g/L, pour chaque lot, en fonction du temps (méthode: réfractométrie)	100
12	Concentration moyenne (et valeurs extrêmes) en protéines totales, pour chaque lot, à J-39 (méthode: réfractométrie)	100
13	Concentration moyenne en protéines totales, en g/L, pour chaque lot, en fonction du temps (méthode: bleu de Coomassie)	101
14	Synthèse de l'évolution des paramètres sanguins au cours d'infestations parasitaires	115
15	Synthèse des interactions entre les larves d' <i>O. ovis</i> et de nématodes	121
16	Relation entre la variation d'absorbance mesurée et la concentration en Cp	139

17 Relation entre la variation d'absorbance mesurée et le pourcentage d'inhibition  
trypsique . . . . . 141



# Liste des tableaux

1	Synthèse des éléments de la RI mis en œuvre lors d'infestations parasitaires . . .	78
2	Synthèse des mécanismes déployés par l'hôte conduisant à l'expulsion et à l'élimination de parasites extra-cellulaires . . . . .	79
3	Moyenne ( $\pm$ erreur standard) et pourcentage du comptage de larves d' <i>Æstrus ovis</i> à l'autopsie (J-95) pour chaque lot . . . . .	93
4	Relation entre le pourcentage d'installation, le nombre total de larves d' <i>Æstrus ovis</i> et le pourcentage ELISA pour quelques moutons, à J-95 . . . . .	95
5	Résultat des coproscopies pour les strongles <i>T. circumcincta</i> et <i>H. contortus</i> en nombre d'œufs par gramme de fèces (moyenne $\pm$ écart-type) . . . . .	95
6	Moyenne ( $\pm$ erreur standard) du comptage de larves de strongles pour chaque lot à l'autopsie (J-95) . . . . .	96
7	Concentration moyenne en Cp ( $\pm$ déviation standard), pour chaque lot, en fonction du temps . . . . .	103
8	Valeur du pourcentage d'inhibition tryptique moyen ( $\pm$ déviation standard), pour chaque lot, en fonction du temps . . . . .	103
9	Relation entre le pourcentage ELISA (IgG anti-œstres) et la concentration en Cp (U/mL), pour quelques moutons, à J-53. . . . .	104
10	Imprécision déterminée pour le dosage de la Cp dans le sérum de mouton . . . .	140
11	Imprécision déterminée pour le dosage de l' $\alpha$ -1-AT dans le sérum de mouton . .	142



# Table des abréviations

Abréviation	Signification
$\alpha$ -1-AGP	$\alpha$ -1-glycoprotéine acide
$\alpha$ -1-AT (ou $\alpha$ -1-PI)	$\alpha$ -1-antitrypsine (ou $\alpha$ -1-proteinase inhibitor)
$\alpha$ -2-M	$\alpha$ -2-macroglobuline
Ac	anticorps
ACTH	adreno-corticotrophic hormon
ADCC	cytotoxicité dépendante des Ac
Ag	antigène
ApoA1	apolipoprotéine A1
AT-III	anti-thrombine-III
BAPNA	$\alpha$ -N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide
BRF	basophil releasing factor
CD	cellule dendritique
Cp	céruloplasmine
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CRF	corticotrophin releasing factor
CRP	protéine C-réactive
CV	coefficient de variation
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DO	densité optique
ECEF	eosinophil cytotoxicity enhancing factor
ECF	eosinophil chemotactic factor
ECFA	eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis
ECP	eosinophil cationic protein
EDN	eosinophil derivated neurotoxin
ELISA	enzyme linked immuno-sorbent assay
EPxO	eosinophil peroxydase
ERF	eosinophil releasing factor
ES	excrétion / sécrétion
Fb	fibrinogène

Abréviation	Signification
FGF	fibroblast growth factor
GB	granulocyte basophile
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GE	granulocyte éosinophile
GH	growth hormon
GM-CSF	granulocyte-monocyte colony stimulating factor
GN	granulocyte neutrophile
GRF	granulocyte releasing factor
<i>H. contortus</i>	<i>Hæmonchus contortus</i>
Hb	hémoglobine
HDL	high density lipoprotein
HETE	acide hydroéicosatétranoïque
HGFs	hematopoietic growth factors
Hp	haptoglobine
HPLC	high performance liquid chromatography
HS	hypersensibilité
IDL	intermediate density lipoprotein
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
INF	interféron
L1	larves de parasite de premier âge
L2	larves de deuxième âge
L3	larves de troisième âge
L4	larves de quatrième âge
LDL	low density lipoprotein
LMI	larval migratory inhibitor
LPS	lipopolysaccharide
LT	lymphocyte T
LTh	lymphocyte T helper
MBP	major basic protein
MM	mastocyte muqueux
MS	mastocyte séreux
NK	natural killer
NRF	neutrophil releasing factor
<i>O. ovis</i>	<i>Œstrus ovis</i>
PAF	platelet activating factor
PDGF	platelet derivated growth factor

Abréviation	Signification
PG	prostaglandine
PPA	protéine de la phase aiguë
PPE	élastase pancréatique de porc
PT	protéines totales
RI	réaction inflammatoire
SAA	serum amyloid A
SCF	stem cell factor
SMCP	sheep mast cell protease
SOD	superoxyde dismutase
SRS-A	slow reacting substance of anaphylaxis
<i>T. circumcincta</i>	<i>Teladorsagia circumcincta</i>
TGF	transforming growth factor
TIC	capacité d'inhibition trypsique
TNF	tumor necrosis factor
VLDL	very low density lipoprotein



# Introduction

Les ruminants vivant à l'extérieur sont largement exposés aux problèmes de parasitismes gastro-intestinaux et/ou respiratoires, ayant de nombreuses conséquences médicales et économiques. Aussi, la plupart des individus sont victimes de poly-infestations. Des Trichostrongylidés des genres *Hæmonchus* et *Teladorsagia*, parasites de la caillette des petits ruminants, peuvent co-exister avec des infestations par des diptères, agents de myiases, tels que *Cæstrus ovis*, dont la répartition géographique apparaît assez étendue notamment aux régions méditerranéennes et tropicales [15, 31, 132]. Ainsi, quelques études ont tenté de démontrer quel genre d'influence peut exercer un parasite sur l'autre, au niveau macroscopique en terme de cinétique des populations parasites et au niveau moléculaire, en terme d'orientation de la réaction inflammatoire. Des études menées par Yacob *et al.* [129, 130] ont permis de mettre en évidence que les moutons infestés par des larves d'*Cæstrus ovis* hébergent moins de parasites de l'espèce *Trichostrongylus colubriformis* et excrètent moins d'œufs dans les selles, ce qui est également caractérisé par des modifications de la réaction inflammatoire mucoale. La réaction inflammatoire est une réaction physiologique de défense de l'organisme en cas d'agression tissulaire, le but ultime étant de conduire le tissu blessé le plus rapidement possible vers la cicatrisation [75]. La dynamique de la réaction inflammatoire est contrôlée par la synthèse de nombreux médiateurs et par les cellules phagocytaires qui, par des mécanismes de synergie, parviennent à provoquer la plupart du temps un retour à l'équilibre [26]. L'organisme est alors en mesure d'éliminer les agents agresseurs ainsi que les tissus altérés et, à terme, de réparer les organes lésés et de se préparer à l'acquisition d'un état d'immunisation. Cette réponse inflammatoire apparaît donc comme une réaction favorable de l'organisme face à un agent exogène. Les parasites évoqués précédemment constituent une agression pour les muqueuses digestive et respiratoire. Des études ont déjà permis de mettre en évidence l'intervention de types cellulaires particuliers au cours de ces infestations tels que les granulocytes éosinophiles, les mastocytes et les globules leucocytes [29, 33, 90, 91, 93]. Afin de préciser les modalités de la réaction inflammatoire au cours de ces parasitoses ainsi que l'influence réciproque des différents acteurs mis en jeu, on a pu envisager l'étude de certains médiateurs de l'inflammation. Tout d'abord, le dosage des protéines totales, dont les concentrations sont affectées par de nombreux facteurs physiologiques et/ou pathologiques [67], permet d'obtenir un profil global de la cinétique mise en jeu. Par la suite, des dosages plus spécifiques de protéines de la phase aiguë de l'inflammation, telles

que la céruloplasmine et l' $\alpha$ -1-antitrypsine, sembleraient être pertinents notamment pour détecter des états inflammatoires chez les ovins [17, 46, 74, 99] mais également pour en définir les marqueurs lors de co-infestation parasitaire. Dans une première partie bibliographique, seront présentées les modalités de la réponse inflammatoire dans le cadre général d'une agression extérieure et lors d'infestations parasitaires spontanées ou provoquées. Dans une deuxième partie expérimentale, nous décrirons et analyserons les effets de co-infestations (par *Cestrus ovis* et par des nématodes) sur la réponse inflammatoire.



## Première partie

### *1<sup>ère</sup>* partie : Etude bibliographique



# Chapitre I

## La réaction inflammatoire systémique chez les ovins

### A Définition

La réaction inflammatoire (RI) est une réaction physiologique de défense de l'organisme en cas d'agression tissulaire [75]. Soit elle se limite à des manifestations cliniques locales, soit elle associe à ces dernières des signes cliniques systémiques.

Les manifestations locales sont caractérisées par une hausse de la température locale, des rougeurs, de l'œdème, de la douleur et par une série de processus cellulaires et biochimiques : afflux leucocytaire, plaquettaire et macrophagique, libération de dérivés de l'acide arachidonique (prostaglandines dont la PGE2, thromboxanes et leucotriènes), de platelet-activating factor (PAF), d'hémoglobine, d'amines vasodilatatrices telles que l'histamine, la sérotonine et les kinines, des enzymes protéolytiques et des ions superoxydes [52, 50].

La RI à l'échelle systémique se caractérise par de nombreuses modifications comme l'activation du complément et la cascade de la coagulation, un syndrome fébrile, une modification du métabolisme lipidique, une augmentation de la néoglucogénèse et du catabolisme protéique, des modifications hormonales, des variations des concentrations plasmatiques en oligo-éléments et en vitamines (calcium, zinc, fer, vitamine A,  $\alpha$ -tocophérol), une leucocytose et des variations des concentrations plasmatiques circulantes de certaines protéines de la phase aiguë (PPA) [55, 52].

Les réactions inflammatoires peuvent être divisées en deux types [26, 52] :

- non immunes qui se déroulent sans l'intervention des lymphocytes ;
- immunes (les plus nombreuses), qui impliquent la collaboration spécifique de ces cellules ; l'initiation de ces réactions immunitaires relève de quatre grands mécanismes : l'hypersensibilité immédiate ou de type 1 (HS1), l'hypersensibilité cytotoxique ou de type 2 (HS2), l'hypersensibilité liée aux complexes immuns ou de type 3 (HS3) et l'hypersensibilité retardée ou de type 4 (HS4) [82].

## B Dynamique de la réaction inflammatoire

### 1 Les différentes étapes de la réaction inflammatoire

#### 1.1 L'initiation

La reconnaissance de l'antigène peut se faire de manière spécifique (*cf. supra*) ou non spécifique, comme dans le cas de la RI indépendante de la nature de l'agent agresseur.

Dans le premier cas, la RI à médiation immunitaire fait intervenir sur le plan moléculaire l'activation de la voie classique du complément et sur le plan cellulaire, de façon indépendante, les plaquettes, les mastocytes et les lymphocytes T et B [26].

Dans le deuxième cas, sur le plan moléculaire, c'est l'activation du facteur XII de la coagulation sanguine ou facteur d'Hageman qui domine. Cette activation entraîne alors la cascade de la coagulation sanguine, initie la fibrinolyse par activation du plasminogène. Ceci provoque la libération de produits de dégradation de la fibrine (PDF) et déclenche la cascade des kinines, agents vasoactifs, chimiotactiques et responsables des premières sensations douloureuses. Enfin, on observe l'initiation du complément par la voie alterne provoquant la libération de nombreux facteurs à effets pro-inflammatoires. Sur le plan cellulaire, interviennent les mastocytes et les plaquettes sécrétant des amines biologiquement actives : l'histamine et la sérotonine [26].

L'histamine est issue de la décarboxylation de l'histidine par l'enzyme L-histidine décarboxylase. Elle est stockée dans les mastocytes et les granulocytes basophiles (GB) sous forme complexée à des mucopolysaccharides tels que l'héparine. L'histamine permet la contraction des muscles lisses, augmente la perméabilité vasculaire, a un effet chimiotactique sur les granulocytes éosinophiles et neutrophiles et bloque le fonctionnement des lymphocytes T [52].

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine est issue de la décarboxylation du 5-hydroxytryptophane. La majeure partie de la sérotonine est stockée dans le tractus gastro-intestinal et dans le système nerveux central, mais une grande partie provient des granules présents dans les plaquettes. Elle entraîne une vasodilatation capillaire, engendre les sensations douloureuses et stimule la croissance des fibroblastes et la formation de collagène [52].

#### 1.2 L'amplification

Elle peut s'expliquer par l'existence d'une synergie entre les différents médiateurs déjà formés, par l'afflux par chimiotactisme des cellules phagocytantes sur le foyer inflammatoire et par la libération de nouveaux médiateurs, ou lipides bioactifs, issus des phagocytes et des mastocytes [8].

Les phospholipases (notamment de type A2) présentes dans les plaquettes et les leucocytes sont activées au cours de la réaction inflammatoire, dégradant ainsi les phospholipides en acide arachidonique. Ce dernier est métabolisé par la voie de la lipo-oxygénase en leucotriènes et par la voie de la cyclo-oxygénase en prostaglandines (PG), dont les différentes isoméras

entraînent la formation de trois grandes classes de produits (les PG, les prostacyclines et les thromboxanes). Les leucotriènes C4, D4 et E4 sont responsables d'une augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi que des sensations douloureuses et le leucotriène B4, quant à lui, est fortement chimiotactique pour les GN [70]. Les thromboxanes sont vasoconstrictrices, tandis que les prostacyclines sont vasodilatatrices. La PGE2 augmente la perméabilité vasculaire, est pyrogénique et augmente la sensibilité à la douleur.

Enfin, les plaquettes produisent un groupe analogue aux phosphatidylcholines, appelé le platelet activating factor ou PAF. Ce dernier provoque l'agrégation plaquettaire, a un effet chimiotactique sur les phagocytes, stimule la libération d'enzymes lysosomales et la formation de produits oxygénés par les granulocytes éosinophiles (GE), les granulocytes neutrophiles (GN) et les macrophages et augmente l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales.

Sur le plan cellulaire, cette phase se caractérise par l'arrivée des GN par diapédèse au niveau du site inflammatoire. Cette migration se fait sous l'influence des facteurs chimiotactiques sus-cités ainsi que d'autres médiateurs tels que les chémokines et l'IL-8. Puis ont lieu la phagocytose et la dégranulation : les GN libèrent ainsi des enzymes comme des hydrolases acides (cathepsines), de la collagénase, de l'élastase et de la myéloperoxidase. La cellule meurt en libérant des enzymes lytiques et des métabolites à effet phlogogène. Il y a également intervention des macrophages et des GE, qui exercent leur action phagocytaire préférentiellement sur les complexes immuns et qui sont généralement abondants lors d'infestations parasitaires [26].

### 1.3 La stabilisation

Il existe toute une série de mécanismes régulateurs qui permettent de contrôler les déséquilibres nés de l'activation des différents systèmes de médiateurs. Le macrophage occupe une grande place dans ce mécanisme de contrôle par l'intermédiaire notamment de la sécrétion de cytokines, à savoir : le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6. Celles-ci permettent de stimuler les hépatocytes qui produiront ainsi les protéines de la phase aiguë (PPA) (cf. Figure 1) [44, 75]. Au cours de cette phase, il peut y avoir développement d'une réponse immune spécifique. Les cellules qui interviennent dans ce processus sont les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules présentatrices d'Ag (CPA).

De la bonne qualité des différents mécanismes sus-cités dépend la capacité de l'organisme agressé à éliminer l'agent inducteur de l'inflammation. Cette qualité est liée au bon équilibre entre facteurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires [75]. Il s'agit, par exemple, de certaines PPA, telles que l' $\alpha$ -1-antitrypsine ( $\alpha$ -1-AT), de l' $\alpha$ -2-macroglobuline ( $\alpha$ -2-M) ou de la protéine C réactive (CRP), qui inhibent efficacement les systèmes enzymatiques présidant à l'activation de nombreux médiateurs inflammatoires ou encore de la céruloplasmine (Cp), qui par son action anti-oxydante, est capable de s'opposer aux effets des radicaux oxydants libérés par les cellules phagocytantes activées [26].

## 1.4 La résolution

Cette phase conduit, dans la plupart des cas, à la guérison clinique du foyer inflammatoire [8, 26, 75]. Lors d'atteinte légère du foyer agressé, la terminaison de la RI se caractérise par un arrêt des phénomènes régulateurs mis en œuvre au cours de la stabilisation. Lorsque la RI a entraîné des pertes conséquentes de tissus, un processus un peu particulier se met en place : la cicatrisation. Cette modalité de résolution met en jeu plusieurs mécanismes tels que la néoangiogenèse et la synthèse de collagène et de glucosaminoglycanes par les fibroblastes [26]. Ces derniers phénomènes sont contrôlés par différentes cytokines telles que l'IL-1, le PDGF (platelet derived growth factor), le FGF (fibroblast growth factor), le TNF ou encore le TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ).

## 2 Synthèse et recrutement des médiateurs de la RI

### 2.1 Mobilisation des leucocytes

Suite à une agression, on observe une activation des macrophages, des cellules endothéliales, des fibroblastes et des granulocytes qui entraîne la libération de facteurs de stimulation de l'hématopoïèse (HGFs) [84] comme l'érythropoïétine, les colony stimulating factors (CSF) : G-CSF (G : granulocyte) ou GM-CSF (GM : granulocyte/monocyte), et certaines interleukines : IL-1, -3, -5 et -6. Ces facteurs n'entraînent pas directement la prolifération d'un type de cellules mais les stimulent en induisant l'expression de récepteurs membranaires à ces mêmes facteurs.

Des cytokines comme l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$  peuvent induire l'hématopoïèse indirectement en stimulant les cellules de la moëlle osseuse, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les lymphocytes T à produire des HGFs [84]. Ces glycoprotéines agissent sur la moëlle osseuse et entraînent la différenciation et la maturation accrue de cellules souches (granulocyte/monocyte-colony forming unit : GM-CFU) dont sont issues les différentes lignées de granulocytes et de monocytes-macrophages. Par exemple, en ce qui concerne les GN, ce sont l'IL-3 et le GM-CSF à forte concentration qui agissent ; pour les GB et les GE, on trouve l'IL-3, le GM-CSF, l'IL-5 et l'IL-4 [7] ; enfin pour les monocytes interviennent l'IL-3, le GM-CSF à faible concentration et le M-CSF.

Le passage des cellules ainsi formées dans la circulation sanguine se fait sous l'action de facteurs de libération (granulocyte releasing factor : GRF) spécifique de chaque lignée (NRF, ERF, BRF).

### 2.2 Synthèse des PPA

Le site majeur de synthèse des PPA est le foie. Dans une moindre mesure, le système immunitaire avec le système des monocytes / macrophages et les lymphocytes jouent également un rôle dans cette synthèse [67]. La production de ces protéines inflammatoires résulte de la stimulation des cellules productrices par des cytokines pro-inflammatoires, essentiellement

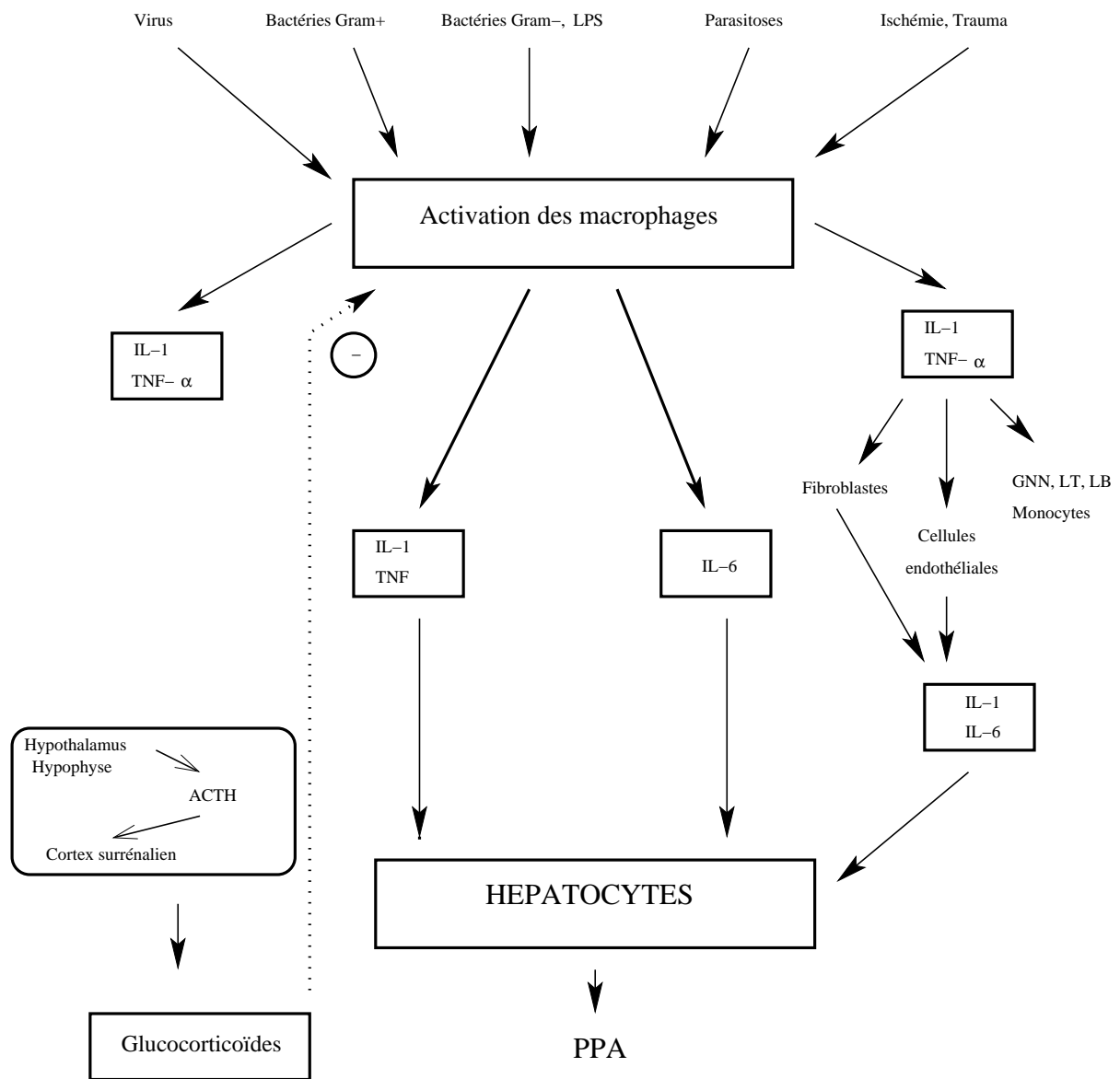


FIGURE 1 – Mécanisme général de l'induction de la synthèse des protéines de la phase aiguë (d'après [44, 55, 52]).

ACTH : adreno-corticotrophie hormone, IL : interleukine, LPS : lipopolysaccharide, PPA : protéine de la phase aiguë, TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$ .

l'IL-6. Ces dernières (IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ ) sont générées par les macrophages mais aussi par les monocytes [52] (cf. Figure 1).

Le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 stimulent les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales qui produisent l'IL-6, qui entraîne une stimulation des hépatocytes qui synthétisent alors les PPA [55].

Les cytokines pro-inflammatoires stimulent également l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien qui provoque la libération de glucocorticoïdes. Ces derniers ont un effet positif sur la synthèse hépatocytaire des PPA et stabilisent les monocytes en inhibant la libération des cytokines [55].

### 3 Modifications hormonales et métaboliques au cours de la réaction inflammatoire

#### 3.1 La fièvre

La fièvre est un syndrome caractérisé par de l'hyperthermie associée à des troubles de différents appareils. L'induction de l'hyperthermie est due à l'action centrale de substances pyrogéniques endogènes, telles que l'IL-1, l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$ , produites principalement par les monocytes et les GN stimulés au site du foyer inflammatoire [53]. Les lymphocytes T peuvent également être impliqués et ainsi libèrent des interférons comme l'INF- $\gamma$ . Ces cytokines ont une action sur les centres hypothalamiques thermorégulateurs ce qui provoque la libération de corticotrophin releasing factor (CRF). Ce dernier permet la sécrétion d'adreno-corticotrophic hormon (ACTH) par l'hypophyse qui provoque ainsi la libération de glucocorticoïdes par les surrénales [44, 75]. Ce phénomène implique une synthèse protéique locale ainsi que l'activation des voies de la lipo- et de la cyclo-oxygénase, donnant lieu à la participation de prostaglandines, dont la PGE2, responsable, par l'intermédiaire de l'AMP-c, de l'augmentation de la température corporelle.

#### 3.2 Stress et modifications hormonales

Le stress a deux conséquences sur le système nerveux : la libération de catécholamines (dopamine, adrénaline et noradrénaline) et l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire [75, 8].

**Conséquence de la libération des catécholamines :** L'adrénaline et la noradrénaline, sécrétées par les glandes surrénales, ont un effet vasoconstricteur s'opposant ainsi à l'action des médiateurs de l'inflammation. De plus les catécholamines ont un effet inhibiteur sur les fonctions des cellules inflammatoires telles que la dégranulation des basophiles, la phagocytose et l'activation lymphocytaire.

**Activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire :** Cela provoque, entre autres, une augmentation de la sécrétion de glucocorticoïdes. Ces derniers réduisent la formation d'anticorps,



l'immunité à médiation cellulaire, la production de lymphokines, la chimiotaxie et l'activité cytotoxique des cellules phagocytaires. Les glucocorticoïdes exercent également une activité anti-inflammatoire sur la réponse locale en inhibant l'activité histidine décarboxylase, en bloquant la biosynthèse des PG et des leucotriènes par l'inhibition de la phospholipase A2 et, enfin, en intervenant sur la production des kinines.

### 3.3 Modifications métaboliques

Le stress entraîne la libération d'adrénaline qui a un effet hyperglycémiant par augmentation de la glycogénolyse hépatique et musculaire et de la néoglucogenèse et par inhibition de la sécrétion d'insuline. Les glucocorticoïdes sont également hyperglycémiants par inhibition de la sécrétion d'insuline.

Au cours de la réaction inflammatoire, on peut noter une diminution de la sidérémie et de la zincémie associée à une élévation de la cuprémie. Le fer et le zinc étant indispensables à la prolifération microbienne, l'abaissement de leurs concentrations plasmatiques constitue un moyen biologique de défense de l'organisme contre les bactéries. Le cuivre semble un élément indispensable pour l'établissement d'une réponse immune de qualité et certaines études lui suggèrent un rôle anti-inflammatoire [75].

## C Les PPA

### 1 Définitions

Selon la société française de biologie clinique : "les protéines de l'inflammation sont des protéines plasmatiques dont le taux de production hépatique est supérieur au taux de catabolisme au cours de la réaction inflammatoire quelle que soit la cause de cette dernière". A l'exception de la protéine C réactive (CRP) et de la sérum amyloïd A (SAA) qui sont des holoprotéines, les autres PPA sont des glycoprotéines hydrosolubles [55] qui migrent en zone  $\alpha$  ou  $\beta$  lors de l'électrophorèse des protéines sériques [67]. Les concentrations des PPA peuvent subir quelques variations dans certains états physiologiques notamment lors de la croissance (sous l'influence de la growth hormon (GH)), de la gestation ou de la lactation [67, 75].

### 2 Classification des PPA

#### 2.1 En fonction des variations de leurs concentrations circulantes au cours de la RI

On distingue les PPA positives, dont les concentrations augmentent, des PPA négatives, dont les concentrations diminuent au cours de la réaction inflammatoire [55]. Dans la catégorie des PPA positives, on trouve : la sérum amyloïd A (SAA), l' $\alpha$ -1-glycoprotéine acide ( $\alpha$ -1-AGP) ou orosomucoïde, l' $\alpha$ -2-macroglobuline ( $\alpha$ -2-M), l'haptoglobine (Hp), l' $\alpha$ -1-antitrypsine ( $\alpha$ -1-AT) ou  $\alpha$ -1-protéase inhibitor, la céruloplasmine (Cp) et le fibrinogène (Fb). Parmi les PPA né-

gatives, on trouve entre autres : l'albumine, les pré-albumines et la transferrine. Chez l'homme, on distingue parmi les PPA positives [74, 75, 50] :

- des PPA dont la concentration augmente d'environ 50% : par exemple la Cp.
- des PPA dont la concentration augmente de deux à quatre fois : on trouve l' $\alpha$ -1-AGP, l' $\alpha$ -1-AT, l' $\alpha$ -1-antichymotrypsine, le Fb et l'Hp.
- des PPA dont la concentration augmente de plusieurs centaines de fois : on trouve la CRP et la SAA.

Chez les ovins, l'évolution des concentrations plasmatiques circulantes des PPA n'a pas encore été élucidée entièrement. Quelques études nous renseignent sur ces variations chez les ruminants [46, 45, 55] ; ainsi, on peut observer, lors d'une RI induite par une injection sous-cutanée de turpentine, une augmentation remarquable des concentrations en Hp (même si cette dernière peut être présente chez certaines espèces de façon non négligeable à l'état physiologique [119]), Cp, Fb,  $\alpha$ -1-AGP et  $\alpha$ -1-AT . Cette augmentation a été quantifiée chez les ruminants et est de l'ordre de 70 à 126% de la valeur initiale pour la céruloplasmine et de 35% pour l' $\alpha$ -1-AT [21]. Chez les moutons, les variations des concentrations en PPA peuvent être encore plus remarquables dans certaines conditions, comme par exemple lors d'infections respiratoires provoquées ou spontanées, et sont alors de l'ordre de 250% pour la Cp, de 400% pour le Fb et de 6000% pour l'Hp [98]. De plus, il est important de noter que les variations de concentrations en PPA ne sont pas toujours du même ordre et dépendent étroitement du type d'inflammation mise en jeu [46]. En effet, les expériences menées par Conner *et al.* [22], sur des bovins, illustrent bien ce propos. Le suivi cinétique de quatre PPA révèle que les concentrations en Hp,  $\alpha$ -AT et  $\alpha$ -1-AGP augmentent largement lors d'administration d'endotoxine ou lors d'infection pulmonaire à *Pasteurella haemolytica*, alors que les concentrations en Cp n'augmentent que lors d'administration d'endotoxine bactérienne. Enfin, lors d'infestations parasitaires à *Ostertagia ostertagi*, on observe une augmentation plasmatique des quatre PPA.

## 2.2 En fonction de leur rapidité d'apparition

On distingue plusieurs groupes :

**des PPA à cinétique d'évolution rapide [50, 74] :** on trouve la CRP et la SAA. Les concentrations de ces protéines atteignent un pic aisément détectable dès 6 heures après l'agression tissulaire, leur demi-vie biologique est brève de l'ordre de 8 à 12 heures, le retour au voisinage des valeurs normales est rapide (trois à quatre jours).

**des PPA à cinétique d'évolution moyenne [50, 74] :** on trouve l' $\alpha$ -1-antichymotrypsine dont le pic est détectable 10 heures après le début d'une réaction inflammatoire et dont la demi-vie biologique est de l'ordre de deux jours. Le retour aux valeurs normales se fait en six à huit jours.

**des PPA à cinétique d'évolution lente [50, 74] :** il s'agit de l' $\alpha$ -1-AGP, de l' $\alpha$ -1-AT, de l'Hp, de la Cp et du Fb dont le pic de concentration plasmatique est détectable assez tardivement

(trois à quatre jours après l'agression) et dont les demi-vies sont de trois à six jours. Le retour aux valeurs normales se réalise en 14 jours, environ, pour l'Hp, ce qui est relativement bref par rapport aux autres PPA citées précédemment qui tendent à avoir une décroissance beaucoup plus lente et pour lesquelles, on retrouve une concentration résiduelle plus de 20 jours après l'agression tissulaire [21, 98].

### 3 Structure des principales PPA du mouton

#### 3.1 Structure de l'Hp

Il s'agit d'une  $\alpha$ -2-globuline dont le point isoélectrique est de 5,7 chez le mouton (4,2 chez l'homme). Elle conserve son pouvoir de donner avec l'Hb un complexe doué d'activité oxydasique seulement dans une gamme de pH entre 4 et 7 ; hors de ces limites, elle se dénature [75]. L'Hp humaine est composée de deux chaînes polypeptidiques (a et b) reliées entre elles par des liaisons disulfures. Trois phénotypes sont décrits chez l'homme : Hp(1-1), Hp(2-1) et Hp(2-2). Ce polymorphisme est dû à la présence de deux allèles au niveau du locus Hpa : Hpa1 et Hpa2 codant respectivement pour les chaînes polypeptidiques a1 et a2. La chaîne b, quant à elle, est commune aux trois phénotypes. L'Hp(1-1) est un tétramère composé de deux dimères a1-b. L'Hp(2-2) est un polymère de a2-b [66, 89].

Enfin, l'Hp(2-1) consiste en une chaîne polymérique de dimères a2-b flanquée d'une unité a1-b de chaque côté. Des études récentes sur les artiodactyles ont montré qu'à l'exception de celle des suidés, leur Hp était polymérique (la résolution par électrophorèse en gel d'acrylamide a montré une dizaine de constituants identiques à l'Hp(2-2) humaine) et qu'ils possédaient un allèle de type a2. L'Hp de mouton semble être composée de deux sous-unités, une de 38 kDa (b) et l'autre de 16,5 kDa (a2) ce qui est comparable au poids moléculaire de l'Hp humaine [66]. Des analyses réalisées par Moretti et Donati [89] ont révélé la composition chimique de l'Hp de mouton : proportion en protéines : 72%, oses : 16% et acide sialique : 6,5%. De plus, une étude utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre l'Hp(2-2) humaine montre l'existence d'une homologie partielle entre les glycoprotéines humaine et ovine. Enfin, l'analyse électrophorétique montre que l'Hp de mouton migre en zone  $\alpha$ -2 comme celle de l'homme.

#### 3.2 Structure de la Cp de mouton

Les céruloplasmines des mammifères décrites montrent qu'il s'agit d'une glycoprotéine assez uniforme. On retrouve à peu près la même structure chez toutes les espèces, à savoir une simple chaîne d'acides aminés d'environ 130 kDa contenant des atomes de cuivre fortement liés, ce qui est caractéristique des Cu-oxydases. La quantité d'atomes de cuivre par protéine varie entre 5,5 et 7 pour la protéine humaine et est environ de 6 pour la protéine bovine [14, 75].

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide montre que la céruloplasmine ovine se comporte comme celle des bovins, c'est-à-dire qu'elle affiche une bande principale à 125 kDa et une bande mineure à 115 kDa. Aucun fragment de protéolyse n'a été découvert au cours de cette expérience, montrant ainsi que cette glycoprotéine ovine est moins sensible aux attaques protéolytiques que celle des bovins. La composition en acides aminés est différente de la Cp bovine et on remarque une nette augmentation des acides aminés soufrés (cystine et cystéine), une diminution des acides aminés basiques ainsi qu'une légère augmentation des acides aminés acides [14].

Enfin, l'analyse de la composition en Cu révèle une quantité de 5,3 atomes pour 125 kDa, ce qui est légèrement inférieur à ce qui a été trouvé chez les bovins et qui correspond à la plus faible valeur relevée chez l'homme [14].

### 3.3 Structure de l' $\alpha$ -1-AT de mouton

Des techniques d'électrophorèse réalisées par Sinha *et al.* [109] ont montré que l' $\alpha$ -1-AT de mouton avait un poids moléculaire de 62 kDa ce qui est supérieur à l' $\alpha$ -1-AT humaine (53 kDa) [95]. Il s'agit d'une simple chaîne polypeptidique stabilisée par trois chaînes polysaccharidiques [57]. Son extrémité COOH montre une forte homologie avec l'antithrombine-III et son extrémité N terminale avec l'antichymotrypsine [75]. De plus, l'analyse des 20 premiers résidus de cette extrémité N terminale a révélé 22 à 35% d'homologie entre l' $\alpha$ -1-AT humaine et ovine (48 à 52% d'homologie selon une étude menée par Mistry *et al.* [88]). La proportion d'hydrates de carbone chez le mouton est de 15% contre 9% chez l'homme et la souris.

### 3.4 Structure de la SAA de mouton

Le terme SAA regroupe un ensemble d'apolipoprotéines de poids moléculaires situés entre 14 et 17 kDa [97] et phyllogénétiquement bien conservées entre les différentes espèces [122]. Ces apolipoprotéines sont associées aux HDL mais aussi aux LDL, IDL et VLDL. Il existe un grand polymorphisme des apoSAA. Chez l'homme, il en existe six, alors que, chez la souris et le lapin, il n'en existe que deux. La différence entre chaque espèce réside dans la séquence, le nombre et dans la position des acides aminés. La SAA humaine possède 104 résidus alors que la SAA ovine en possède 112.

L'électrophorèse sur gel SDS polyacrylamide a permis de déterminer la structure de la SAA de mouton et ainsi de montrer de nombreuses similarités entre cette dernière, la SAA humaine et celle d'autres espèces animales, notamment en régions 32 à 54 qui correspondent à une boucle  $\beta$  et à une boucle servant à lier le calcium. Les positions 100 à 102 sont également bien conservées, correspondant à un site de phosphorylation pour la protéine kinase C, ce qui suggère un rôle régulateur pour cette holoprotéine.

## 4 Fonctions

### 4.1 Fonctions anti-protéasiques

La libération, à partir de cellules conjonctives et/ou de GN lésés, de diverses protéases au niveau du foyer inflammatoire conduit rapidement à la destruction du tissu conjonctif mais celle-ci sera circonscrite par les inhibitions plasmatiques des protéases. Cette inactivation enzymatique peut avoir lieu dans l'espace extra-vasculaire, au site même de l'inflammation mais aussi dans le plasma [26, 52, 75].

Parmi les différentes familles d'inhibiteurs des protéases connues chez les mammifères, trois ont un comportement de PPA : les inhibiteurs plasmatiques des sérine-protéases dont l' $\alpha$ -1-AT et l' $\alpha$ -1-antichymotrypsine, les inhibiteurs plasmatiques des cystéine-protéases dont le kininogène de faible poids moléculaire et l' $\alpha$ -2-M et les inhibiteurs plasmatiques des métallo-protéases dont la  $\beta$ -1-anticollagénase.

L' $\alpha$ -1-AT inactive les enzymes leucocytaires libérées au niveau du foyer inflammatoire. Elle inhibe essentiellement l'élastase des GN (surtout démontré chez l'Homme). Le complexe ainsi formé,  $\alpha$ -1-AT-élastase, est soit protéolysé par les macrophages locaux, soit transformé, après passage dans l'espace intra-vasculaire, en complexe  $\alpha$ -2-M-élastase sous l'action de l' $\alpha$ -2-M. Ces complexes stables de nature covalente sont endocytés par le système réticulo-endothélial voire par l'hépatocyte [25, 75, 125].

L' $\alpha$ -1-AT et l' $\alpha$ -2-M sont responsables de plus de 90% de la capacité totale d'inhibition trypsique [125].

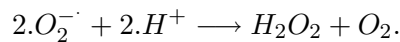
Des études menées par Sinha *et al.* [109] et Mistry *et al.* [88] ont révélé une controverse concernant la fonction de l' $\alpha$ -1-AT de mouton. Les premiers ont montré que l' $\alpha$ -1-AT de mouton avait plus un pouvoir d'inhibition de la trypsine, de la chymotrypsine et de la plasmine que l' $\alpha$ -1-AT humaine dont l'activité majeure réside dans l'inhibition de l'élastase libérée par les GN lors de phénomènes inflammatoires, cette activité pouvant alors être due chez le mouton à l' $\alpha$ -2-M. En revanche, les études de Mistry *et al.* ont montré que l' $\alpha$ -1-AT de mouton est capable d'inhiber l'élastase pancréatique de porc (PPE) et l'élastase granulocytaire humaine avec un ratio de 1:1. Cela peut être expliqué par le fait que Mistry *et al.* ont utilisé de la PPE car cette enzyme n'est inhibée que par l' $\alpha$ -1-AT et  $\alpha$ -2-M alors que l'équipe de Sinha *et al.* a utilisé de la trypsine bovine qui est susceptible d'être inhibée par d'autres inhibiteurs de protéases présents dans le plasma comme l' $\alpha$ -2-antiplasmine et l'antithrombine-III.

Dans les conditions physiologiques, l' $\alpha$ -1-AT et l' $\alpha$ -2-M régulent le renouvellement des protéines de la matrice extra-cellulaire, la fibrinolyse, la coagulation et l'activation en cascade du complément.

## 4.2 Fonctions épuratrices et anti-oxydantes des PPA

**L'haptoglobuline:** il s'agit d'une  $\alpha$ -2-glycoprotéine qui se combine à l'hémoglobine (Hb) et ses dérivés (cyanhémoglobine) issus de la lyse des hématies pour former un complexe très stable non covalent qui limite la formation de radicaux libres [46, 75] et qui rend le fer, présent dans l'hémoglobine, inaccessible aux bactéries, ce qui a un effet bactériostatique [75]. Ce complexe peut soit repasser dans le plasma où il est catabolisé au niveau du foie, soit être reconnu *in situ* par un récepteur macrophagique, endocyté et catabolisé [75].

**La céruloplasmine:** l'anion superoxyde  $O_2^-$  et ses dérivés  $OH^-$ ,  $HO_2$  et  $O^{2-}$  sont de puissants agents microbicides et cytolytiques sécrétés ou contenus dans les lysosomes des cellules phagocytaires, tandis que, dans leur cytoplasme, existe un inhibiteur enzymatique de l'anion superoxyde: il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD). Cependant, comme 90% des anions superoxydes diffusent vers l'extérieur de la cellule, il s'ensuit une destruction des bactéries non phagocytées mais aussi des phagocytes et des cellules du foyer inflammatoire. La céruloplasmine, véritable SOD extra-cellulaire, inhibe les ions superoxydes selon la réaction [75]:



Elle semble aussi être l'inhibiteur extracellulaire de l'oxydation des lipides plasmatiques. Enfin, elle est impliquée, dans les conditions physiologiques, dans le transport de 90% du cuivre dans les cellules pour la synthèse de cytochrome oxydase ainsi que dans certains intermédiaires du métabolisme du fer [46, 74, 112].

**La serum amyloid A:** il s'agit d'une apolipoprotéine présente en grande quantité et aux dépens des ApoA1 dans les HDL3 inflammatoires. Les macrophages au niveau du site de l'inflammation ont accumulé du cholestérol provenant des membranes de débris cellulaires. Un rôle de la SAA consisterait alors à évacuer le cholestérol macrophagique et à participer avec des HDL circulantes à une remodelisation de nouvelles HDL3. Les HDL3 inflammatoires seraient captées par le foie et le cholestérol accumulé au niveau du foyer inflammatoire serait ainsi catabolisé en acides biliaires puis éliminé [75, 97].

**La protéine C-réactive [75, 74, 97]:** elle fait partie des opsonines non spécifiques. Les particules fixées par la CRP ont deux origines: exogène (bactéries) et endogène (membrane de cellules nécrotiques ou lésées). La CRP se fixe aux germes qui vont être phagocytés par l'intermédiaire de certains motifs polysaccharidiques. La phagocytose des membranes cellulaires nécessite au préalable la désorganisation de la structure de la bicouche phospholipidique, ce qui permet d'accéder à des motifs phosphocholine ou galactose et en présence de calcium de former un complexe avec ces ligands. La CRP ainsi complexée se fixe alors à la fraction C1q du complément, en active la voie classique et la C3-convertase qui clive le C3 en C3a et C3b. L'ensemble CRP-ligand-C3b est alors reconnu par le macrophage activé et phagocyté.

### 4.3 Autres fonctions

#### a Fonctions de restauration tissulaire

**Le fibrinogène :** il est impliqué dans la coagulation plasmatique, il sert de substrat à la thrombine dans la formation de la fibrine. Il est synthétisé par les hépatocytes et stocké jusqu'à son utilisation [67, 75].

**L' $\alpha$ -1-glycoprotéine acide :** elle est impliquée dans la restauration du tissu conjonctif, désactive les phagocytes et diminue l'efficacité de la réponse immunitaire à médiation cellulaire [26].

#### b Fonctions des PPA négatives

**L'albumine :** c'est un transporteur pour les constituants apolaires du plasma, elle assure le maintien de la pression oncotique et intervient dans le processus de coagulation et de défense de l'organisme [67].

**La transferrine :** seule protéine de transport du fer dans le plasma, sa concentration augmente dans les états de déficience ou de carence en fer et lors de la gestation, alors qu'elle diminue lors d'affections hépatiques, d'inflammations aiguës ou chroniques.

## 5 Dosage des marqueurs de l'inflammation

### 5.1 Dosage non spécifique des protéines et globulines

#### a Méthodes chimiques : biuret, bleu de Coomassie, autres méthodes.

##### a.1 Méthode du biuret

La technique du biuret est basée sur la formation d'un complexe entre des ions cuivre  $Cu^{2+}$  et les liaisons peptidiques. Dans la réaction, du sulfate de cuivre est ajouté à une solution de protéines présentes dans un milieu fortement alcalin. Un complexe violet se forme, résultat de l'énolisation des fonctions peptidiques condensées avec les ions  $Cu^{2+}$  par des liaisons covalentes [83, 105]. Le nom de la réaction est dérivé de la molécule de biuret qui forme un complexe de couleur similaire avec les ions  $Cu^{2+}$ . L'intensité de la coloration obtenue dépend du nombre de liaisons peptidiques par gramme de protéines à analyser. Elle est pratiquement indépendante de la masse moléculaire des protéines. La coloration obtenue avec les protéines présente un maximum d'absorption à 545 nm. Le réactif du biuret lui-même présente un maximum d'absorption à 650 nm [67]. Il s'agit d'une méthode peu sensible, qui s'applique difficilement à des solutions diluées de protéines. Cependant, il a été démontré qu'elle présentait une bonne corrélation avec la réfractométrie [7]. Afin d'augmenter la sensibilité de cette méthode, il a été décrit une méthode du biuret "inversée", dans laquelle la coloration de la réaction est due à l'excès d'ions  $Cu^{2+}$  non complexés aux protéines [105].

### a.2 Méthodes colorimétriques

L'utilisation du colorant "bleu brillant de Coomassie" pour le dosage de la protéinémie a été mis au point par Bradford en 1976. Le principe repose sur la formation d'une liaison entre les protéines et le colorant, créant ainsi un complexe métachromatique [67, 105]. L'absorbance du complexe, mesurée au spectrophotomètre, varie proportionnellement à la concentration des protéines en solution. Le bleu brillant de Coomassie présente une absorbance maximale à 465 nm, cette dernière étant déplacée à 595 nm lors de la formation du complexe avec les protéines [83]. Dans un premier temps, le colorant est dissout en milieu acide (méthanol et acide phosphorique), puis rajouté directement aux échantillons. Enfin, l'étalonnage se réalise généralement avec de l'albumine bovine, car d'autres protéines produisent des colorations de plus faible intensité. Les principaux inconvénients de cette méthode résident dans le fait que le dosage dépend trop de la composition en protéines du milieu biologique et que le colorant utilisé est capable de s'adsorber aux parois des cuvettes de dosage ce qui rend son automatisation difficile. Il s'agit cependant d'une technique très utile, facile à mettre en œuvre, sensible et permettant un dosage semi-quantitatif des protéines [105]. Une autre méthode utilise le colorant "rouge de Pyrogallol", formant également un complexe avec les protéines dont le maximum d'absorption se situe à 600 nm [67].

### a.3 Autres méthodes chimiques

La méthode de Lowry [78], dont le nom vient du premier auteur à l'avoir décrite, et le dosage par l'acide bicinchoninique sont deux méthodes voisines, la seconde dérivant de la première. La méthode de Lowry est basée sur une amplification de la réaction du biuret, suivie par une réaction avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Ces méthodes sont peu spécifiques et de nombreux dérivés interfèrent, en particulier les réducteurs. Ces méthodes ne présentent d'intérêt que pour un travail semi-quantitatif appliqué à des protéines en solution diluée [83].

### b Méthode physique : la réfractométrie

L'indice de réfraction d'une solution de protéine est fonction de sa concentration en macromolécules. Pour un milieu biologique de forte concentration en protéines comme le sérum, l'indice de réfraction dépend essentiellement de la concentration en protéines [83]. La réfractométrie est une technique rapide et suffisamment précise et exacte qui constitue une alternative aux méthodes chimiques de dosage de la protéinémie en pratique vétérinaire [20, 67]. Après dépôt d'une goutte de sérum, la concentration en protéines est directement lue sur une échelle graduée en g/dL. Toutefois, il est important d'utiliser des échantillons clairs, transparents, non turbides et non hyper-lipémiques car les mesures dépendent de la transmission de la lumière à travers le réfractomètre. Un degré modéré d'hémolyse ou d'ictère semble peu interférer. Lors de concentrations importantes en électrolytes ou en molécules organiques (urée ou glucose par exemple), on peut remarquer une augmentation de la concentration en protéines totales déterminée par le réfractomètre. Au cours d'une série de mesures, il est important d'étalonner



régulièrement le réfractomètre avec de l'eau distillée. L'indice de réfraction d'une solution est aussi affecté par la température ambiante, mais les réfractomètres sont conçus pour compenser les variations de température dans un intervalle de 15 à 37°C. Enfin, à des concentrations inférieures à 35 g/L, le réfractomètre n'est pas suffisamment précis, et à des concentrations supérieures à 110 g/L, il vaut mieux effectuer une dilution pour obtenir un résultat exact.

### c L'électrophorèse

L'électrophorèse est une technique de référence en ce qui concerne la séparation des protéines sériques et constitue un examen de routine en biochimie clinique [67]. Le principe est basé sur la migration de particules chargées au sein d'un courant électrique, la direction de migration dépendant de la charge, positive ou négative, et de la taille de la protéine (sur certains substrats tels le gel d'agarose). Par exemple, en électrophorèse sur acétate de cellulose, l'albumine, qui est chargée très négativement, migre très rapidement vers l'anode, alors que les globulines migrent plus lentement car leurs charges négatives sont moindres. Certaines  $\gamma$ -globulines ne migrent quasiment pas et d'autres peuvent même migrer vers la cathode. Avec ce procédé, il est alors aisé de séparer les globulines en trois groupes :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , pouvant être subdivisés chacun en deux sous-groupes en moyenne. Les techniques d'électrophorèse ne diffèrent que par le type de substrat conducteur utilisé, les deux plus couramment utilisés étant l'électrophorèse sur acétate de cellulose et sur gel d'agarose. L'électrophorèse sur acétate de cellulose est réalisée avec une solution conductrice à pH=8,6 et avec un courant continu d'intensité 20 mA (100V) appliqué pendant 30 minutes à une heure. Les résultats peuvent être interprétés grâce à un densitomètre intégrateur, qui révèle un profil d'intégration sous forme de pics plus ou moins élevés en fonction de l'intensité de la coloration et de la largeur de la bande : ce profil est appelé électrophorétogramme. L'intégrateur permet d'obtenir le pourcentage relatif de chaque fraction et en multipliant ce pourcentage par la concentration en protéines totales, obtenue par une autre méthode, on obtient la concentration approximative de chacune des fractions. D'autres techniques d'électrophorèse peuvent être réalisées sur des substrats gélifiés d'origine glucidique tels que l'agarose (le plus employé), le polyacrylamide ou l'amidon. Ces gels associent à une séparation en fonction de la charge électrique, une séparation en fonction de la taille de molécules. Ce pouvoir séparateur dépend de la concentration en agarose qui détermine la réticulation du gel. L'électrophorèse sur gel d'agarose, également appelée électrophorèse à haute résolution, permet ainsi de séparer les sérums de moutons, par exemple, en neuf fractions différentes difficilement quantifiables séparément [67].

## 5.2 Dosages protéiniques spécifiques

### a Dosage de l'haptoglobuline

Le dosage est particulièrement utile chez les espèces ayant une faible concentration en Hp dans le plasma dans les conditions physiologiques, ce qui est le cas des ruminants [113]. Elle

constitue, chez le mouton, un bon indicateur diagnostique d'un phénomène inflammatoire. Le dosage de l'Hp permet également d'évaluer la sévérité d'une infection et par là-même, constitue un bon facteur pronostic, l'augmentation de sa concentration plasmatique circulante étant proportionnelle à la sévérité des lésions [9, 45, 99, 111]. Cet usage, en tant qu'indicateur pronostic d'une affection, est particulièrement utile lors de dystocies. De plus, son dosage semble être plus riche en information que la réalisation d'une analyse hématologique comprenant l'élaboration d'une numération cellulaire et d'une formule leucocytaire [98]. Enfin, chez les ovins, l'augmentation de la concentration en Hp serait particulièrement indicatrice d'une infection ou d'une inflammation aiguë, comme par exemple lors de métrites *post-partum* chez la brebis, son rôle dans les phénomènes plus chroniques restant encore à l'étude [111]. Complété par les dosages de la Cp et du Fb, il représente également un bon indicateur de perte de production, en termes de perte de poids et de diminution de l'appétit et de l'activité ruminale [55].

Ces différentes techniques de dosage chimique reposent sur le fait que l'activité peroxydasique de l'Hb ou de ses dérivés (methémoglobine ou cyanHb) est conservée en milieu acide par la formation du complexe Hp-Hb. La concentration en Hp de l'échantillon est proportionnelle à l'activité peroxydasique d'une solution d'Hb de concentration connue à laquelle on ajoute une quantité déterminée de sérum à analyser [61, 100, 110, 113, 119].

Il existe également d'autres techniques de dosage de l'haptoglobine plus élaborées, dont font partie l'électrophorèse capillaire, l'HPLC [113], la spectrophotométrie [126] et des méthodes immunohistochimiques comme l'immunodiffusion radiale et l'ELISA [113].

### b Dosage de la céruloplasmine

Le dosage de la céruloplasmine chez le mouton a un double intérêt [17] :

- appréciation de l'état nutritionnel par rapport au cuivre ;
- dépistage des animaux développant une réaction inflammatoire.

Si la Cp ne constitue pas un bon marqueur des inflammations aiguës chez l'homme [75], le contraire a été démontré chez les animaux de rente [98, 46, 99, 21].

**Méthode chimique :** la concentration en céruloplasmine est estimée par l'activité oxydative du sérum sur le N,N-diméthyl-p-phénylènediamine à un pH et une température où cette réaction est estimée maximale (37°C et pH=6,3 pour les moutons). Elle est exprimée en unité oxydasique par millilitre, une unité correspondant à la quantité de Cp qui provoque une augmentation de l'absorbance à 550 nm de 0,01 par minute [14, 17, 112].

### c Dosage de l' $\alpha$ -1-antitrypsine

A l'instar de la Cp, l' $\alpha$ -1-AT constitue un bon représentant des PPA impliquées lors de phénomènes inflammatoires [21].

**Méthode chimique :** ce dosage est basé sur la capacité de cette molécule à inactiver de façon dose-dépendante l'activité de la trypsine. Le sérum est mis en contact avec de la trypsine bovine, puis on mesure l'activité trypsique résiduelle. On utilise pour cela des substrats

synthétiques à base d'arginine et de lysine comme la benzoylargininenaphtylamide ou la benzoylarginineparanitroanilide (BAPNA) [28, 71, 72]. On détermine ainsi la capacité d'inhibition tryptique du sérum ou TIC (en mmol/min/mL) ou son pourcentage d'inhibition tryptique. La concentration plasmatique en  $\alpha$ -1-AT chez les ovins en conditions physiologiques est de 1,69 (+/-0,021) g/L [88].

#### d Dosage du fibrinogène

Sa concentration augmente indifféremment pendant les inflammations chroniques ou aiguës [75].

##### Méthodes chimiques [10]:

**méthode de Ratnoff et Menzie:** méthode fondée sur l'analyse quantitative du caillot de fibrine.

**méthode de Schalm et Millar:** méthode fondée sur la précipitation du Fb par un traitement thermique à 56°C par des sels ionorganiques concentrés, par la glycine.

**méthode colorimétrique:** fondée sur le temps de coagulation plasmatique en présence d'un excès de thrombine.

Les études des dix dernières années ont donc montrées que la mesure des concentrations plasmatiques des PPA pouvait fournir des informations utiles pour la détection, le pronostic et la surveillance de certains états inflammatoires et pouvaient rentrer dans le cadre d'analyses de routine en médecine vétérinaire [45]. Cependant, les différences inter-spécifiques des profils protéiniques impliquent que chaque espèce doit être considérée séparément. Il est souvent utile de combiner les dosages afin d'obtenir une évaluation précise de l'état morbide de l'animal et le choix de telle ou telle PPA est étroitement lié à leurs caractéristiques biologiques propres ainsi qu'à l'agent étiologique mis en jeu dans le processus inflammatoire. Ainsi, dans le cadre de multiples infestations parasitaires de moutons par *Ceestrus ovis* et/ou par des nématodes, et d'un suivi biochimique au long terme, les dosages de la Cp et de l' $\alpha$ -1-AT, PPA à cinétique d'évolution lente et durable [50], pourraient être pertinents et constituer des marqueurs fiables d'une telle RI. L'intérêt de ces dosages pourrait résider également dans le fait que les deux PPA sus-citées présentent une augmentation de concentration indépendante de la sévérité du phénomène inflammatoire [21], le seuil d'élévation semblant être fixé au préalable, contrairement à ce qui est observé avec l'Hp. Ainsi il devient plus aisé de mettre en évidence les phénomènes inflammatoires de faible intensité.



## Chapitre II

# La réaction inflammatoire au cours d'infestations parasitaires par des larves de diptères de l'espèce *O. ovis* et/ou par des nématodes : *H. contortus* et *T. circumcincta*

### A L'œstrose ovine : définition et manifestations cliniques

#### 1 Présentation

L'œstrose ovine est une myiase provoquée par le cheminement et l'accumulation dans les cavités nasales et les sinus frontaux du mouton de larves d'un diptère parasite obligatoire, *Cestrus ovis* (insecte, ordre des Diptères, brachycère, cyclorraphe, calyptère, famille des Cestridés), particulièrement fréquent dans les pays méditerranéens et tropicaux [90, 93]. Les chèvres et les mouflons sont aussi réceptifs à *Cestrus ovis*. L'œstrose humaine est également fréquente dans de nombreux pays et se caractérise par une myiase oculaire [30]. En France, les analyses de têtes de moutons à l'abattoir de Pamiers, en zone montagnaise, réalisées par Yilma *et al.* [132] ont montré que la prévalence d'*Cestrus ovis* était en moyenne de 65%, avec, par exemple, des valeurs de 71,88% en février et 85,71% en octobre. Les mêmes analyses réalisées à l'abattoir de Pézenas [31], situé en zone méditerranéenne et donc à une altitude moins élevée, donnent une prévalence de 43,4% avec une variation mensuelle allant de 14,3% en février à 65% en octobre. Ces derniers résultats montrent que dans des conditions de température plus clémentes, l'achèvement des mues débute plus tôt et la rentrée des L1 dans un état d'hypobiose est beaucoup plus tardive. Sous certaines latitudes, où l'atmosphère est plus chaude, comme à Tunis par exemple, on observe un cycle continu et les L3 sont présentes tout au long de l'année. Les

prévalences sus-citées sont quasiment identiques à celles obtenues au Maroc (62,2%) mais largement inférieures aux données collectées au Sénégal (95%). L'œstrose ovine étant largement sous-estimée dans nos régions, ces résultats soulignent la forte prévalence de ce parasite dans le sud de la France. De plus, il faut noter que la prévalence du parasite chez la chèvre reste inférieure à celle observée chez le mouton [132].

## 2 Cycles externe et interne du parasite *Æstrus ovis*

### 2.1 Adultes et pupes

Les pupes sont issues de la transformation des larves de troisième âge, expulsées hors des cavités nasales du mouton lors d'un éternuement. Les pupes se transforment en adultes sous certaines conditions de température [90] : température minimale pour le développement de femelles de 11,5°C, température minimale pour le développement de mâles de 12,1°C (cf. Figure 2).

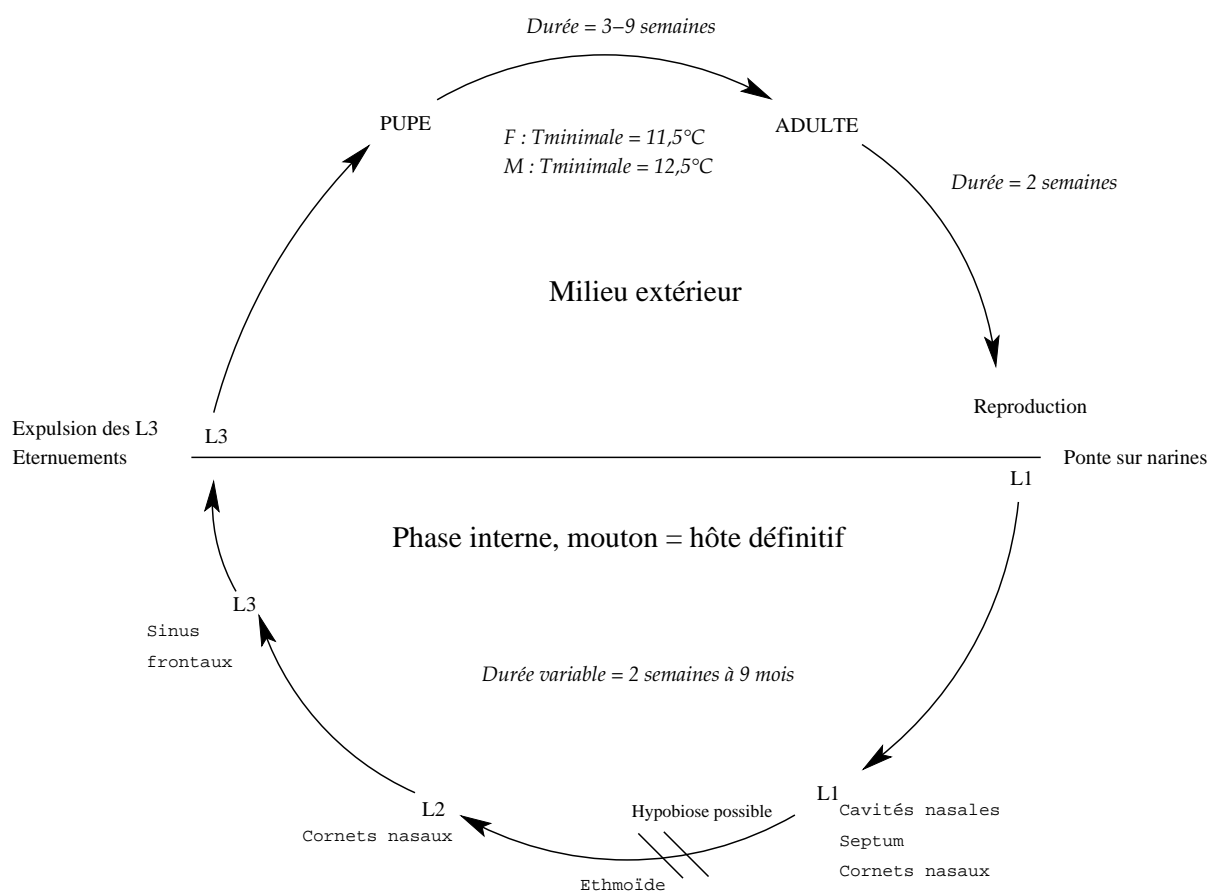
La durée de l'état de puce est variable mais on considère qu'il dure en moyenne de trois à neuf semaines [69]. En effet, l'augmentation de cette période constitue une voie efficace pour éviter l'émergence d'adultes pendant une mauvaise période climatique ; ce phénomène peut être considéré comme une période d'hypobiose externe [34, 124].

Après éclosion, si la température se situe entre 20 et 30°C, les mâles et les femelles se nichent dans les interstices des murs. Les adultes, n'ayant pas de pièces buccales, ne se nourrissent pas au cours de leur vie (qui dure environ 15 jours) et vivent sur leurs réserves accumulées à l'état larvaire [69, 124]. Ces dernières servent à la métamorphose, à l'éclosion, à la recherche des meilleurs sites de mues, au développement des larves dans l'utérus des femelles et à la ponte. Chez les moutons ayant été infestés, on compte en moyenne de 4 à 15 larves à l'autopsie [69].

### 2.2 Les larves de premier âge (L1) et de deuxième âge (L2)

Les L1 mesurent de 1 à 2 mm, sont translucides et possèdent des crochets buccaux et de nombreuses épines qui leur permettent de se déplacer en s'accrochant à la muqueuse pituitaire. Elles progressent ainsi au sein des cavités nasales, notamment jusqu'au niveau des cornets nasaux moyens, qui constituent leur site privilégié de développement [132].

En fonction du climat, le développement larvaire peut être arrêté, soit pendant la période froide, soit pendant la période chaude et sèche. Pendant cette période d'hypobiose, de nombreuses larves sont détruites et cette diminution du nombre de parasites est essentiellement due au développement d'une réponse immunitaire. Néanmoins, la population de L1 est le régulateur et l'assurance de la persistance de la population parasitaire. Dans certaines régions comme en Sicile, les périodes d'hypobiose sont absentes laissant place à des périodes où le développement est ralenti [15]. Il est admis que si on trouve un grand nombre de L3 dans

FIGURE 2 – Cycle parasitaire d'*Œstrus ovis* (d'après [69, 132, 34, 90])

F : femelle, L1 : larve de premier âge, L2 : larve de 2<sup>ème</sup> âge, L3 : larve de 3<sup>ème</sup> âge, M : mâle.

les cavités nasales, il y aura de nombreuses L1 remplacées par des adultes deux mois plus tard [124].

La transformation des L1 en L2 a lieu au niveau de l'éthmoïde. Les larves de deuxième âge (L2) mesurent 6 mm, sont blanches jaunâtres et possèdent moins de crochets et d'épines que les L1 car elles vivent dans les sinus. Elles se développent rapidement et induisent une forte réaction cellulaire de la part de l'hôte. Leur développement est fonction du développement des L3 et de leur élimination ultérieure vers le milieu extérieur [33] (cf. Figure 2).

### 2.3 Les larves de troisième âge (L3)

Elles mesurent 2 à 3 cm de longueur, sur 7 à 10 mm de largeur et brunissent par bandes transversales en vieillissant.

Elles accumulent des réserves pour la transformation en puppe, en absorbant les exsudats présents dans les cavités naso-sinusales ; les autres stades larvaires se nourrissent également de ces mêmes exsudats. Leurs localisations privilégiées sont les sinus frontaux. Dans une moindre

mesure, on en retrouve dans les cavités nasales et au niveau du septum mais, à ce stade, ce sont des larves matures, prêtes à être expulsées dans le milieu extérieur afin d'y achever leur développement [132] (cf. Figure 2).

Les levées des diapauses des L1 se faisant de façon asynchrone, peu de L3 se développent simultanément. La raison est probablement spatiale : le développement d'un trop grand nombre de larves au même moment serait fatal pour l'hôte [124]. Le faible développement des L3 inhibe le développement des larves des deux stades précédents [34, 124]. Pour cette raison, le profil des populations parasites est constitué de beaucoup de L1 (40 à 70%), peu de L2 (10 à 40%) et encore moins de L3 (10 à 30%). Sur une enquête menée dans la région de Pézenas par Dorchies *et al.* [31], sur une moyenne de 10,86 larves par individu, on retrouve 9,24 L1, 0,91 L2 et 0,71 L3, ce qui correspond respectivement à 85,1, 8,4 et 6,5%. Quand le pourcentage de L3 augmente, les L3 matures doivent être expulsées et ne peuvent pas rester dans les cavités nasales à cause de leur taille et de l'intense réaction locale d'hypersensibilité (cf. Figure 2).

## 2.4 Durée du cycle

Elle est fonction de la saison et du pays et varie de deux semaines en été à quelques mois pendant les saisons froides (jusqu'à neuf mois) [124, 69], les développements larvaires semblant être inhibés au cours des saisons très froides ou très chaudes [33]. Dans les conditions optimales, c'est-à-dire dans des régions où l'hiver est doux, la durée du cycle est de quatre semaines, des stades larvaires L1 à L3, les L1 n'ayant aucune contrainte extérieure induisant l'hypobiose.

## 3 Manifestations cliniques

### 3.1 De la mouche adulte à la ponte

Après l'émergence des adultes, les femelles gravides vivipares se mettent à la recherche de moutons ou de chèvres afin de pouvoir pondre les larves de premier âge. L'activité de harcèlement des mouches affecte le comportement des animaux et les éleveurs remarquent que leurs moutons deviennent nerveux, se rassemblent, inclinent la tête vers le sol ou la cachent dans la toison de leurs congénères. A l'inverse, pendant la période de repos des mouches, c'est-à-dire à l'aube ou au crépuscule, les moutons se répartissent uniformément sur le pâturage [90].

### 3.2 La rhinite estivale

La rhinite avec du jetage et des éternuements répétés n'apparaît que quelques semaines après les premières pontes. Un jetage d'abord séreux puis séro-muqueux, muco-purulent ou purulent peut être constaté. Celui-ci ne dépend pas de l'intensité de la ponte mais de la réaction individuelle et des surinfections bactériennes concomitantes.



La poussière se colle souvent aux commissures nasales avec le mucus et le pus ainsi que des brins d'herbe et des débris divers. Parfois, ceci peut résulter en l'obstruction complète des narines, obligeant les animaux à respirer par la bouche, ce qui interfère fortement avec les phénomènes de rumination.

Parfois, si l'infestation est très forte, des troubles nerveux peuvent apparaître. Il s'agit d'incoordination motrice, de perte d'équilibre, de nystagmus ou d'amaurose. En fin de saison estivale, les symptômes s'atténuent ou disparaissent quand les conditions climatiques ne permettent plus la survie des mouches adultes [90].

### 3.3 La sinusite hivernale

Durant l'automne et le début de l'hiver, l'œstrose est généralement silencieuse. Seuls un jetage assez discret et de rares éternuements sont observés. Au moment où les larves reprennent leur développement (janvier-février dans le sud de la France) et vont se transformer en L2 puis en L3 dans les sinus, le jetage redevient abondant, de nature muco-purulente ou purulente [90].

Les éternuements sont moins fréquents que pendant l'été. Ils surviennent cependant, parfois, en une longue série de quelques minutes, épuisante pour le mouton, qui à la fin peut rejeter une larve L3. Un bruit de cornage est parfois perçu en relation avec la présence de nombreuses larves dans les sinus et les cavités nasales ainsi qu'avec l'œdème des muqueuses. Souvent les animaux ont un port de tête anormal ; les troubles locomoteurs ou nerveux ("faux tournis") ne sont pas rares [90].

En fin d'hiver et au début du printemps, les symptômes s'atténuent et tout semble rentrer dans l'ordre, en particulier quand toutes les larves L3 ont été rejetées et que les moutons quittent les bergeries où l'atmosphère ammoniacale aggrave l'irritation de la muqueuse pituitaire.

### 3.4 Symptômes et lésions pulmonaires

Dans certains cas, des complications de pasteurellose, de pleuropneumonie, notamment chez la chèvre, ou de broncho-pneumonie infectieuse sont possibles : l'affection s'accompagne alors de fièvre et la toux remplace les éternuements [33, 34].

Les abcès pulmonaires sont également fréquents. Ils semblent être dus à la présence d'un foyer pyogène naso-sinusal. Dans certains cas, on observe une lésion principale de pneumonie interstitielle avec présence d'emphysème, d'atélectasie et d'adhérences pleurales. Les phénomènes de pneumonie interstitielle sont sûrement dus à une stimulation antigénique permanente, l'aspiration d'antigènes pouvant sensibiliser les poumons. Des études récentes suggèrent que les mastocytes pourraient induire une fibrose pulmonaire et que la sérotonine stimulerait le facteur de croissance des fibroblastes *in vitro* et *in vivo* [34].

## 4 Pathogénie de l'œstrose ovine

Les nombreuses épines et crochets acérés que portent les larves et leurs mouvements sur la muqueuse pituitaire sont souvent considérés comme responsables des troubles observés.

Le suivi de troupeaux infestés et l'autopsie de nombreuses têtes de moutons ont permis de suspecter la participation d'un phénomène d'hypersensibilité (HS) dans le développement des manifestations pathologiques. Les principaux indices retenus sont le retard d'apparition des symptômes au printemps ainsi que l'absence de relation entre l'intensité des lésions et le nombre de larves présentes [90].

La comparaison avec d'autres agents de myiase (*Lucilia cuprina*) a permis de soutenir l'hypothèse de l'intervention de ce phénomène d'HS dans l'œstrose.

### 4.1 Actions mécanique et traumatique

La plupart des lésions sont localisées dans la muqueuse de l'ethmoïde et dans les sinus. Après une infestation naturelle ou expérimentale, on observe une hyperplasie et une métaplasie des cellules épithéliales et l'escalator mucociliaire est abrasé [34, 41].

De plus, l'expression tissulaire de l'épitope Ki 67 dans le compartiment épithélial de la muqueuse nasale du mouton [92] montre que l'intensité de la prolifération cellulaire est plus marquée chez les animaux infestés par rapport aux animaux indemnes : les résultats sont doublés.

L'observation des muqueuses au microscope électronique à transmission a permis de déterminer la nature des lésions induites par les larves de deuxième âge (L2) et les larves de troisième âge (L3), les lésions les plus sévères étant localisées au niveau des sinus [34]. Ces modifications sont le résultat d'une combinaison entre l'action mécanique et la sécrétion de protéases par les larves. Cependant, le dépôt à l'entrée des narines d'agneaux indemnes de 50 larves de premier âge (L1) en une seule administration n'a aucune conséquence clinique et 25 à 30% de ces L1 survivent [90], ce qui suggère que les rôles mécanique et traumatique des œstres ne semblent pas être primordiaux.

### 4.2 Rôle allergisant et développement des phénomènes d'hypersensibilité

L'œdème et la congestion intense de la pituitaire, l'absence de parasite chez certains sujets en pleine période de ponte des mouches, associés à des lésions caractéristiques, font envisager la participation d'une composante allergique de l'inflammation [90].

Ces mécanismes d'hypersensibilité de type 1 ou immédiate ont déjà été montrés pour d'autres myiases comme celle à *Lucilia cuprina* [79]. En ce qui concerne l'œstrose ovine, Jagannah *et al.* [59] ont décrit la présence de GE dans les muqueuses respiratoires supérieures des moutons infestés par *Cestrus ovis*.

De plus, le recrutement des cellules inflammatoires (GE, mastocytes et globules leucocytes (= mastocytes dégranulés)) dans la muqueuse pituitaire a été mis en évidence lors d'infestations expérimentales ou naturelles par *Æstrus ovis* [29].

### 4.3 Rôle immunomodulateur

Certains travaux ont exploré l'action des extraits de L1 ou L2 sur la production de monoxyde d'azote ( $NO\cdot$ ) par les macrophages [43]. Les ions nitreux sont impliqués dans les mécanismes de défense de l'hôte contre *Æstrus ovis* mais également contre d'autres parasites tels que *Leishmania tropica*, ce mécanisme de défense s'accompagnant d'effets délétères à l'encontre des tissus. Il est alors apparu que les extraits de L1 diminuaient d'une manière significative la sécrétion de  $NO\cdot$  alors que l'extrait de L2 l'augmentait. La diminution de la production de  $NO\cdot$  par les extraits de larves L1 pourrait s'expliquer par la capacité du parasite à créer des conditions environnementales idéales nécessaires aux longues semaines d'hypobiose. Une hypothèse pourrait expliquer la raison pour laquelle les extraits de larves L2 stimulent cette sécrétion. Les L2 échapperaient à la RI de l'hôte en inhibant les phénomènes d'HS, la production de cytokines de type TH1 par les macrophages, inhibant la réponse de type TH2, cette dernière induisant, par l'intermédiaire de l'IL-4, une éosinophilie sanguine et locale. Les produits d'excrétion-sécrétion larvaires sont donc responsables de l'orientation de la réponse immunitaire de l'hôte. Enfin, les antigènes parasitaires sont localement responsables d'une immunomodulation qui se traduit par une diminution de la mitogenèse des lymphocytes chez l'agneau infesté expérimentalement [92].

## B Présentation de l'infestation par *T. circumcincta* et *H. contortus* chez les moutons

L'infestation par *T. circumcincta* est la plus importante des parasitoses du mouton dans les zones tempérées du nord de l'Europe [120], restant cependant assez bien tolérée par son hôte. L'hæmonchose, quant à elle, est également très répandue et peut être à l'origine d'importantes pertes économiques.

### 1 Classification

*Teladorsagia circumcincta* et *Hæmonchus contortus* sont des nématodes, parasites de la caillette des petits ruminants, appartenant à la :

- super-famille des Trichostrongyloidea,
- famille des Trichostrongylidés,
- sous-famille des Trichostrongylinés,
- au genre *Teladorsagia* pour le premier et *Hæmonchus* pour le second.

## 2 Morphologie

La famille des Trichostrongylidés est caractérisée par des vers possédant une capsule buccale réduite à absente, à l'inverse leur bourse copulatrice est très développée. De plus, les mâles représentants de la sous-famille des Trichostrongylinés possèdent des spicules courts et épais [68].

### 2.1 *Teladorsagia circumcincta*

Il s'agit de vers ronds d'environ 12 mm de longueur, sur 160  $\mu\text{m}$  de largeur, légèrement bruns [68]. Ils possèdent des papilles cervicales ainsi qu'une ébauche de capsule buccale. La bourse caudale du mâle est formée de deux grands lobes latéraux réunis par un petit lobe dorso-médian et précédée de deux papilles pré-bursales soutenant deux petites ailes latérales. Les mâles possèdent des spicules courts à extrémité trifurquée et les femelles, une languette supra-ovalvulaire.

### 2.2 *Hæmonchus contortus*

Il s'agit également de vers ronds plus gros que les précédents, de 35 mm de longueur sur 400  $\mu\text{m}$  de largeur ; leur couleur est donnée par leur tube digestif rouge, autour duquel s'enroulent des cordons génitaux blancs. Ces nématodes possèdent une cavité buccale courte avec une petite dent [68]. Les femelles possèdent une languette supra-ovalvulaire et des papilles cervicales proéminentes. Quant aux mâles, leur bourse caudale est constituée de deux grands lobes latéraux et d'un petit lobe dorsal supporté par une côte en Y [68].

## 3 Biologie

### 3.1 Localisation et régime alimentaire

Les stades larvaires des genres *Hæmonchus* et *Ostertagia* se retrouvent dans l'épithélium de la muqueuse gastrique, au niveau des glandes à mucus, alors que les adultes sont présents dans la lumière gastrique, intimement collés à la muqueuse et baignent dans les sécrétions [85]. De plus, il semblerait que les stades adultes de *T. circumcincta* vivent à la surface de l'abomasum, zone privilégiée dans laquelle le pH est le plus proche de la neutralité [108]. Ce sont des nématodes hématophages. Ce caractère est surtout marqué pour le genre *Hæmonchus* et ce parasite est responsable dans certains cas d'anémie sévère surtout chez les agneaux ainsi que d'hémorragies digestives, entraînant des taux de morbidité et de mortalité assez élevés.

### 3.2 Phase externe du cycle évolutif

Le cycle évolutif des strongles digestifs est présenté sur la figure 3. Les L1 sortent de l'œuf, se nourrissent immédiatement et se développent. Il y a accumulation rapide de granules

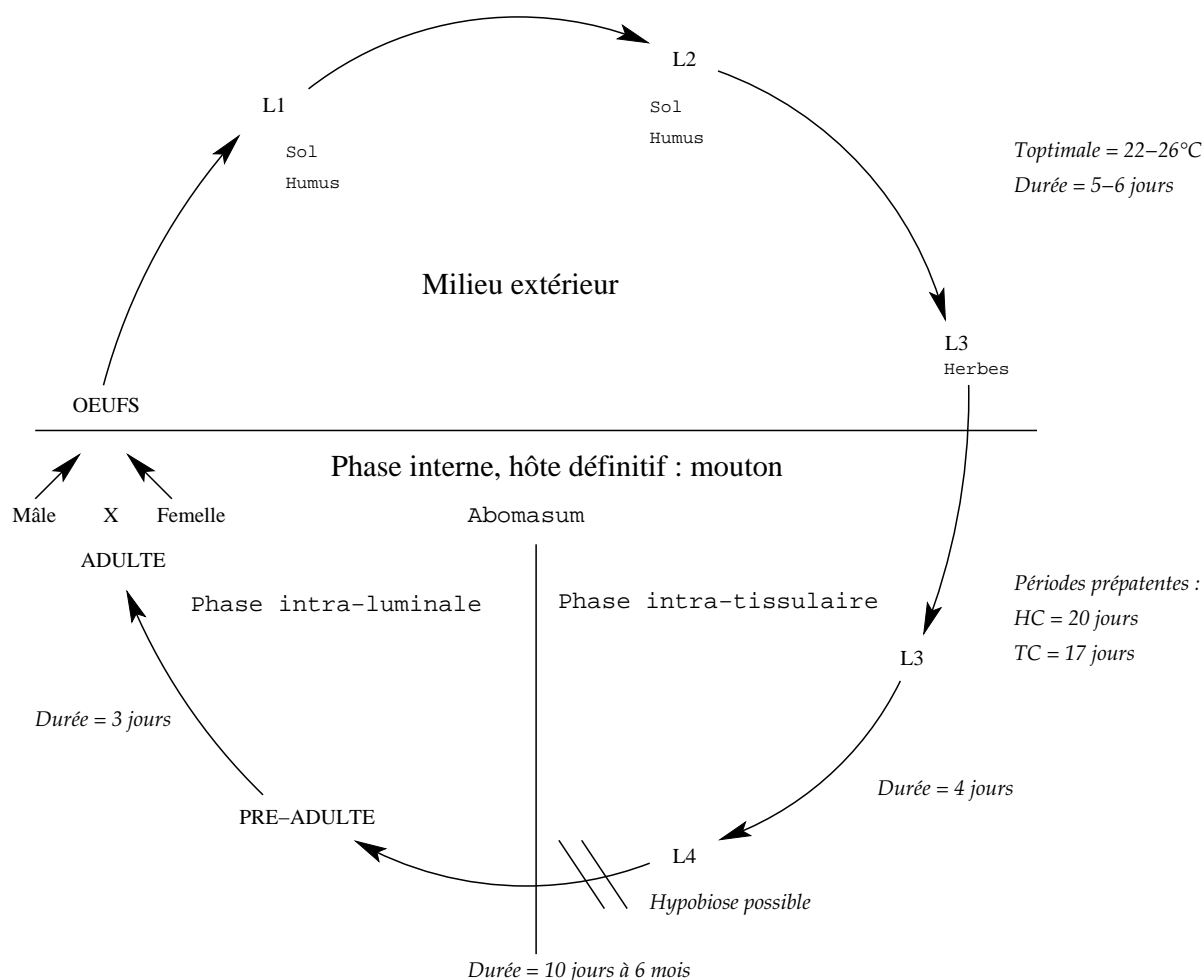


FIGURE 3 – Cycle parasitaire d'*Hæmonchus contortus* et de *Teladorsagia circumcincta* (d'après [68])  
 HC : *Hæmonchus contortus*, L1 : larve de premier âge, L2 : larve de 2<sup>ème</sup> âge, L3 : larve de 3<sup>ème</sup> âge, L4 : larve de 4<sup>ème</sup> âge, TC : *Teladorsagia circumcincta*.

alimentaires dans les cellules intestinales. Elles se nourrissent, par des mouvements de succion, de bactéries, de champignons et de végétaux. Les L1 sont dites rhabditoïdes, c'est-à-dire qu'elles possèdent à la base de leur œsophage une large valvule tricuspide semblable à celle des nématodes de la famille des Rhabditidés. La première mue conduit à la formation de L2, qui sont très actives et peuvent se nourrir. Leur croissance est très rapide. Les L3 se trouvent à l'intérieur de la cuticule des L2, elles sont dites strongyloïdes, c'est-à-dire que leur œsophage n'est pas muni d'une valvule, contrairement aux L1. Elles ne se nourrissent pas et survivent donc sur les réserves accumulées précédemment. Elles sont douées d'un phototropisme négatif, d'un hygrotropisme positif et d'un géotropisme négatif. Toutes ces mues ont lieu en quatre à cinq jours dans les conditions optimales d'humidité, de température (entre 22 et 26°C) et d'oxygénation [68] (cf. Figure 3).

### 3.3 Phase interne du cycle évolutif

- Lors de primo-infestation [118] : les L3 sont ingérées par leur hôte et leur libération hors de la gaine des L2 est en relation avec la modification de l'environnement au niveau du tube digestif et en particulier : la baisse du pH local, l'augmentation de la température et la réceptivité de l'hôte au parasite. Les L3 pénètrent alors dans la paroi du tube digestif au niveau de l'épithélium. La mue en L4 a lieu vers le quatrième jour. Puis la quatrième mue commence environ une semaine après l'infestation : au dixième jour, il y a émergence des jeunes adultes qui restent dans la paroi. Après une croissance rapide, accouplement et reproduction, la ponte débute 17 jours après l'infestation pour *Teladorsagia circumcincta* et 20 jours après pour *Hæmonchus contortus* (cf. Figure 3).
- Lors de ré-infestation [117] : après sensibilisation par des antigènes du fluide de désenkystement et par ceux libérés au cours des migrations et des mues dans la paroi de l'estomac, des phénomènes immunitaires se développent et vont modifier le déroulement et la durée des diverses phases. On observe une régulation progressive des populations avec un véritable renouvellement en ce qui concerne *Teladorsagia circumcincta* et pour *Hæmonchus contortus*, l'infestation expérimentale continue à démontrer qu'après une première période d'accumulation de vers pendant les six à neuf premières semaines d'infestation, un pic de population est atteint. Il y a ensuite disparition des parasites et quel que soit le nombre de larves absorbées quotidiennement, le nombre total de vers reste faible. Il a également été démontré que parmi la population de larves infestantes ingérées, seule une faible proportion arrive à pénétrer dans les glandes à mucus de l'abomasum immunisé [85]. Dans le cas d'infestations d'agneaux par *T. circumcincta*, le contrôle s'effectue au niveau de la fécondité et de la longueur des vers femelles et non au niveau du nombre total de vers [120].

On assistera donc, soit à une élimination des parasites, précoce par destruction, ou tardive et brutale par auto-guérison, soit à une inhibition du développement des larves de réinfestation, soit à une diminution de la ponte. L'arrivée des larves dans leur environnement est alors régulée par [86] :

- leur motilité propre,
- la présence et la densité des populations de parasites déjà existantes,
- la mobilité de l'environnement de l'hôte,
- et la présence de signaux anatomiques ou biochimiques locaux tels que le mucus ou le glycocalyx ; en effet, ces deux entités, riches en glycoprotéines et en glycolipides, peuvent constituer un signal approprié pour l'établissement des larves de nématodes [85].

Tous ces événements ont pour conséquence une régulation des populations parasitaires.

## C Modalités de la RI lors d'infestations parasitaires chez le mouton

### 1 Importance de l'immunité naturelle

Par immunité naturelle, l'organisme rejette et refuse tout agent étranger avec lequel il n'a aucune possibilité d'association ou de synergie. Le parasite non reconnu induirait une phase aiguë non spécifique, brutale, éphémère et sans conséquences extensives, avec la participation de cytokines comme l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-12 (IL-12) et de TNF- $\alpha$  qui stimulent les fonctions biocides non spécifiques des macrophages et d'autres cellules. La multiplication des LT helper (LTh) et des cellules natural killer (NK) est aussi augmentée. Le complément, principal effecteur de l'immunité naturelle, est activé et ses complexes enzymatiques détruisent les protéines étrangères. Au bilan, l'organisme est alerté et réagit vite et brutalement mais sans conséquences pathogènes décelables pour l'hôte sauf au niveau cellulaire où certaines populations réactionnelles peuvent être modifiées. L'originalité de l'immunité naturelle est la possibilité de distinguer les substances ou agents pathogènes qui nécessitent une réponse spécifique de ceux qui sont des intrus immédiatement rejetés [85].

### 2 Mise en place et rôles de la RI et de l'immunité acquise face à des infestations par *T. circumcincta*, *H. contortus* et des larves d'*O. ovis*

#### 2.1 Mécanismes de sensibilisation de l'hôte

##### a Rôle des antigènes parasitaires

On distingue deux types d'antigènes parasitaires : les produits d'excrétion / sécrétion et les antigènes somatiques présents sur ou dans le parasite. Ces molécules sont certes impliquées dans l'établissement et le maintien des parasites gastro-intestinaux ou de l'appareil respiratoire, mais elles interviennent aussi dans la mise en place d'une immunité protectrice de l'hôte.

Dans le cas d'*H. contortus*, des produits d'excrétion / sécrétion, issus de leur œsophage, semblent être reconnus par le système immunitaire du mouton infesté [124]. De plus, la sécrétion de multiples protéases par des larves et des adultes d'*H. contortus* serait responsable de l'inhibition d'anticorps protecteurs synthétisés par l'hôte [86].

En ce qui concerne les larves d'*O. ovis*, des analyses par *Western blots* démontrent que les produits d'excrétion / sécrétion constituent les Ag les plus immunogènes et sont caractérisés par des protéines issues du tube digestif et des glandes salivaires [58, 124], la plus immunogène étant un complexe de protéines de 28 kDa issu de ces dernières. Les stades larvaires L2 et L3 sécrètent plus de produits d'excrétion / sécrétion que les stades L1, ce qui est à mettre en relation avec l'augmentation de taille des organes sécrétoires. De plus, les mues pourraient jouer un rôle important dans l'exposition antigénique, en augmentant la libération de ces produits [124]. Des Ag cuticulaires ont également été mis en évidence mais leur caractère immunogène est beaucoup moins marqué que celui des Ag salivaires [58]. La présence de protéases dans

les produits d'excrétion / sécrétion d'*O. ovis* a été clairement identifiée. Ces protéases proviendraient du tube digestif, plus particulièrement des glandes salivaires [58], et seraient libérées sur les muqueuses nasales et sinusales de l'hôte. Ce sont, pour la plupart, des enzymes "trypsin like" appartenant à la famille des "sérine-protéases" [123]. Le pH optimal pour l'activité de ces protéases est neutre à alcalin, ce qui est proche des valeurs obtenues pour d'autres diptères. Au cours des différents stades larvaires, il n'y a aucune modification qualitative des protéases libérées. Cependant, d'un point de vue quantitatif, il apparaît que les L2 et les L3 en produisent plus, ce qui peut être corrélé au fait que les larves ont de plus en plus de besoins pour leur croissance et pour l'établissement des réserves nécessaires aux stades adultes, non parasitaires. Les produits d'excrétion / sécrétion libérés sont alors capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire et de l'épithélium. Les collagènes de type I et IV et les mucines sont dégradés en petits fragments plus facilement digestibles par les larves [34] mais autorisant la fuite de protéines plasmatiques au cours de la réaction inflammatoire [123].

## **b L'hypersensibilité de type 1 (HS1) et son déroulement**

### **b.1 Mécanismes généraux**

L'HS1 est un phénomène essentiellement sous la dépendance d'une classe particulière d'anticorps, les IgE, capables de se fixer sur certaines cellules comme les mastocytes ou les GB [8].

Elle est caractérisée par la rapidité de sa survenue, tant sur le plan clinique que biologique, suite à une sensibilisation préalable [8]. Les principaux acteurs en sont les mastocytes et la rapidité de cette réponse est due à la libération de leurs médiateurs préformés, tels que l'histamine, l'héparine, des protéases et des facteurs chimiotactiques des GE comme l'Eosinophil Chemotactic Factor (ECF) et des GN, dans les minutes qui suivent leur stimulation. Le stimulus responsable de la dégranulation des mastocytes ou des GB est, entre autres, la réintroduction puis la liaison de l'allergène à deux IgE adjacentes. Ces complexes immuns se lient aux récepteurs de haute affinité de type  $Fc\epsilon RI$  présents sur la membrane plasmique des cellules sus-citées [6, 52]. Cette réaction est suivie par la libération de médiateurs secondaires incluant le PAF et les produits du catabolisme de l'acide arachidonique tels que les PG et les leucotriènes, responsables localement de la contraction des muscles lisses, d'une augmentation de perméabilité capillaire ainsi que d'une augmentation de la sécrétion de mucus gastro-intestinal ou bronchique. Au niveau systémique, ils peuvent être à l'origine d'une hypotension, responsable d'une augmentation du rythme cardiaque [6]. De plus, ces cellules sont capables de synthétiser des cytokines comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-6 qui ont d'importants effets sur la nature de la réponse immunitaire mise en place ultérieurement et sur le recrutement d'une population de leucocytes appropriée [82].



## b.2 Mise en évidence lors de parasitoses et conséquences (cf. Tableau 1)

### *Intervention de l'HS1 au cours de parasitoses gastro-intestinales*

Les résultats d'une étude menée par Harrison *et al.* [56] ont mis en évidence l'intervention d'un tel phénomène lors du rejet des larves de *Trichostrongylus colubriformis* chez des moutons immunisés. Il s'agit de la réponse effectrice la plus observée au cours d'infestations par les helminthes avec la réponse de type TH2 mais aussi la plus rapide à se mettre en place. L'HS immédiate, dans le cas de nématodes gastro-intestinaux, peut ainsi être à l'origine de malabsorption, de vomissements et de diarrhée [73, 82]. On considère alors que ce type d'HS protégerait contre les infestations par les nématodes selon trois mécanismes [86] :

- les médiateurs de la RI libérés par des cellules "IgE sensibles" pourraient directement affecter la survie des vers ;
- les mastocytes et les GB sécrétant des ions chlorures pourraient aider à chasser les parasites de la muqueuse intestinale ;
- l'augmentation de la perméabilité intestinale pourrait faciliter la translocation des anticorps vers la lumière intestinale.

### *Intervention de l'HS1 au cours de l'œstrose*

Des données histopathologiques suggèrent que l'HS1 est le principal phénomène impliqué dans la pathogénie de l'œstrose. Les modifications cellulaires au niveau de la muqueuse pituitaire ressemblent à celles observées lors d'infestations par *Lucilia cuprina* [79]. Les premières études portant sur la pathogénie de l'œstrose, menées par Jagannah *et al.* [59], décrivaient déjà l'infiltration de la muqueuse par des GE. Par la suite, d'autres expériences ont permis de mettre en évidence le recrutement de cellules inflammatoires (mastocytes, globules leucocytes et GE) au niveau du site d'infestation [29]. Ces résultats ont été confirmés plus tard grâce aux expériences menées par Nguyen *et al.* [90, 91, 93] qui ont montré que pour tous les types cellulaires (mastocytes muqueux (MM) et séreux (MS) (définitions *cf. infra*), GE), acteurs de l'HS1, les différences étaient très significatives entre les agneaux témoins indemnes et les moutons infestés. Le nombre de MS et de MM est multiplié par 2 lors d'infestation unique et par 5 à 7 lors d'infestations répétées. En conditions naturelles, le nombre de GE augmente, ils sont 17,5 à 58,5 fois plus nombreux par rapport aux témoins (dans les cavités nasales et les sinus) et le nombre de mastocytes est multiplié par deux.

De plus, les mastocytes et les GE semblent plus abondants dans le chorion sous-épithélial et leur densité décroît de plus en plus en profondeur : ils sont proches des sites réactionnels au contact avec les parasites ou leurs antigènes. Les populations de cellules réactionnelles sont aussi plus concentrées dans certaines zones comme les sinus, où se font les mues L1-L2 et L2-L3, par rapport à la muqueuse des cornets nasaux, montrant la relation entre la densité cellulaire et la présence et l'activité antigénique des parasites [91]. Ces expériences sont en accord avec celles menées par Dolbois-Charrier *et al.* [29].

L'intervention de ce type d'HS a pu être confirmée par des tests intra-dermiques utilisant des produits d'excrétion / sécrétion (Jacquiet *et al.*, données non publiées). Rapidement après l'injection (environ 30 minutes après), on observe localement une réaction œdémateuse et congestive [34].

### c Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)

Il existe quatre types de CPA présentes dans les organes lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale : les cellules dendritiques (CD), les macrophages, les cellules B et les cellules épithéliales [47, 86]. Les cellules M des plaques de Peyer semblent aussi être impliquées dans la présentation d'antigènes mais ce rôle n'a pas encore été clairement démontré. En ce qui concerne *O. ovis*, il semblerait que les Ag de larves infestantes soient phagocytés par des cellules de Langerhans de la muqueuse respiratoire qui assureraient par la suite un rôle de CPA et stimuleraient la production de cytokines par les lymphocytes T provoquant ainsi le recrutement des mastocytes et des GE et augmentant la production d'immunoglobulines E (IgE) par les lymphocytes B [33].

## 2.2 Recrutement des sous-populations de lymphocytes T

Les LTh peuvent être subdivisés en trois catégories : LTh0, LTh1 et LTh2, cette ségrégation se faisant sur la base des cytokines qu'ils sécrètent [1, 47, 86, 128]. Les agents entraînant une réponse de type TH1 sont des entités intracellulaires. La population de cellules de type TH1 est caractérisée par les cytokines suivantes : l'interféron  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), l'IL-12 et le tumor necrosis factor  $\beta$  (TNF- $\beta$ ). Ces dernières activent les macrophages et orientent la synthèse des anticorps vers les isotypes IgG-2a et -3, ceux-ci étant responsables de la mise en place de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps et de l'activation du complément. Les macrophages stimulés produisent de l'INF- $\alpha$  et de l'IL-12 qui activent les cellules NK, sécrétant de l'INF- $\gamma$ , responsable de la différenciation des cellules LTh0 en LTh1 (cf. Figure 4). Par opposition aux LTh1, la population de cellules de type TH2 est induite par des organismes extracellulaires et caractérisée par les cytokines suivantes : l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-9, l'IL-10 et l'IL-13. Ces interleukines activent certaines populations cellulaires telles que les mastocytes, les GE et les lymphocytes B et orientent la production d'anticorps vers les isotypes IgE et IgG-1 (cf. Figure 5). Seulement deux cytokines semblent être produites par les deux types de populations cellulaires TH1 et TH2 : l'IL-3 et le GM-CSF. Enfin, les cellules de type LTh0 semblent être caractérisées par les IL-2, -3 et -4, l'INF- $\gamma$  et le TNF- $\beta$  [16] et ont été identifiées comme les précurseurs des LTh1 et LTh2. La différenciation des précurseurs LTh0 en LTh1 ou LTh2 est contrôlée essentiellement par l'IL-4, l'IL-12 et l'INF- $\gamma$ .

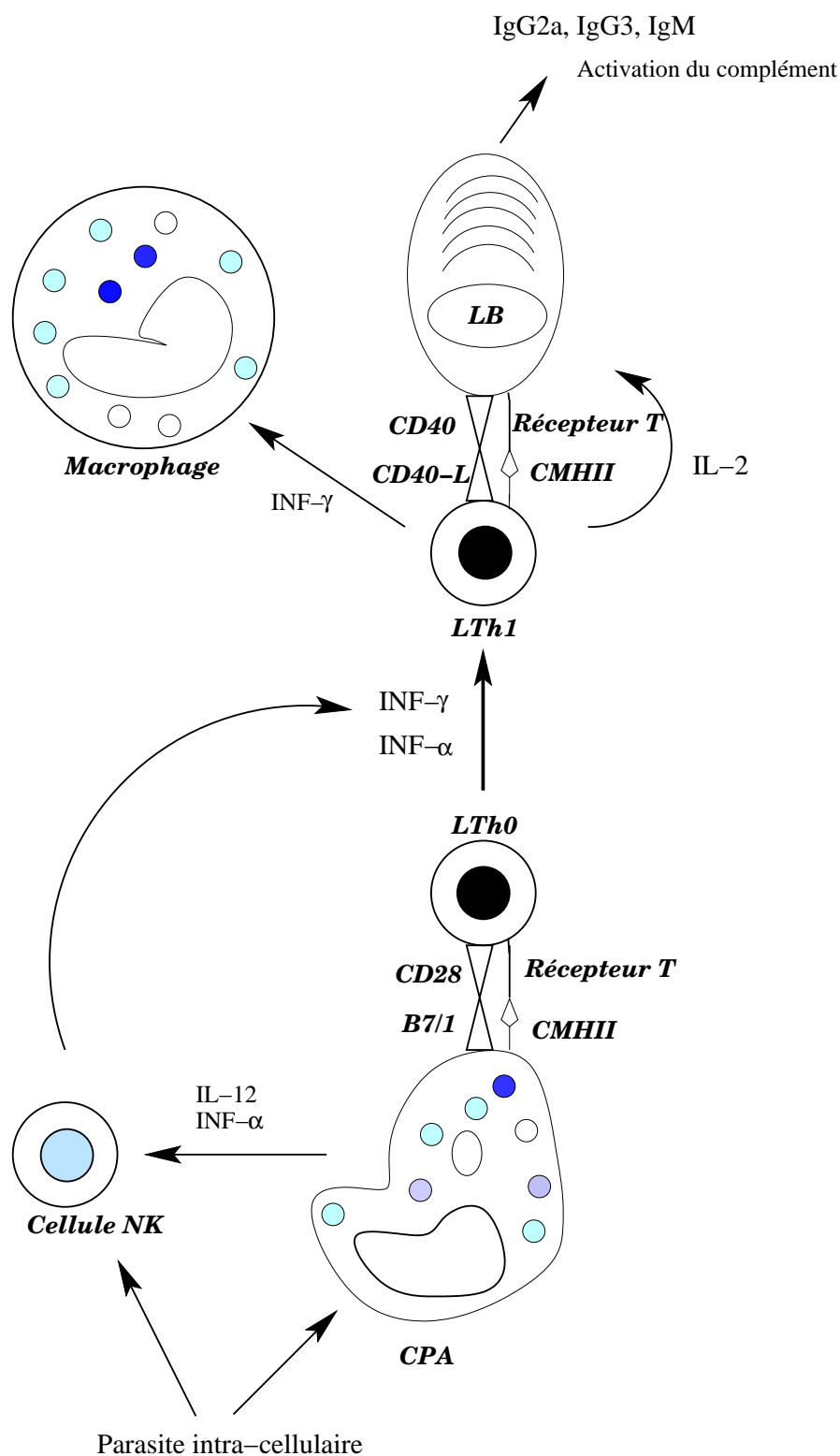


FIGURE 4 – Polarisation de la réaction inflammatoire vers un type TH1 (d'après [1, 6, 47, 128]).  
 Cellule NK : cellule natural killer, CMH II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, CPA : cellule présentatrice d'Ag, Ig : immunoglobuline, IL : interleukine, INF : interféron, LB : lymphocyte B, LT : lymphocyte T.

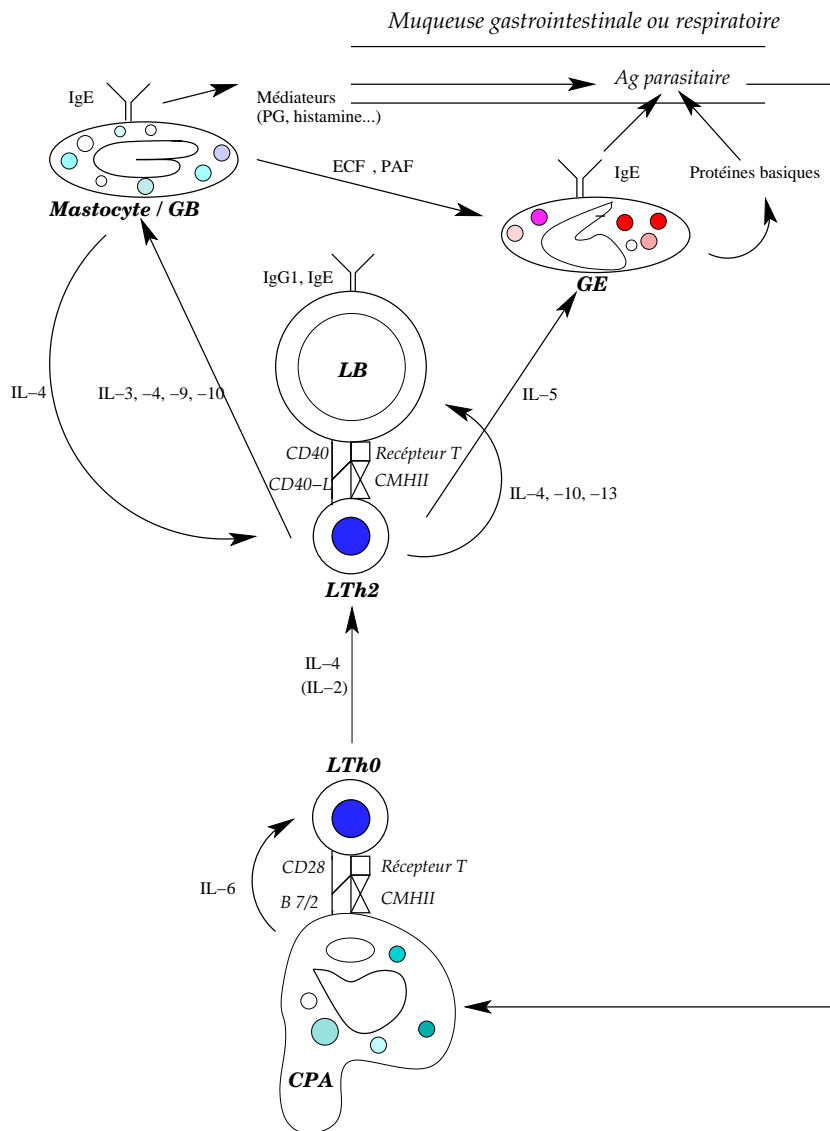


FIGURE 5 – Polarisation de la réaction inflammatoire vers un type TH2 après parasitose des muqueuses respiratoire et gastro-intestinale (d'après [1, 47, 85, 128])

CPA : cellule présentatrice d'Ag, CMH II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, ECF : eosinophil chemotactic factor, PAF : platelet activating factor, Ig : immunoglobuline, IL : interleukine, GB : granulocyte basophile, GE : granulocyte éosinophile, LB : lymphocyte B, LT : lymphocyte T, PG : prostaglandines.

Les réponses de type TH1 ou TH2 pouvant être mises en place au cours d'infestations parasitaires sont donc caractérisées par le type de cytokines produites par les LT CD4+ correspondants [1, 47, 128], à savoir :

- cytokines orientant vers une réponse de type TH2 : IL-1, -4, -5, -6, -9, -10, -13 et TNF- $\alpha$  ;
- cytokines orientant vers une réponse de type TH1 : INF- $\gamma$ , TNF- $\beta$  et IL-12.

### 2.3 Mise en place d'une réponse de type TH2 lors d'infestation par des nématodes gastriques (modèle : *H. contortus* et *T. circumcincta*) ou par des larves de diptères (modèle : *O. ovis*)

Tandis que l'immunité face aux infestations parasitaires tend vers une élimination rapide et immédiate de ces derniers, les stratégies employées par les parasites eux-mêmes ont pour but de retarder ce mécanisme d'expulsion et d'assurer leur survie et la distribution de leur descendance [82]. Les mécanismes effecteurs de l'hôte peuvent être supprimés ou évincés par des vers adultes et expliquent que des parasites tels que *Trichostrongylus colubriformis* peuvent survivre plusieurs mois dans le tractus digestif des moutons [85] ou que des larves, de stade L1 dans le cas d'*O. ovis* et de stade L4 dans le cas d'*H. contortus*, peuvent rentrer en hypobiose pendant plusieurs mois, s'adaptant ainsi à des conditions climatiques trop rudes [68, 124]. Pendant ces périodes durant lesquelles le métabolisme parasite est ralenti, ce mécanisme est renforcé par une diminution de la sécrétion d'Ag, issus des glandes salivaires et/ou du tube digestif [124]. Aussi, une immunité inappropriée ou inefficace permet la persistance des parasites et de leurs produits dans les tissus hôtes ainsi que l'apparition de dommages tissulaires et de mécanismes d'hypersensibilité. Les manifestations d'éosinophilie sanguine et tissulaire, d'infiltration par les mastocytes et la production d'IgE lors de parasitose intestinale, notamment par *Trichostrongylus colubriformis*, suggèrent fortement une réponse immunitaire de type TH2 [86], que l'on rencontre en général lors d'infestations parasitaires chroniques [6] (cf. Figure 5). Dans le cas d'infestations par des larves de diptères, il est probable que les antigènes de larves d'*Æstrus ovis* soient phagocytés par les cellules de Langerhans de la muqueuse respiratoire, ce qui stimulerait la production de cytokines par les lymphocytes T qui provoqueraient le recrutement des mastocytes et des GE et augmenteraient la production d'immunoglobulines E (IgE) [33]. L'hypothèse de l'implication d'une réponse de type TH2 dans l'œstrose ovine a fait l'objet de nombreuses études et est supportée par les observations concernant la régulation des populations larvaires ainsi que par les réponses humorales et cellulaires impliquées dans l'expulsion des parasites [34]. Les études réalisées afin d'élucider ce mécanisme révèlent de nombreuses homologues avec les réponses de type TH2 impliquées dans le rejet de parasites gastro-intestinaux tels que *H. contortus* ou *T. circumcincta* [47, 128].

### a Importance des LTh CD4+

L'importance des cellules LTh CD4+ dans les mécanismes de résistance aux nématodes gastro-intestinaux a été montré par l'intermédiaire du modèle *Hæmonchus contortus* [107]. Ces expériences ont révélé un rôle essentiel de ces cellules dans la résistance génétique aux nématodes et dans la mise en place d'infiltrations cellulaires de la muqueuse intestinale (mastocytes et GE) et de l'élévation de la concentration sérique en IgE.

### b Rôle des CPA dans la polarisation de la réponse

Les CPA exposent les antigènes parasitaires aux lymphocytes T helper (LTh) CD4+ naïfs par l'intermédiaire de molécules formant des complexes "ligand-récepteur" tels que le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II-récepteur T des LTh, et le ligand CD40-CD40 [47]. Il semblerait également que le type de cellules intervenant dans la présentation d'antigènes influence la polarisation de la réponse immunitaire qui s'ensuit [47, 1]. Par exemple, les macrophages favoriseraient une réponse de type TH1 alors que les lymphocytes B induiraient une réponse de type TH2. Les CPA diffèrent également par les molécules accessoires qu'elles présentent à leur surface (cf. Figures 4 et 5). L'association des molécules CD28 à leur ligand B-7 (1 et 2) induit un signal de stimulation des lymphocytes T. Diverses approches ont récemment indiqué que B-7/2 donnerait un signal de costimulation, favorisant la synthèse d'IL-4 par les lymphocytes T et dirigerait donc l'activation des TH2; au contraire, B-7/1 favoriserait la stimulation des réponses TH1 [16]. Les infestations par des nématodes extracellulaires, du type *H. contortus* ou *T. circumcincta*, sont accompagnées non seulement d'une élévation de l'éosinophilie sanguine mais aussi d'une infiltration de la muqueuse gastro-intestinale par des GE, des mastocytes et des IgE [47], l'ensemble de ces phénomènes aboutissant à l'expulsion du parasite. L'apparition de ces cellules étant sous le contrôle des cytokines de type TH2, cela suggère que la mise en place d'une telle réponse est protectrice pour l'hôte et donc adaptée à ce type de parasite. Parfois, une réponse TH1 peut se mettre en place et cela aboutit à des infestations chroniques car l'hôte n'est pas en mesure de se débarrasser du parasite [47, 128].

### c La différenciation des précurseurs LTh0 en LTh2

En présence de l'IL-4 et de l'antigène, les LTh0 sont capables de se différencier *in vitro* en LTh2 et ceci quelle que soit la CPA utilisée. Cet effet majeur de l'IL-4 dans la différenciation des LTh2 est confirmé par l'absence de cytokines de type TH2 chez les souris génétiquement incapables de produire de l'IL-4. De plus, en bloquant la fonction de l'IL-4 chez des souris résistantes au parasite intestinal *Trichuris muris*, on empêche la mise en place d'une immunité protectrice, ce qui autorise les stades adultes du parasite à se développer. L'administration de cette cytokine à des souris sensibles facilite l'expulsion du nématode [48]. Cependant, des souris déficientes en récepteurs à l'IL-4 ou en "signal transducer and activator of transcription 6" et infectées avec le nématode *Nippostrongylus brasiliensis* développent une réponse de type TH2, certes diminuée, mais significative [60]. Ainsi, il a été mis en évidence par Finkelman *et al.* (1999) et par Mc

Kenzie (2000) que l'IL-13 avait un rôle aussi important que l'IL-4 dans la polarisation vers une réponse de type TH2. Quant au TNF- $\alpha$  [5], il semble avoir un rôle essentiel dans la régulation de la réponse de type TH2. Des expériences, utilisant des souris génétiquement modifiées déficientes en récepteurs au TNF- $\alpha$  et des traitements à base d'anticorps monoclonaux anti-TNF- $\alpha$ , montrent que ces mêmes souris infestées par *Trichuris muris* n'arrivent pas à éliminer le parasite et expriment une réponse de type TH1. L'IL-1 $\alpha$  pourrait également influencer la réponse vers un type TH2 : il s'agit d'un facteur de croissance autocrine [16]. L'INF- $\gamma$ , jouant un rôle important dans la différenciation des LTh1, serait capable de bloquer cette différenciation et l'IL-12, administrée à des souris infestées par *Nippostrongylus brasiliensis*, serait responsable de la suppression de l'infiltration intestinale par les mastocytes, de la réponse en IgE, de l'éosinophilie et de l'expulsion des nématodes [86]. Enfin, une fois les populations cellulaires différenciées, celles-ci apparaissent stables *in vivo* [16].

## 2.4 Réponses effectrices : cellules et médiateurs impliqués (cf. Tableau 1)

### a Les GE : propriétés et activités biologiques

#### a.1 Morphologie et granulations

Ces cellules contiennent plusieurs protéines basiques cationiques dont la Major Basic Protein (MBP), l'Eosinophil Cationic Protein (ECP) et l'Eosinophil Derived Neurotoxin (EDN), ayant des propriétés cytotoxiques permettant de faciliter l'adhésion du GE à la surface du parasite. L'Eosinophil Derived Neurotoxin (EDN) est une protéine ayant également un caractère neurotoxique. Enfin, l'Eosinophil Peroxydase (EPxO) agit en augmentant le métabolisme oxydatif et en produisant des peroxydes toxiques pour le parasite [6].

#### a.2 L'éosinophilopoïèse

Les leucotriènes jouent un rôle central dans l'induction de la production des GE par la moëlle osseuse et dans leur différenciation par l'intermédiaire de la sécrétion d'IL-5 [19]. Cette interleukine représente le facteur principal dans la différenciation terminale de ces cellules et est responsable de l'augmentation de leurs capacités effectrices. De plus, la confirmation du rôle de l'IL-5 dans l'éosinophilopoïèse a pu être vérifiée en injectant des anticorps monoclonaux anti-IL-5 à des souris infestées par *Schistosoma mansoni*, résultant dans l'élimination effective de l'éosinophilie induite par ce parasite. Des études menées par Dubucquoi *et al.* [39] ont permis de mettre en évidence la présence d'ARNm codant pour l'IL-5 dans le cytoplasme de GE par des méthodes immuno-biochimiques, soulignant aussi le rôle de la voie autocrine dans le recrutement local et l'activation de ces cellules. *In vitro*, l'IL-3 et le GM-CSF auraient un rôle important dans l'éosinophilopoïèse et dans l'infiltration de la *lamina propria* de la muqueuse intestinale par ces cellules [86]. Cette infiltration est aussi le résultat de facteurs chimiotactiques tels que l'"Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis" (ECF-A), libérés par les mastocytes au site

de l'infection [102]. Cet afflux peut alors être inhibé par la présence d'enzymes dégradant les médiateurs mastocytaires tels que l'histamine ou les leucotriènes.

### a.3 Activité biologique

Les GE sont activés par l'antigène ainsi que par d'autres substances telles que l'Eosinophil Cytotoxicity Enhancing Factor (ECEP), le leucotriène LTC<sub>4</sub>, les prostaglandines, les thromboxanes et le PAF. Les GE sont des cellules spécialisées dans la défense de l'hôte contre les parasites tissulaires dont la taille empêche la phagocytose. Le rôle du GE dans l'ADCC (cytotoxicité dépendante des Ac) a été découvert par Butterworth [13]. Les Ac intervenant dans l'ADCC sont les IgG et surtout les IgE. La cytolysse de la cible est la conséquence de la dégranulation des GE par un mécanisme d'exocytose. Ce phénomène semble régulé par le niveau de phosphorylation des protéines "signal" présentes sur la membrane du GE. Il a été montré *in vitro* que les GE sont de puissantes cellules impliquées dans le mécanisme de destruction des helminthes et des larves d'œstres puisqu'il y a une corrélation positive entre l'apparition de GE et l'existence de parasites morts ou sévèrement endommagés sur les coupes histologiques [6, 42, 49]. Cependant, ce même rôle est plus difficile à établir *in vivo*. De récentes études menées par Meeusen *et al.* [81] ont montré chez la souris que les GE, en collaboration avec les Ac et le complément, sont responsables de la destruction des stades larvaires infestants, alors que leur rôle direct dans le rejet de parasites adultes semble limité. Ce rôle est assuré par la libération de plusieurs types de médiateurs [82]. On distingue les médiateurs primaires, stockés dans les granules cytoplasmiques, qui sont des protéines cationiques incluant la MBP, l'ECP, l'EPxO et l'EDN (*cf. supra*), des médiateurs secondaires synthétisés après induction des cellules, comprenant des leucotriènes, le PAF et autres composés lipidiques. De plus, les GE ont la capacité de sécréter un ensemble de peptides de la phase aiguë de l'inflammation tels que l'IL-1, l'IL-8 et le TNF- $\alpha$  et également un ensemble de cytokines immunorégulatrices telles que l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, le GM-CSF et le TGF- $\beta$ . L'ensemble de ces médiateurs est en partie responsable de la vasodilatation des capillaires intestinaux, de la sécrétion de mucus et de la contraction des muscles lisses. Enfin, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les GE entraîne une diminution des sécrétions acides par les cellules pariétales ; l'environnement devient alors favorable à la survie des parasites tel que *T. circumcincta* [108].

### a.4 Effets délétères pour l'hôte

La migration des GE vers la zone de l'inflammation permet d'expliquer les dégâts cellulaires qu'ils provoquent, par la libération au sein même du foyer, de leur contenu granulaire riche en protéines enzymatiques toxiques (MBP, EPC, EDN) et en facteurs chimiotactiques. En ce sens, il a été démontré qu'à des concentrations physiologiques, la MBP est particulièrement toxique sur un grand nombre de cellules de mammifères. La dégranulation du GE va aussi libérer des médiateurs (PAF et LTC<sub>4</sub>) ayant des effets sur l'inflammation et le chimiotactisme des GN et des macrophages [26]. Il a également été mis en évidence, par Larsen *et al.* [73], une



relation étroite entre le développement de diarrhée chez des brebis de race Mérinos infestées par *Trichostrongylus colubriformis* et l'infiltration éosinophile de l'intestin grêle.

## **b Les mastocytes : propriétés et activités biologiques**

Les mastocytes sont des cellules qui jouent un rôle central dans les manifestations allergiques, dépendantes des IgE, pour lesquelles ils possèdent des récepteurs de haute affinité. Ils ont aussi d'autres fonctions dans les processus inflammatoires et immunologiques.

### **b.1 Différents types de mastocytes**

Chez le rat comme chez l'homme, on distingue deux types de mastocytes :

- les mastocytes du tissu conjonctif dits mastocytes séreux (MS) présents dans la peau et la cavité péritonéale ;
- les mastocytes muqueux (MM) présents dans les muqueuses.

Ces deux types de mastocytes se distinguent par le contenu de leurs granules : alors que les MM ne contiennent ni de chymase, ni de carboxypeptidase, les MS en possèdent. Les deux types, cependant, présentent de la tryptase. De plus, le rapport héparine/chondroïtine sulfate E est élevé dans les MS et bas dans les MM.

### **b.2 Induction de la synthèse des mastocytes**

Le phénotype des mastocytes serait régulé par leur microenvironnement cellulaire et certaines cytokines (IL-3, GM-CSF et IL-4). Chez les moutons, l'IL-3 est responsable de la différenciation des mastocytes dans la moëlle osseuse [86]. Une autre cytokine ayant un rôle important dans la croissance et la différenciation des mastocytes, chez les moutons, les rats et les primates, est le "stem cell factor" (SCF) ou "kit ligand". Cette molécule est alors capable de se lier au récepteur c-kit, une tyrosine kinase abondamment exprimée à la surface des mastocytes [86]. Aussi, l'injection d'anticorps monoclonaux anti-SCF à des rats infestés par *Nippostrongylus brasiliensis* entraîne une diminution significative du nombre d'œufs présents dans les fèces.

### **b.3 Rôles des mastocytes**

#### *Mise en évidence expérimentale*

Il a été démontré *in vitro* que les mastocytes et les globules leucocytes (cellules semblant dérivées des mastocytes épithéliaux [54]) de moutons sont capables de libérer de la "sheep mast cell protease" (SMCP) après incubation avec des antigènes spécifiques du parasite : *Trichostrongylus colubriformis* [64], ce qui a été confirmé par les expériences menées par Miller (1996). De plus, les granules de chymases présents dans les mastocytes sont détectés systématiquement dans la lumière intestinale lors d'infestations parasitaires [86]. De récentes études ont montré que la principale fonction de ces enzymes serait d'altérer la perméabilité mucosale. L'activation des mastocytes intra-épithéliaux, qui agissent comme des gardiens des muqueuses, per-

met l'ouverture des jonctions serrées afin de permettre la sortie des protéines plasmatiques, qui incluent les anticorps. Enfin, l'analyse des expériences menées par Douch *et al.* (1993) et Scott *et al.* (2000) a permis de montrer que les moutons présentaient une infiltration plus importante de leur muqueuse en globules leucocytes et en mastocytes que les agneaux et l'apparition de cette infiltration a été mise en relation avec le développement d'une résistance à des nématodes gastro-intestinaux. Leur fonction reste tout de même incertaine, bien qu'il y ait une importante corrélation entre le nombre de ces cellules et l'activité d'inhibition de la migration larvaire dans le mucus (LMI, *cf. infra*). Ceci suggère alors que les mastocytes et les globules leucocytes sont la source de médiateurs entraînant la paralysie des larves de nématodes. Les résultats indiquent également une association entre ces cellules réactionnelles et la diminution du nombre d'œufs dans les fèces, ce qui suggère qu'elles pourraient être impliquées dans la production de substances affectant la fécondité des nématodes.

#### *Données générales*

La dégranulation entraîne la libération de différents types de médiateurs chimiques :

**les dérivés de l'acide arachidonique** , transformés en éicosanoïdes par les voies de la lipo- et de la cyclo-oxygénase, dont :

- **les prostaglandines** : principalement PGE1, PGE2 et PGD2 qui sont surtout synthétisées par les mastocytes séreux. La PGD2 est la première prostaglandine synthétisée par les mastocytes, elle inhibe l'agrégation plaquettaire, a un effet chimiotactique pour les GN et est considérée comme étant à l'origine des phénomènes d'hypotension.
- **les leucotriènes** : le LTB4 possède une activité chimiotactique, augmente la sécrétion d'enzymes lysosomales et la production d'ions superoxydes. L'acide hydroéicosatétraoïque (HETE) a un effet chimiotactique sur les GE et agit sur la libération du contenu de leurs granules. Les leucotriènes C4, D4 et E4 correspondent à l'activité anciennement décrite sous le nom de SRS-A (slow reacting substance of anaphylaxis). Ces leucotriènes sont principalement produits par les MM. Ils ont pour fonction de modifier la perméabilité vasculaire. Le PAF (platelet activating factor) permet l'agrégation plaquettaire et la dégranulation des plaquettes. Il est également responsable de l'hypotension, au même titre que la PGD2.

**les cytokines** pro-inflammatoires et immunomodulatrices parmi lesquelles l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10, le GM-CSF et le TNF- $\alpha$ .

**les médiateurs préformés**, comme l'histamine, stockée sous forme de complexes avec les glucosaminoglycanes, les protéoglycanes, les sérine protéases et les carboxypeptidases A ;

**d'autres médiateurs** : la sérotonine qui est susceptible de jouer un rôle dans les réactions d'HS1 et l'ECFA (eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis) qui est le principal activateur des éosinophiles.

Les mastocytes ont également une fonction purement immunologique puisqu'ils sont capables d'être des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) pour les lymphocytes T.

Les mastocytes ont donc un rôle dans la défense contre les parasites. Face à ces derniers, les mastocytes mobilisés pourraient agir à plusieurs niveaux :

- libération de médiateurs inflammatoires (*cf. supra*) : les LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> et E<sub>4</sub> seraient impliqués dans l'inhibition de la migration des larves de nématodes gastro-intestinaux chez le mouton [33, 37] ;
- augmentation de la perméabilité de la muqueuse notamment par l'intermédiaire de leucotriènes, de la sérotonine, de protéases [86] ou de cytokines comme le TNF- $\alpha$  qui favorise le passage des protéines plasmatiques dans la lumière intestinale ou dans les cavités respiratoires ;
- sécrétion de cytokines dont les IL-4, -6, -9 qui influencent la polarisation de la réponse immunitaire locale dans le sens TH2 [128] (*cf.* Figure 5), réaction se mettant en place lors d'agression par des organismes extracellulaires tels que les parasites et caractérisée par les cytokines suivantes : l'IL-4, -5, -6, -9, -10 et -13, qui entraînent le recrutement de certaines cellules inflammatoires à savoir les mastocytes, les GE et les lymphocytes B [1, 47, 77].

#### b.4 Effets délétères

Le principal inconvénient de l'augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale est une perte conséquente de protéines *via* l'intestin, marquée par une hypoalbuminémie, quand l'infestation parasitaire est élevée [86]. L'augmentation des concentrations plasmatiques en pepsinogène et en gastrine [76, 108, 115] est également une conséquence de cette augmentation de perméabilité membranaire mais il a également été démontré que *T. circumcincta* pouvait stimuler les glandes gastriques à produire ce substrat [76]. Ces dosages peuvent être utilisés à des fins diagnostiques, la concentration de pepsinogène plasmatique semblant être étroitement liée à l'importance de la population parasitaire.

#### c Autres types cellulaires

L'utilisation récente de méthodes immunocytochimiques [34] a permis de mettre en évidence, dans la muqueuse de l'appareil respiratoire supérieur d'animaux infestés par *Cestrus ovis*, de nombreux lymphocytes B, T et de nombreuses cellules appartenant au système des phagocytes mononucléés. On a pu également noter que les taux d'infiltration cellulaire en lymphocytes T et B, monocytes, mastocytes, globules leucocytes et GE augmentaient progressivement à l'approche des sinus, endroit où ont lieu les mues et où sont présentes les L2 et les L3. Il est à noter que ce profil cellulaire suggère une production de cytokines de type TH2 de la part des lymphocytes T mais cela n'a pas encore été clairement démontré dans le modèle *O. ovis*.

#### d Les immunoglobulines

Les Ig peuvent être produites soit localement soit au niveau systémique. On les retrouve dans le contenu du mucus présent dans la lumière intestinale ou encore dans les exsudats inflammatoires de la muqueuse pituitaire. Cette translocation résulte de mécanismes de transports épithéliaux et d'une augmentation de la perméabilité des muqueuses, entraînant la fuite passive de protéines plasmatiques [120].

##### d.1 Les IgE

Dans le cas d'infestations par *O. ovis*, cet élément n'a pu être identifié qu'indirectement par le recrutement local des cellules ayant des récepteurs spécifiques des IgE, c'est-à-dire les mastocytes et les GE [91]. Dans le cas d'infestations par des nématodes gastro-intestinaux, leur participation et leur rôle ont été largement démontrés, notamment grâce au modèle *Trichostrongylus colubriformis*, parasite de l'intestin grêle des petits ruminants [56].

##### d.2 Les IgG

Les IgG, issues de productions locale et systémique, sont retrouvées en grande quantité au sein de la lymphe intestinale et au niveau des exsudats nasaux de moutons résistants aux infestations parasitaires [86, 104, 124]. Il a été démontré chez les rongeurs [85] et les moutons [80] que cet isotype semblait conférer à l'hôte une protection passive contre les parasites gastro-intestinaux. En effet, des expériences menées sur des moutons immunisés contre *Trichostrongylus colubriformis* [80] et contre *T. circumcincta* [116], ont montré que la cinétique des IgG (IgG-1 et -2) est biphasique, c'est-à-dire que l'on observe deux pics de concentration de ces Ac associés d'une part à l'expulsion rapide des nématodes et d'autre part à l'expulsion plus tardive. Ainsi, ces immunoglobulines interagissent avec les molécules de mucine du mucus et sont alors responsables de l'"emprisonnement" des parasites. Des dosages radio-immunologiques des IgG sériques ont permis de montrer la relative lenteur de leur cinétique par rapport à celle des IgA [114], leur détection ne se faisant qu'à partir de quatre semaines après ré-infestation. Cette détection des IgG présente un intérêt diagnostique par l'utilisation de la méthode ELISA et pronostique puisqu'elle permet d'évaluer la réponse de chaque individu par rapport à *H. contortus*, *T. circumcincta* ou *O. ovis*, les bons répondeurs ayant une forte réponse en IgG [2]. Dans le cas d'*O. ovis*, il a été mis en évidence que les concentrations systémiques en IgG augmentaient très fortement en été, moment où l'on observe le plus de stades L2 et/ou L3, capables de produire plus d'Ag d'excrétion / sécrétion [124]; par contre, il n'existe aucune relation entre la concentration en IgG et le nombre de larves ou le statut clinique de l'animal [34].

##### d.3 Les IgA

Les IgA [86] représentent l'isotype le plus impliqué dans les parasitoses gastro-intestinales des ruminants. La concentration en IgA dans le mucus abomasal est largement augmentée chez des moutons immunisés contre *T. circumcincta* et *H. contortus* [40, 114, 120] et leur concentration

est maximale sept à huit jours en moyenne après l'infestation par *T. circumcincta*. Les IgA sont produites localement par les plasmocytes de la *lamina propria* de l'abomasum. Ces cellules proviennent de la différenciation des lymphocytes B suite au phénomène de "homing", induisant un retour à l'endroit de leur première sensibilisation avec l'Ag [114, 116, 117]. Ces immunoglobulines sont induites au niveau des plaques de Peyer, par les cytokines IL-5 et TGF- $\beta$  et leur expression semble être sous le contrôle, entre autres, de l'IL-5. En effet, des complexes immuns de type IgA-Ag induiraient la production d'IL-5 par les GE, responsables à leur tour de la production de cette même cytokine, activant ainsi l'expression de ce type d'anticorps [39]. La fonction de ces IgA n'est pas vraiment connue, mais il existe une corrélation négative entre la longueur des nématodes, le taux de fécondité et la quantité d'IgA présente dans la lymphe gastrique. Ainsi, ces anticorps pourraient interférer avec les processus de nutrition des parasites. Elles confèrent à l'hôte une protection passive contre les vers et les complexes immuns pourraient se lier aux cellules réactionnelles telles que les mastocytes et les GB, entraînant la libération de cytokines et de médiateurs de l'inflammation [39]. De telles Ig ont également été retrouvées dans les exsudats nasaux de moutons infestés par *O. ovis* mais on leur confère un rôle mineur par rapport aux IgE [34].

#### e Réponses effectrices spécifiques lors d'infestations par des parasites gastriques

L'aptitude de l'hôte à avoir une réponse effectrice peut être contrôlée par deux types de facteurs : la charge parasitaire et la fécondité des vers, mise en évidence par le comptage des œufs dans les fèces. On considère que lorsqu'on obtient un faible nombre d'œufs dans les matières fécales, l'individu présente un caractère de résistance et *vice versa*. Pour *H. contortus*, du fait de son régime hématophage, un autre paramètre, de nature hématologique, à savoir l'hématocrite, permet d'évaluer le type de réponse que présente l'animal infesté [2]. Si ce dernier parvient à maintenir son hématocrite, on peut le considérer comme résistant. Cependant, l'ensemble des caractères décrits n'est pas définitif, en particulier lors d'hæmonchose, et un individu résistant lors d'une première infestation, peut très bien avoir un nombre élevé d'œufs dans les selles ainsi qu'un hématocrite très bas lors des infestations suivantes. Cette caractéristique, qui n'est pas présente lors d'infestations par *Trichostrongylus colubriformis*, implique que l'acquisition d'une immunité face à *H. contortus* reste précaire et cela reflète l'adaptation de ce parasite qui semble avoir la capacité d'évincer la RI de l'hôte [3, 115]. Ces réponses effectrices peuvent être compromises chez les jeunes notamment lors d'infestations par *H. contortus* car il a été montré qu'une immunité ne peut être acquise avant six mois et que celle-ci reste imparfaite jusqu'à un an [2, 40]. Les femelles gestantes [2] et les animaux souffrant de malnutrition peuvent également présenter des réponses effectrices altérées. Elles peuvent avoir lieu à tous les stades de développement du parasite : larves infestantes L3, L4 ou adultes [86]. Cependant, on peut observer certaines nuances, notamment en ce qui concerne l'éosinophilie (*cf. supra*). Cette réponse aboutit chez *T. circumcincta* et *H. contortus* à un arrêt de la croissance des larves au stade L3 ou au

début du stade L4 [117], à une diminution de la fécondité, à une redistribution du parasite au sein du tractus digestif, à des mécanismes dégénératifs affectant le nématode et à des modifications biochimiques telles qu'une augmentation de leur production en acétylcholinestérase et de leur teneur en lipides, une diminution de leur aptitude à spolier les phosphates inorganiques de l'hôte et un changement dans leur métabolisme énergétique [102].

### e.1 Cinétique des mécanismes effecteurs

On peut observer deux mécanismes successifs intervenant dans l'expulsion des parasites gastriques tels que *H. contortus* et *T. circumcincta* [80] :

- une expulsion rapide, qui a lieu en quelques heures, concernant les larves encore non installées dans leur zone de prédilection ; ce mécanisme est largement mis en place lors d'infestation par *H. contortus* et permet l'expulsion d'un grand nombre de vers en moins de 24 heures ainsi qu'une diminution de 90% du taux de larves infestantes en 48 heures [87].
- une expulsion plus tardive qui rejette les adultes et les larves en développement bien établies.

Quatre mécanismes permettent d'expliquer ces deux types d'expulsion : l'emprisonnement des larves dans le mucus, l'apparition d'anticorps anti-*T. circumcincta* et anti-*H. contortus* spécifiques (au niveau local et systémique), une augmentation du taux de prolifération et dans les produits des cellules épithéliales ainsi que des modifications biochimiques au niveau de la bordure en brosse des entérocytes [87] et la libération locale de médiateurs de l'inflammation tels que les amines vasoactives ou des produits du métabolisme de l'acide arachidonique.

### e.2 Cellules glandulaires à mucus, production de mucus et motilité intestinale

#### *Mise en évidence*

De nombreuses infestations parasitaires induisent une hyperplasie des cellules glandulaires à mucus et une augmentation de la production de ce dernier, l'ensemble de ces événements étant sous le contrôle des LTh2. Lors d'infestations de souris par *Trichostrongylus spiralis*, le pic de production de mucus est associé à l'expulsion parasitaire [47]. Les expériences de Harrison *et al.* [56], ayant mis en évidence la présence de L3 agrégées et non paralysées dans le mucus, permettent de proposer trois mécanismes empêchant l'établissement de ces larves :

- l'augmentation de la viscosité du mucus empêcherait les L3 d'y pénétrer ;
- les L3 pourraient être paralysées temporairement par les médiateurs présents dans le mucus et ensuite expulsées ;
- les L3 pourraient être piégées par les Ac et par les glycoprotéines du mucus.

#### *Composition du mucus*

Le mucus semble composé en partie d'IgA et d'IgG (produites respectivement au ni-

veau local et systémique) [114] (*cf. supra*). Les expériences de Douch *et al.* [35] montrent que le mucus gastro-intestinal de moutons résistants à certains nématodes est capable d'inhiber 93% de l'activité de migration larvaire, alors que le mucus de moutons sensibles ou non infestés ne diminue pas significativement cette activité. L'activité d'inhibition de la migration larvaire du mucus de ces moutons a donc été attribuée à des composés ayant des propriétés proches de la "slow reacting substance of anaphylaxis" (SRS-A), les constituants majeurs de la SRS-A étant les leucotriènes LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> et LTE<sub>4</sub>. Il est également intéressant de noter qu'une des propriétés pharmacologiques de la SRS-A est d'entraîner une contraction réversible des muscles lisses, conduisant ainsi à la réduction de la motilité des vers voire à leur paralysie. D'autres médiateurs de l'inflammation libérés par les moutons infestés par des nématodes semblent jouer un rôle dans l'expression d'une résistance vis-à-vis des parasites. Jones *et al.* [62, 65] ont ainsi mis en évidence certaines substances libérées dans le duodénum après infestation de moutons vaccinés contre *Trichostrongylus colubriformis*. On peut citer l'histamine, la LTC<sub>4</sub> mais surtout d'autres métabolites de l'acide arachidonique issus de la voie de la cyclo-oxygénase à savoir une thromboxane, la TXB<sub>2</sub>, et une prostaglandine, la 6-kéto-PGF-1 $\alpha$ . Jones *et al.* [63] ont également mis en évidence la relation entre la cinétique de libération des médiateurs tels que la Sheep Mast Cell Protease (SMCP), l'histamine et les leucotriènes et le rejet des parasites, fournissant la preuve de l'importance de ces derniers dans l'expulsion parasitaire. De plus, les résultats obtenus par Steel *et al.* [121] indiquent que le rejet des larves chez des moutons immunisés est accompagné d'une réponse inflammatoire intestinale incluant la sécrétion d'amines biogéniques (c'est-à-dire l'histamine et la sérotonine) et la fuite de plasma (donc de protéines).

#### *Origine des médiateurs*

La présence de composés inhibant la migration larvaire (Larval Migration Inhibitor ou LMI) dans le mucus gastro-intestinal de moutons résistants aux nématodes *Hæmonchus contortus* est souvent associée à l'augmentation du nombre de mastocytes et de globules leucocytes. L'expérience menée par Douch *et al.* [36, 38] a donc permis de déterminer si les composés de la substance à activité LMI sont effectivement sécrétés par ces cellules en réponse à la présence d'antigène de nématodes et si cette sécrétion pouvait justifier les taux retrouvés dans le mucus. Les résultats ont révélé que l'activité LMI est effectivement plus élevée dans les intestins de moutons immunisés et l'examen histologique des muqueuses abomasale et duodénale montre que les moutons immunisés ont un nombre plus élevé de mastocytes et de globules leucocytes que les moutons non immunisés. Pour confirmer ces résultats, l'isolation et la purification de ces cellules réactionnelles appartenant à des moutons résistants montrent qu'elles sécrètent effectivement des leucotriènes et des substances ayant une activité LMI.

*Rôle des médiateurs*

De nombreuses hypothèses ont été émises concernant les rôles de ces médiateurs [63, 102]:

- ils permettraient la fuite de protéines circulantes (dont les anticorps anti-nématodes) vers la lumière intestinale ;
- ils entraîneraient la détérioration du micro-environnement intestinal en étant à l'origine d'une réaction inflammatoire à médiation immune et sont responsables d'effets locaux tels que l'acidose, l'hypersécrétion de mucus, l'hypermotilité intestinale et la modification des cellules épithéliales ;
- ils pourraient avoir un rôle direct dans l'expulsion des nématodes et altérer profondément l'aptitude des nématodes à se maintenir dans le tractus gastro-intestinal et à s'orienter.

Les métabolites de l'acide arachidonique présentent de nombreuses propriétés pharmacologiques ayant un rôle dans l'expulsion des nématodes [62, 70] comme la contraction des muscles lisses (PGE-1, PGE-2 et PGF-2 $\alpha$ ), l'activation de l'agrégation plaquettaire (thromboxanes) ou son inhibition (PGI-2), l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la sécrétion de mucus (PGI2). Des expériences ont permis de confirmer le rôle de ces médiateurs [70] en analysant, tout d'abord, les effets de l'administration de PG exogènes sur l'expulsion de *Nippostrongylus brasiliensis* chez le rat, puis les effets de l'injection d'inhibiteurs de la synthèse et/ou de l'activation des PG tels que les anti-inflammatoires stéroïdiens ou non stéroïdiens et enfin, en évaluant les concentrations de PG endogènes présentes dans la lumière intestinale au cours de l'expulsion parasitaire. Les premiers résultats ont révélé que les PGE-1 et PGE-2 sont plus efficaces dans l'expulsion des nématodes que les PGA et PGB et que les PGF-1 $\alpha$  et -2 $\alpha$  n'ont aucune activité. La seconde série d'expériences a permis d'affirmer que les inhibiteurs des PG bloquent l'expulsion des nématodes et enfin la troisième série dont le but était de déterminer les quantités en PG par des méthodes radio-immunologiques, montrent que l'expulsion coïncide avec le pic de concentration en PGE et PGF. En ce qui concerne le rôle des amines, l'incubation de L4 de *Trichostrongylus colubriformis* dans un milieu riche en histamine et en sérotonine n'a aucun effet sur la capacité de *Trichostrongylus colubriformis* à parasiter son hôte ou sur son aptitude à la synthèse de l'acétylcholinestérase. Cependant, la sérotonine est responsable de la réduction d'excrétion en acide propionique par les nématodes et de la diminution de leur néoglucogénèse, indiquant de profondes lésions métaboliques chez la larve [102].



## 2.5 Conséquences de ces phénomènes inflammatoires au niveau systémique

### a La réaction inflammatoire systémique au cours de l'œstrose ovine

#### a.1 Mise en évidence de la participation d'inhibiteurs de protéases lors de myiases chez le mouton

La perturbation de l'homéostasie locale provoque la mise en place d'une réaction inflammatoire entraînant la fuite de protéines plasmatiques, d'eau et d'électrolytes. Ces fuites de protéines pourraient ainsi permettre le passage d'inhibiteurs plasmatiques des protéases tels que l' $\alpha$ -2-macroglobuline, l'anti-thrombine III et l' $\alpha$ -1-proteinase inhibitor ( $\alpha$ -1-PI).

L' $\alpha$ -2-M, comme nous l'avons vu précédemment, est responsable de l'inhibition de presque toutes les classes de protéases (sérine-, thiol-, carboxyl- et métallo-protéases) alors que l' $\alpha$ -1-PI inhibe principalement les sérine-protéases. Quant à l'AT-III, elle inhibe également les sérine-protéases mais son rôle principal réside dans l'inhibition de la thrombine, contrôlant ainsi le processus de coagulation. Les expériences menées *in vitro* par Bowles *et al.* [11] ont permis de confirmer cette hypothèse sur le modèle de la myiase à *Lucilia cuprina*. Ils ont isolé les trois inhibiteurs plasmatiques des protéases sus-citées de sérums de moutons et ont testé leur capacité à inhiber d'une part, les protéases de ce parasite, et d'autre part, la croissance larvaire.

La diffusion radiale sur gel de caséine a montré que l' $\alpha$ -2-M et l' $\alpha$ -1-PI étaient capables d'inhiber totalement ces protéases, alors que l'AT-III les inhibait partiellement. De plus, la croissance larvaire est inhibée *in vitro* par l' $\alpha$ -2-M et l'AT-III mais pas par l' $\alpha$ -1-PI. Enfin, le suivi des concentrations sériques en  $\alpha$ -2-M, au cours de l'infestation, a permis de révéler une augmentation significative [11].

Ces inhibiteurs semblent donc avoir un rôle très important d'une part dans le contrôle de l'inflammation de la peau associée à la myiase à *Lucilia cuprina* et d'autre part, dans l'inhibition de la croissance larvaire en interférant avec leur fonction de digestion.

#### a.2 Origine des protéines de l'inflammation

O'Meara *et al.* [94] ont réalisé l'analyse des exsudats de l'inflammation due à une infestation expérimentale à *Lucilia cuprina*, sur des lignées de moutons sensibles et résistantes. Après différentes récoltes à 6, 12, 18 et 24 heures, les exsudats ont été traités par électrophorèse bidimensionnelle et les différentes protéines présentes identifiées par immunoblotting. Entre 6 et 12 heures après l'infestation par les larves, les principales protéines retrouvées sont le Fb, la transferrine et des IgG. Puis la composition des exsudats se diversifie avec le temps et on peut voir apparaître de nombreuses protéines de la phase aiguë telles que l' $\alpha$ -1-AT, la Cp, le plasminogène, l' $\alpha$ -2-M et l' $\alpha$ -1-antichymotrypsine avec proportionnellement une faible concentration en albumine. Il faut noter que les exsudats des moutons résistants présentent plus de protéines et de façon plus précoce, ce qui suggère une réaction inflammatoire plus rapide et probablement

plus efficace dans la lutte contre le parasite.

L'origine de ces PPA est alors controversée : s'agit-il de synthèses locales (le plasminogène serait libéré par les cellules endothéliales et les macrophages locaux, l' $\alpha$ -2-M et la fraction C3 du complément par les monocytes et des sous-populations de lymphocytes B) ou du résultat de synthèses hépatiques ?

Les faibles concentrations en albumine par rapport aux concentrations sériques ainsi que la rapidité d'apparition des PPA seraient en faveur de productions locales. De plus, il a été démontré que l'albumine, la transferrine et les IgG étaient des constituants normaux apparaissant lors de sudation. Mais les petites quantités d'albumine pourraient également s'expliquer par une dégradation locale par les enzymes larvaires.

### **b La RI systémique au cours d'infestations par des strongles gastriques**

L'analyse des concentrations des constituants du plasma chez des agneaux infectés par des nématodes a révélé, au bout de trois semaines, l'apparition d'une hypophosphatémie accompagnée d'une hypoalbuminémie et, au bout de six semaines, l'apparition d'une hyperglobulinémie. Cependant aucune différence de concentration en calcium, urée et glucose entre les lots infectés et témoins n'a pu être détectée. L'inversion du rapport albumine/globuline n'est pas spécifique des helminthiases ; cependant l'hypoalbuminémie est le résultat de l'augmentation de la perméabilité mucoale. Les faibles concentrations en Ca et en P semblent être le résultat d'un phénomène de malabsorption causé par le parasitisme, l'intestin grêle étant le principal site d'absorption de ces minéraux [23].

Suite à cette étude, on a pu mettre en évidence les effets des nématodes (modèles : *T. circumcincta* et *H. contortus*) et des larves de diptères (modèle : *O. ovis*) sur l'orientation de la RI de l'hôte. La plupart du temps, il s'établit un équilibre entre l'hôte et le parasite, aboutissant à la limitation des populations parasites (cf. Tableau 2) ; lorsque cet équilibre est rompu, la "parasitisme-maladie" se déclare et d'importants signes cliniques peuvent apparaître, par exemple lors d'hæmonchose aiguë. Les moutons peuvent développer, suite à une ou plusieurs infestations, une résistance qui devient intéressante dans le cadre de la gestion des troupeaux. Cependant, des études ont montrées que des moutons résistants aux nématodes *T. circumcincta* et *H. contortus* étaient plus sensibles aux infestations par *Cestrus ovis* (c'est-à-dire hébergeaient plus de larves et développaient une RI locale plus importante) [130]. D'autres expériences, impliquant des co-infestations entre *Cestrus ovis* et *Trichostrongylus colubriformis* ou *Hæmonchus contortus* [129, 32], ont démontré que la présence de ces nématodes ne modifiait pas la biologie d'*Cestrus ovis* alors que la présence d'*Cestrus ovis* entraînait des diminutions significatives du nombre d'œufs excrétés, de la fécondité des vers ainsi que de la charge parasitaire totale. Ces changements macroscopiques s'accompagnent de modifications à l'échelle microscopique ; il semblerait que l'inflammation d'une muqueuse par un parasite donné entraîne une réaction à

distance sur la plupart des muqueuses de l'organisme. Ces observations nous mènent à essayer de comprendre les effets de mono- ou de poly-infestations sur certains marqueurs sanguins, judicieusement choisis, connus pour leur participation à de nombreux phénomènes inflammatoires.

Éléments de la RI	Type de parasites	
	<i>Cæstrus ovis</i>	Nématodes gastro-intestinaux
<b>Types de RI :</b>	Immunité naturelle [85], HS1 [29], TH2 ? [34]	Immunité naturelle [85], HS1 [56], TH2 [86]
<b>Activité cellulaire :</b> CPA  Cellules réactionnelles	cellules de Langerhans [34] GN, GE, GL, mastocytes [34] LT, LB, macrophages (?) [34]	cellules M, LB, [85] macrophages [85] GN, GE, GL, mastocytes [85] LT, LB, macrophages [85]
<b>Médiateurs chimiques :</b> Amines Protéases Minéraux Métabolites de l'acide arachidonique Protéines totales  Ig	histamine, sérotonine SMCP [33] <i>NO</i> · [43] ?  ?  IgA [34] IgE [91] IgG [96]	histamine, sérotonine SMCP [64] <i>Cl</i> <sup>-</sup> [85] LMI, SRS-A [37]  hyperglobulinémie, [23] hypoalbuminémie générales  IgA [86] IgE [56] IgG [80]
<b>Conséquences défavorables sur l'environnement du parasite :</b>	exsudats, altération muqueuse, ↗ perméabilité [33]	↗ mucus, ↗ motilité, ↘ pH, altération muqueuse [85]
<b>Echappement à la RI :</b>	↘ Ag ES [34], dégradation d'Ig (protéases) [104] ↗ ou ↘ <i>NO</i> · [43]	↘ Ag ES, dégradation d'Ig [86] recouvrement par Ac ou C3 [85]

TABLE 1 – Synthèse des éléments de la RI mis en œuvre lors d'infestations parasitaires.

Ac : anticorps, Ag ES : antigène d'excrétion / sécrétion,  $\alpha$ -1-AT :  $\alpha$ -1-antitrypsine, Cp : céruloplasmine, C3 : fraction 3 du complément, GL : globule leucocyte, GE : granulocyte éosinophile, GN : granulocyte neutrophile, HS1 : hypersensibilité de type 1, Ig : immunoglobuline, LMI : larval migratory inhibitor, LB : lymphocyte B, LT : lymphocyte T,  $\alpha$ -2-M :  $\alpha$ -2-macroglobuline, SMCP : sheep mast cell protease, SRS-A : slow reacting substance of anaphylaxis

Cellules effectrices	Médiateurs chimiques	Conséquences sur le parasite et sur l'environnement
	facteurs du complément (C3...) [85]	destruction enzymatique des parasites
<i>Mastocytes, GB, GL</i>	<p><b>Primaires :</b> histamine, héparine, protéases, facteurs chimiotactiques (GE, GN) [8, 86]</p> <p><b>Secondaires :</b> PAF, PG, TX, leucotriènes (LMI)</p> <p><b>SMCP</b> [64] <i>Cl</i><sup>-</sup> [86]</p>	<p>contraction des muscles lisses, modifications des cellules intestinales [63, 102], ↗ mucus [8], ↗ perméabilité vasculaire</p> <p>paralysie des vers, ↘ fécondité [36, 38]</p> <p>expulsion des parasites expulsion des parasites</p>
<i>GE</i>	<p><b>Primaires :</b> MBP, ECP, EPxO, EDN</p> <p><b>Secondaires :</b> leucotriènes, PAF... <b>IL-1, -8, TNF<math>\alpha</math></b></p>	<p>ADCC, destruction des stades larvaires [6, 13, 42, 49, 81]</p> <p>cytotoxicité, neurotoxicité ↗ métabolisme oxydatif [8]</p> <p>↗ mucus [8], contraction des muscles lisses,</p>
<i>LB</i>	<p><b>IgE</b> [8, 56] <b>IgG</b> (1 et 2) [80]</p> <p><b>IgA</b> [40, 114, 120]</p>	<p>ADCC [6], emprisonnement des parasites [86, 104, 124], paralysie des larves [37], ↘ développement, ↘ fécondité, ↘ métabolisme parasitaire</p>
<i>Cellules hépatiques (?)</i>	$\alpha$ -2-M, AT III, $\alpha$ -1-PI	↘ croissance larvaire, interférences avec la digestion [11]

TABLE 2 – Synthèse des mécanismes déployés par l'hôte conduisant à l'expulsion et à l'élimination de parasites extra-cellulaires ou à un ralentissement de leur développement.

AT-III : anti-thrombine-III, ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, C3 : fraction 3 du complément, ECP : eosinophil cationic protein, EDN : eosinophil derivated neurotoxin, EPxO : eosinophil peroxydase, GL : globe leucocyte, GE : granulocyte éosinophile, GN : granulocyte neutrophile, Ig : immunoglobuline, IL : interleukine, LMI : larval migratory inhibitor, LB : lymphocyte B,  $\alpha$ -2-M :  $\alpha$ -2-macroglobuline, MBP : major basic protein, PAF : platelet activating factor, PG : prostaglandine,  $\alpha$ -1-PI :  $\alpha$ -1-proteinase inhibitor, SMCP : sheep mast cell protease, TX : thromboxane, TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$ .



## Deuxième partie

### *2<sup>ème</sup>* partie : Etude expérimentale





# Chapitre I

## Matériel et méthodes

### A Animaux

Cette étude a été réalisée sur 36 agneaux, mâles, de 25-30 kg environ, âgés de trois à quatre mois, de race Tarasconaise, nés et élevés en bergerie et donc théoriquement indemnes de toute infestation parasitaire.

Huit jours avant le début des expériences, des échantillons de sang et de selles ont été prélevés sur chaque mouton, vermifugé par la suite avec de l'oxfendazole (Synantic<sup>ND</sup>, Merial) *per os* à la posologie de 5 mg/kg. Les moutons ont ensuite été séparés en six lots de six individus, répartis dans six boxes différents. Les différents lots ont été infestés selon le protocole présenté sur la figure 6. Les infestations par *Cestrus ovis* ont été réalisées successivement le 21 et le 28 novembre 2003 ainsi que le 5, le 12 et le 19 décembre 2003 (soit à J-0, J-7, J-14, J-21 et J-28) par instillation par voie nasale de 82 L1 *in toto* en suspension dans 1 mL de sérum physiologique, sur les lots notés OH, O et OT, respectivement infestés par *O. ovis* et *H. contortus*, par *O. ovis* et par *O. ovis* et *T. circumcincta*. De même, les infestations par les strongles digestifs, des espèces *Teladorsagia circumcincta* et *Hæmonchus contortus*, ont été réalisées respectivement le 8 et le 9 janvier 2004 (soit J-48 et J-49) sur les lots notés OT, T, OH et H, respectivement infestés par *O. ovis* et *T. circumcincta*, *T. circumcincta*, *O. ovis* et *H. contortus* et par *H. contortus*. Des larves L3 ont été administrés par voie orale à la dose de 5000 larves par animal. Le protocole expérimental est présenté sur la figure 6.

Les lots ainsi obtenus, comprenant chacun six individus, sont les suivants :

**lot OT :** infesté par *Cestrus ovis* et *Teladorsagia circumcincta* ;

**lot O :** infesté par *Cestrus ovis* ;

**lot OH :** infesté par *Cestrus ovis* et *Hæmonchus contortus* ;

**lot T :** infesté par *Teladorsagia circumcincta* ;

**lot H :** infesté par *Hæmonchus contortus* ;

**lot C :** non infesté, servant de lot contrôle.

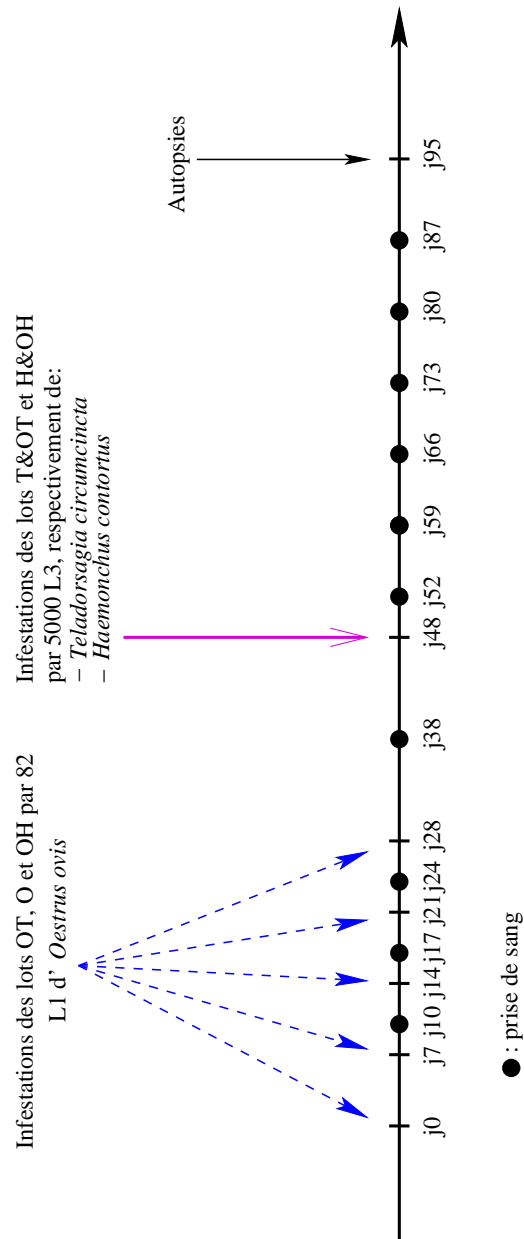


FIGURE 6 – Protocole d'administration des co-infestations parasitaires par *O. ovis*, *H. contortus* et *T. circumcincta*, chez des moutons mâles de race tarasconnaise. OT : lot infesté par *O. ovis* et *T. circumcincta*, O : lot infesté par *O. ovis*, OH : lot infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, T : lot infesté par *T. circumcincta*, H : lot infesté par *H. contortus* et C : lot contrôle. L1 : larve de premier âge d'*O. ovis* et L3 : larve de 3<sup>ème</sup> âge de strongles.

Les prélèvements ont été effectués de fin novembre 2003 à fin février 2004.

Des prises de sang ont été réalisées le lundi de chaque semaine du 17 novembre au 23 février. Les moutons ont été ponctionnés à la veine jugulaire, en alternant de côté chaque semaine, à l'aide d'aiguilles montées sur un système de *Vacutainer*<sup>ND</sup>. Le sang a été recueilli dans des tubes secs ou héparinés, mis au repos pendant 12 heures puis centrifugé à 300 g pendant dix minutes à 20°C. Le surnageant (sérum ou plasma) a été identifié, daté et conservé à -20°C. Des selles ont également été récupérées, par toucher rectal, 12 jours après les infestations par les strongles, puis deux fois par semaine jusqu'au jour du sacrifice. Les autopsies ont été réalisées le 24 février (J-95). Après fente longitudinale de la tête de chaque mouton, des larves d'*Cestrus ovis*, de différents stades, ont été recherchées après dissection soigneuse du septum, des cornets nasaux, de la lame criblée de l'éthmoïde et du sinus frontal. Afin de réaliser un comptage des larves de strongles infestantes, le contenu de l'abomasum a été lavé et filtré à 40  $\mu\text{m}$ . Ensuite, pour mettre en évidence les stades intra-tissulaires des nématodes, la muqueuse abomasale a été digérée par une solution acide de pepsine (37°C).

## B Analyses

Les dosages biochimiques réalisés (concentrations en Cp,  $\alpha$ -1-AT et en protéines totales) s'inscrivent dans une étude plus vaste réalisée par Terefe *et al.* [127], associant à des paramètres hématologiques, biochimiques (dosage du pepsinogène circulant) et histopathologiques de l'hôte, des paramètres concernant la morphologie et la physiologie des parasites étudiés.

### 1 Validation des infestations parasitaires

#### 1.1 Coproscopie

Les coproscopies ont été réalisées selon la méthode d'enrichissement par flottation en lame de Mac Master [101].

#### 1.2 Dosage du pepsinogène

Chaque sérum est acidifié avec de l'acide chlorhydrique et incubé pendant 12 heures à 37°C avec une solution d'albumine sérique bovine. La réaction est ensuite stoppée avec de l'acide trichloroacétique à 4%. Le mélange est centrifugé à 25 000 g pendant cinq minutes. On rajoute ensuite au surnageant de la soude à 0,25 M. L'incubation se fait à température ambiante pendant 30 minutes. La tyrosine ainsi libérée est estimée en lisant l'absorbance de la solution à 680 nm et la valeur est exprimée en mU/L de sérum.

### 1.3 Dosage des anticorps circulants anti-œstres et anti-strongles

Les anticorps dosés par la méthode ELISA (*Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*) sont des immunoglobulines G spécifiques de chaque parasite étudié.

#### a Dosage des Ac anti-œstres

Les antigènes d'*Œstrus ovis* sont préparés selon la méthode décrite par Yilma [131], à partir de larves L2 récemment collectées, lavées et homogénéisées dans une solution de phosphates tamponnée (PBS) à pH=7,2. L'ensemble est centrifugé à 10 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et la détermination de sa concentration en protéines est réalisée grâce à la technique de Lowry [78]. La méthode utilisée pour le dosage des Ac est identique à celle décrite par Papadopoulos *et al.* [96]. Les Ag décrits précédemment sont recouverts du sérum à tester, sur lequel on introduit un complexe enzyme/anti-Ig de moutons. L'enzyme utilisée est une peroxydase accompagnée d'un Ac anti-IgG de mouton (Sigma, Ref. A3415). La réaction est révélée avec du 2,2'-Azino-bis ou acide 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (Sigma USA, Ref. A9941). Les densités optiques sont lues à 405 nm à l'aide d'un lecteur ELISA (Dynatech) et les résultats sont exprimés en pourcentage de la DO d'un sérum de référence positif.

#### b Dosage des Ac anti-strongles

Les antigènes de strongles sont préparés à partir de vers adultes, mis à l'incubation toute une nuit à 37°C, dans une solution d'antibiotique et de PBS. Ensuite, les produits d'excrétion / sécrétion issus des vers sont collectés et centrifugés à 10 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Leur concentration en protéines est également déterminé par la méthode de Lowry. Le principe du dosage ELISA des Ac anti-strongles est le même que celui détaillé pour le dosage des Ac anti-œstres.

## 2 Mise en évidence de la réaction inflammatoire

### 2.1 Paramètres hématologiques

#### a Comptage des éosinophiles circulants

100  $\mu$ L de sang prélevé sur héparine sont mélangés à 900  $\mu$ L de solution de Carpenter et 10  $\mu$ L du mélange est introduit dans une cellule de comptage de type FAST READ 102 (ISL UK). Le dénombrement de ces cellules se réalise sur une grille contenant 1  $\mu$ L du mélange.

#### b Mesure de l'hématocrite

Une petite quantité de sang hépariné est prélevée grâce à des tubes capillaires et centrifugée à 14 500 g pendant deux minutes. L'hématocrite est obtenu en pourcentage de sang total.

## 2.2 Paramètres biochimiques

### a Dosage des protéines totales

#### a.1 Méthode physique : la réfractométrie

Avant chaque analyse, le sérum est décongelé à température ambiante et homogénéisé à l'aide d'un vortex. Le réfractomètre doit être étalonné régulièrement au cours de la manipulation avec de l'eau distillée. Les mesures se réalisent à température ambiante (*cf. supra*, p 29).

#### a.2 Méthode chimique : technique colorimétrique par le bleu de Coomassie

Un kit de dosage BIO-RAD, dont le principe a été précédemment présenté (*cf. supra*, p 28), est utilisé afin de réaliser cette série de mesures. Chaque sérum est au préalable dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée. A partir de deux mélanges de protéines standards, à 2000 et 500 mg/L (respectivement : Sigma USA, Ref. 610-200 et 610-50), les gammes étalons sont préparées à diverses concentrations (200 µg/L, 400 µg/L, 600 µg/L, 800 µg/L, 1000 µg/L et 1400 µg/L).

Le réactif coloré, contenant de l'acide phosphorique à 1,6 mol/L et du méthanol à 0,8 mol/L, est dilué au 1/5<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée de façon extemporanée. Aux 100 µL de chaque échantillon à analyser (sérum ou solution étalon), on ajoute dans un tube à essai 5 mL du réactif dilué comme décrit précédemment. Le tout est homogénéisé au vortex puis laissé au repos à température ambiante entre 5 et 60 minutes. La lecture de l'absorbance se réalise à 595 nm avec un spectrophotomètre de type SECOMAM.

### b Mise au point d'une méthode de dosage de la céruloplasmine chez les ovins

#### b.1 Principe

La concentration en céruloplasmine est estimée par l'activité oxydasique du sérum sur le N,N-diméthyl-p-phénylènediamine à un pH et une température où cette réaction est estimée maximale (T=37°C et pH=6,3 [14]).

Elle est exprimée en unité oxydasique par millilitre, une unité correspondant à la quantité de céruloplasmine qui provoque une augmentation d'absorbance de 0,01 par minute à 550 nm [17, 112].

#### b.2 Protocole

Le dosage de la céruloplasmine est effectué à 37°C. Le volume d'échantillon utilisé par analyse (sérum ou solution standard) est de 24 µL. L'échantillon est mélangé à 400 µL du réactif 1 (acétate de sodium 0,8 M, EDTA 0,5 mM, pH=9), auquel sont ajoutés, après trois minutes d'incubation, 200 µL du réactif 2 (para-phénylènediamine dichlorhydrate 27,6 mM). Le développement de la réaction est calculé à partir de deux lectures de densité optique à 550 nm, la première effectuée cinq minutes après l'adjonction du réactif 2, la seconde six minutes après la

première : cette variation de densité optique ( $\delta A = (A_2 - A_1) / 6$ , où 6 représente la durée totale de la réaction) est utilisée pour calculer l'activité oxydasique de la céruloplasmine, cette dernière étant déterminée, pour chaque lot de sérums (un lot représentant 36 sérums), d'après la relation linéaire reliant la variation de densité optique et la concentration en céruloplasmine (en U/mL) de la gamme étalon (*cf. infra*). Chaque échantillon est traité en double et un blanc réactif, contenant 12  $\mu\text{L}$  d'eau distillée, 400  $\mu\text{L}$  de réactif 1 et 200  $\mu\text{L}$  de réactif 2, est systématiquement réalisé pour chaque lot de sérum traité.

Les standards utilisés, obtenus à partir de céruloplasmine bovine à 2230 U/mL (Sigma, Ref. C-2026), ont été les suivants :

- S2 solution à 55,75 U/mL,
- S3 solution à 27,88 U/mL,
- S4 solution à 13,94 U/mL,
- S5 solution à 6,97 U/mL.

### b.3 Caractéristiques métrologiques de la méthode

L'ensemble des résultats expérimentaux est reporté dans l'annexe 2.

#### *Précision : répétabilité et reproductibilité*

Afin de déterminer la répétabilité de la méthode, c'est-à-dire la précision au sein d'une même série, on effectue dix mesures sur les quatre standards décrits précédemment ainsi que dix mesures sur deux échantillons S0 et S1 de concentration en  $C_p$  égale respectivement à 0 et 111,5 U/mL. Les résultats de variation d'absorbance sont présentés en annexe 2. Les coefficients de variation (CV) obtenus pour S1, S2 et S3 sont acceptables dans le cadre d'une mesure d'activité enzymatique et sont respectivement égaux à 5,6%, 19% et 25%, ce qui est comparable aux résultats obtenus dans une étude précédente menée par Chabornac *et al.* [17]. Les trois dernières solutions (soit S4, S5 et S0) présentent une activité enzymatique extrêmement faible, ce qui explique que l'on obtienne d'importants coefficients de variation. Ces derniers permettent ainsi d'évaluer l'imprécision de la méthode ; celle-ci varie entre 5,6% et 25% pour des concentrations s'échelonnant de 27,88 à 111,5 U/mL. Cela conduit à estimer l'intervalle de confiance à 95% (soit à 5% d'erreur). Pour les six solutions testées, on obtient respectivement, en terme de variation d'absorbance, les résultats suivants : [0,027; 0,033], [0,012; 0,026], [0,0045; 0,013], [-0,0012; 0,011], [-0,023; 0,0051] et [-0,0038; 0,0052].

#### *Domaine d'exploitation : minimum détectable et limite supérieure de linéarité*

Les variations d'absorbance mesurées relatives aux différentes dilutions (S1, S2, S3, S4, S5 et S0) sus-citées ont été reportées en annexe 2. En réalisant le graphique " $\delta A$  mesurée x 100 versus Concentration", défini par l'équation suivante :  $\delta A \cdot 100 = 0,03 \cdot \text{Concentration} - 0,01$ , on remarque que la relation entre ces deux paramètres n'est plus linéaire au-delà d'une concentration égale à 55,75 U/mL de  $C_p$ , ce qui constitue la limite supérieure de linéarité.

Pour déterminer la limite de détection, on a mesuré dix fois de suite la variation d'absorbance fournie par un échantillon dans lequel la concentration en Cp est nulle, c'est-à-dire de l'eau distillée. Les variations d'absorbance sont indiquées en annexe 2 et permettent d'obtenir l'intervalle de confiance suivant :  $[-0,0038; 0,0052]$ . Ainsi, il est possible de déduire le minimum détectable que constitue la borne inférieure de l'IC-95%, à savoir 0,2 U/mL.

Enfin, les valeurs du minimum détectable et de la limite supérieure de linéarité nous permettent de définir le domaine d'exploitation. Ce dernier est donc compris entre les concentrations suivantes (en U/mL) :  $[0, 2; 55, 75]$ .

### c Mise au point d'une méthode de dosage de l' $\alpha$ -1-AT chez les ovins

#### c.1 Principe

L' $\alpha$ -1-antitrypsine est une globuline prépondérante parmi les inhibiteurs de protéases. Le dosage à partir du plasma est basé sur la capacité de cette molécule à inactiver de façon dose-dépendante l'activité de la trypsine. La découverte de la spécificité d'action hydrolytique de la trypsine a permis d'utiliser des substrats synthétiques à base d'arginine et de lysine, tels que l' $\alpha$ -N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA). La mesure de l'activité antitrypsique se fait par lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 400 nm dont la variation dépend de l'intensité du chromogène libéré par l'excès de trypsine en contact avec le substrat [28, 27, 71, 72].

#### c.2 Protocole

Dans un premier temps, on réalise un mélange "sérum ou standard -trypsine" à partir d'1 mL de sérum dilué au  $1/100^{\text{ème}}$  et de 2 mL de solution de trypsine de pancréas bovins (Sigma, Ref. T-8253) à 40  $\mu\text{g/L}$  dans 40  $\mu\text{M}$  de *HCl*. Après incubation à température ambiante (de 5 à 15 minutes), 5 mL de solution de BAPNA (Sigma, Ref. B-4875) (BAPNA 0,92 mM, Tampon Tris 100 mM, *CaCl*<sub>2</sub> 20 mM, DMSO 1 M), préparée extemporanément, sont rajoutés à 1 mL du mélange "sérum-trypsine" ou "standard-trypsine". Après agitation et incubation pendant dix minutes à 37°C, on ajoute 1 mL d'acide acétique à 30% afin de stopper la réaction en cours. Les différents échantillons sont traités en double et un blanc réactif est systématiquement effectué, contenant 5 mL de la solution de BAPNA, 1 mL d'acide acétique à 30% et 1 mL du mélange "sérum-trypsine" ou "standard-trypsine" rajouté postérieurement. La lecture de l'absorbance se réalise à 400 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type SECOMAM. Les standards utilisés ont été des solutions d' $\alpha$ -1-AT de plasma humain à 10600 U/mg (Sigma, Ref. A-6150) correspondant à 0% (0 U/mL), 25% (1441,6 U/mL), 40% (2310,8 U/mL), 75% (4324,8 U/mL), 100% 55766,4 U/mL et 150% (8649,6 U/mL) d'inhibition. Les standards sont également dilués au  $1/100^{\text{ème}}$  avant chaque manipulation. Les solutions mères sont réparties en aliquotes de 220  $\mu\text{L}$ , volume nécessaire à chaque manipulation, et conservées à -20°C.

### c.3 Caractéristiques métrologiques de la méthode

L'ensemble des résultats expérimentaux est reporté dans l'annexe 2.

#### *Précision (répétabilité et reproductibilité)*

Afin de déterminer la répétabilité de la méthode, on effectue dix mesures sur les six standards décrits précédemment. On obtient ainsi, pour des pourcentages d'inhibition s'échelonnant entre 0 et 100%, des coefficients de variation (CV) variant de 1,5% à 6,2% et des IC-95%, sur des valeurs de variation d'absorbance, respectivement égaux à : [0, 2; 0, 25], [0, 19; 0, 21], [0, 16; 0, 18], [0, 1; 0, 13] et [0, 085; 0, 1].

#### *Domaine d'exploitation : minimum détectable et limite supérieure de linéarité*

Les variations d'absorbance mesurées relatives aux différentes concentrations sus-citées ont été reportées en annexe 2. En réalisant le graphique " $\delta A$  mesurée  $\times 100$  versus Concentration", défini par l'équation suivante :  $\delta A.100 = -0,0015.Concentration + 0,023$ , on remarque que la relation entre ces deux paramètres n'est plus linéaire au delà d'un pourcentage d'inhibition tryptique supérieur à 150%, ce qui constitue la limite supérieure de linéarité.

Pour déterminer la limite de détection, on a mesuré dix fois de suite la variation d'absorbance fournie par un échantillon dans lequel la concentration en  $\alpha$ -1-antitrypsine est nulle, c'est-à-dire de l'eau distillée.

Les variations d'absorbance sont indiquées en annexe 2. On obtient l'intervalle de confiance suivant : [0, 2; 0, 25]. Ainsi, il est possible de déduire le minimum détectable que constitue la borne inférieure de l'IC-95%, à savoir 20% d'inhibition tryptique.

Enfin, comme précédemment, les valeurs du minimum détectable et de la limite supérieure de linéarité nous permettent de définir le domaine d'exploitation. Ce dernier est compris entre les pourcentages d'inhibition tryptique suivants : [20%; 150%].

## 3 Analyses statistiques

La cinétique d'excrétion des œufs de strongles, le comptage des GE, les hématocrites, les concentrations en pepsinogène plasmatique ainsi que les dosages des Ac anti-strongles et anti-œstres ont été comparés entre les six lots d'agneaux grâce à une analyse de variance en données répétées (ANOVA, logiciel SYSTAT). Les 36 moutons étudiés représentant une population assez réduite, les signaux analytiques tels que les concentrations en Cp, en  $\alpha$ -1-AT et en protéines totales ont été analysés, d'une part avec un test non paramétrique de Mann et Whitney permettant d'obtenir des analyses inter- et intra-lots et d'autre part, avec une analyse de variance en données répétées (ANOVA, logiciel SYSTAT).



## Chapitre II

# Résultats

### A Confirmation des infestations parasitaires

La confirmation de l'ensemble des infestations parasitaires a été réalisée par Terefe *et al.* [127].

#### 1 Infestations par *Cestrus ovis*

Le contrôle de l'infestation par les œstres est obtenu grâce à des tests ELISA réalisés, dans un premier temps, à J-7 sur tous les moutons afin de connaître leur statut parasitaire. Parmi les 36 moutons nés et élevés en bergerie, un seul, faisant parti du lot contrôle, s'est révélé positif à 48,3% (seuil de positivité: 20%). Ce résultat a été confirmé chaque semaine jusqu'à l'abattage. Tous les moutons ont ensuite été testés toutes les semaines confirmant ainsi que les lots OT, O et OH étaient bien infestés par *Cestrus ovis* (cf. Figure 7) et que les lots T et H, uniquement infestés par les strongles, étaient restés indemnes tout au long de l'expérience. Cependant, deux moutons appartenant au lot H (3072 et 3037) et un mouton appartenant au lot T (3153) ont présenté une séroconversion au moment de l'infestation par les strongles et sont restés positifs jusqu'au jour de l'abattage. Ces infestations inattendues ont été confirmées le jour de l'autopsie par la présence de larves de premier âge d'*Cestrus ovis*.

Les résultats individuels des sérologies (cf. Figure 7) ont révélé que les lots non infestés par *Cestrus ovis* (lots H et C) sont restés significativement séronégatifs dans le temps malgré les infestations du mouton 3009 appartenant au lot C et des moutons 3072 et 3037 appartenant au lot H. Le lot T est également resté significativement séronégatif malgré l'augmentation de la concentration moyenne en IgG à J-67 (soit 39 jours après la cinquième infestation par les œstres). A partir de J-25, les lots OH, OT et O ont vu leurs concentrations en Ac anti-œstres augmenter pour devenir significativement supérieures à celles du lot C ( $p < 0,05$ ) et ceci jusqu'à la fin de l'expérience à J-95. Quel que soit le lot infesté par *O. ovis*, le maximum des quantités en IgG a été atteint à J-95. Le lot OH a présenté une séroconversion à partir de J-39 (soit onze

jours après la dernière infestation) et à cette même date, la différence est apparue significative par rapport à J-4 ( $p < 0,01$ ). La progression des quantités d'Ac a ensuite été très importante et continue jusqu'au jour de l'autopsie. En comparaison, le lot O a présenté une progression plus lente et sa séroconversion n'a été remarquable qu'à J-67, date à laquelle les pourcentages ELISA deviennent supérieurs à 20%. La cinétique de ce même lot est restée significativement inférieure à celle du lot OH à partir de J-11 (soit quatre jours après la deuxième infestation) et jusqu'à J-95 ( $p < 0,01$ ). Le lot OT, ayant reçu aux mêmes dates les mêmes quantités de larves d'*Æstrus ovis* que les lots OH et O, a montré un résultat séropositif à partir de J-60 ( $p < 0,05$ ). La cinétique du lot OT est restée inférieure à celle du lot OH et de façon significative à J-81 ( $p < 0,05$ ), seule date à laquelle les quantités en Ac anti-œstres ont été inférieures à celles du lot O.

L'ensemble des infestations sus-citées a été contrôlé *a posteriori* par le comptage des larves à l'autopsie. Les lots OH, OT et O ont présenté une forte proportion de larves L1 (respectivement 87,2%, 84,0% et 86,0%) tandis que les quantités en L2 et en L3 ont plafonné respectivement à 12,8%, 16,0% et 14,0%. De plus, aucune différence significative entre les nombres totaux de larves n'a pu être mise en évidence (cf. Tableau 3). Enfin, il a été possible d'établir une corrélation entre les quantités d'IgG anti-œstres produites et le nombre total de larves retrouvées à l'autopsie (cf. Tableau 4). Ces analyses ont ainsi révélé qu'un animal largement infesté par *O. ovis*, ayant un fort pourcentage d'installation de larves, présentait de fortes concentrations en Ac ; à l'inverse, des animaux faiblement parasités présentaient de faibles pourcentages au test ELISA. Ainsi, sur les cinq moutons présentant un nombre important d'œstres, trois avaient un pourcentage ELISA supérieur à 70% et les deux autres obtenaient un pourcentage entre 50 et 70%. Quant aux cinq moutons présentant de faibles quantités de larves, tous obtenaient un pourcentage ELISA compris entre 20 et 50%.

## 2 Infestations par *Teladorsagia circumcincta* et *Hæmonchus contortus*

Les coproscopies, réalisées sur les 36 moutons à partir de J-48 (jour de l'infestation par les strongles), puis tous les quatre jours jusqu'au jour du sacrifice, montrent que les lots OT, OH, T et H étaient bien porteurs de strongles suite aux infestations expérimentales et que les lots O et C étaient restés indemnes pendant toute la période expérimentale (cf. Tableau 5). En ce qui concerne les lots OH et H, des œufs d'*H. contortus* sont apparus dans les fèces à partir de J-67 (soit 19 jours après les infestations). Entre J-74 et J-95, le nombre d'œufs par gramme de selles pour le lot OH n'a subi que de très légères variations, non significatives. A l'inverse, de très importants changements ont pu être observés pour le lot H, montrant une augmentation progressive mais très nette. De plus, des différences significatives ont été mises en évidence entre ces deux lots, sur la période allant de J-67 à J-95, jour où l'on obtient un maximum d'œufs dans les fèces ( $p < 0,05$ ). Pour les lots OT et T, les œufs de *T. circumcincta* sont apparus un peu plus précocement que ceux d'*H. contortus*, à partir de J-64, et les résultats ont présenté un

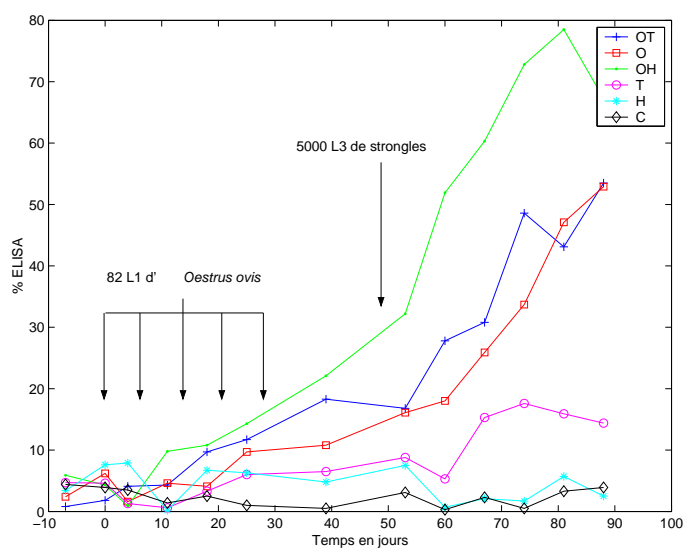


FIGURE 7 – Evolution de la concentration moyenne en IgG anti-*Oestrus ovis* (% ELISA), pour chaque lot, au cours du temps. OT : lot infesté par *O. ovis* et *T. circumcincta*, O : lot infesté par *O. ovis*, OH : lot infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, T : lot infesté par *T. circumcincta*, H : lot infesté par *H. contortus* et C : lot contrôle. L1 : larve de premier âge d'*O. ovis* et L3 : larve de 3<sup>ème</sup> âge de strongles.

	nombre (et %) de larves			
	L1	L2	L3	total (L1+L2+L3)
lot OT	14,8 ± 7,2 (84,0%)	1,5 ± 1,1 (8,6%)	1,3 ± 0,4 (7,4%)	17,7 ± 5,3
lot O	13,5 ± 5,0 (86,0%)	1,2 ± 0,6 (7,6%)	1,0 ± 0,5 (6,4%)	15,7 ± 5,8
lot OH	25,3 ± 5,3 (87,2%)	2,3 ± 1,4 (8,0%)	1,3 ± 0,5 (4,8%)	29,0 ± 7,9
lot T	1,3 ± 0,9 (76,5%)	0 (0%)	0,3 ± 0,3 (23,5%)	1,7 ± 1,2
lot H	7,0 ± 4,8 (87,5%)	0,3 ± 0,3 (3,7%)	0,7 ± 0,4 (8,8%)	8,0 ± 5,3
lot C	3,0 ± 3,0 (93,8%)	0 (0%)	0,2 ± 0,2 (6,2%)	3,2 ± 3,2

TABLE 3 – Moyenne (± erreur standard) et pourcentage du comptage de larves d'*Oestrus ovis* à l'autopsie (J-95) pour chaque lot. OT : lot infesté par *O. ovis* et *T. circumcincta*, O : lot infesté par *O. ovis*, OH : lot infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, T : lot infesté par *T. circumcincta*, H : lot infesté par *H. contortus* et C : lot contrôle. L1 : larves de premier âge, L2 : larves de deuxième âge, L3 : larves de troisième âge.

profil différent avec un pic marqué à J-74 suivi d'une diminution progressive jusqu'à J-88 et un léger rebond à J-95. Des différences significatives entre ces deux lots sont ressorties à J-67 et à J-81 (respectivement  $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ ).

Les dosages des Ac anti-strongles sont également venus conforter les résultats des coproscopies et ont révélé que les lots O et C étaient restés séronégatifs tout au long de la période expérimentale ( $p < 0,01$ ). Les concentrations en Ac spécifiques anti-*Hæmonchus contortus* ont commencé à augmenter seulement deux semaines après les infestations, pour les lots H et OH, et, au terme de ces augmentations progressives, un pic a été atteint à J-95. Aucune différence significative des concentrations en IgG n'a pu être mise en évidence entre les lots H et OH.

Les autopsies ont également constitué un moyen de confirmer le bon établissement des strongles de l'espèce *Hæmonchus contortus* (dans leurs phases intra-luminale et intra-tissulaire) et ont permis d'établir les proportions en larves L4 et en adultes (cf. Tableau 6), montrant ainsi une large prédominance des stades adultes (aucune larve de troisième âge n'a été mise en évidence). Aucune différence significative dans le nombre de parasites (larves et adultes) n'a été décelée entre les lots OH et H et les lots OT et T.

Le suivi des concentrations plasmatiques en pepsinogène a également permis de confirmer les infestations par les strongles gastriques et les résultats sont reportés sur la figure 8. Les lots O et C ont présentés une faible concentration en pepsinogène plasmatique tout au long de l'expérience. Le lot OH a présenté une augmentation lente et progressive de la concentration moyenne en pepsinogène plasmatique à partir de J-48 (jour de l'inoculation de 5000 L3 d'*Hæmonchus contortus*) jusqu'à J-95. Les quantités moyennes en pepsinogène du lot H ont présenté une importante augmentation entre J-53 et J-67 suivie par un retour rapide aux valeurs initiales entre J-74 et J-95. Aucune différence significative n'a été obtenue entre les deux lots infestés par *H. contortus*. En ce qui concerne les lots OT et T infestés par *T. circumcincta*, on a pu aisément remarquer que leurs concentrations en pepsinogène étaient restées significativement supérieures à celles des lots OH et H entre J-60 et J-74 (avec  $p < 0,01$  pour le lot T et  $p < 0,05$  pour le lot OT). Bien que la cinétique du lot T soit restée supérieure à celle du lot OT entre J-60 et J-95, il n'est apparu aucune différence significative. L'augmentation de ces concentrations a été très sévère pour les lots T et OT entre J-53 et J-67 (soit respectivement 5 et 19 jours après les infestations par les strongles) et suivie par une décroissance progressive jusqu'à J-95. Aucune corrélation entre les concentrations en pepsinogène plasmatique et les coproscopies n'a pu être mise en évidence.

lot	n° animal	nombre total de larves	% d'installation	% ELISA
lot OT	3144	42	51,2	67,7
	3063	21	25,6	54,7
lot O	4717	44	53,7	125,9
lot OH	3012	55	67,1	103,7
	3103	41	50	84,5
lot OT	2151	7	11	21,3
	0899	6	7,3	48,9
lot O	3084	7	8,5	30,9
	4466	12	14,6	21,7
lot OH	4713	2	2,4	16

TABLE 4 – Relation entre le pourcentage d'installation, le nombre total de larves d'*Cestrus ovis* et le pourcentage ELISA pour 5 moutons présentant un fort pourcentage ELISA et 5 moutons présentant un faible pourcentage ELISA, à J-95.

OT : lot infesté par *O. ovis* et *T. circumcincta*, O : lot infesté par *O. ovis*, OH : lot infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, T : lot infesté par *T. circumcincta*, H : lot infesté par *H. contortus* et C : lot contrôle.

	nombre d'œufs par gramme de fèces							
	J-48	J-53	J-60	J-67	J-74	J-81	J-88	J-95
lot OT	0	0	0	608 ± 442	1125 ± 401	425 ± 210	192 ± 171	450 ± 202
lot O	0	0	0	0	0	0	0	0
lot OH	0	0	0	458 ± 368	6500 ± 3356	6392 ± 2893	7025 ± 2876	10192 ± 2054
lot T	0	0	0	1792 ± 958	2158 ± 1370	883 ± 160	375 ± 186	642 ± 460
lot H	0	0	0	1900 ± 1652	12383 ± 4088	14825 ± 8422	12700 ± 5066	16783 ± 3964
lot C	0	0	0	0	0	0	0	0

TABLE 5 – Résultat des coproscopies pour les strongles *T. circumcincta* et *H. contortus* en nombre d'œufs par gramme de fèces (moyenne ± écart-type). OT : lot infesté par *O. ovis* et *T. circumcincta*, O : lot infesté par *O. ovis*, OH : lot infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, T : lot infesté par *T. circumcincta*, H : lot infesté par *H. contortus* et C : lot contrôle.

	L4 (nombre)	adultes (nombre)	total (=L4+adultes) (nombre)
lot OT	0,3 ± 0,2	191,2 ± 21,0	191,5 ± 20,9
lot O	0	0	0
lot OH	1,0 ± 0,7	2893,3 ± 351,0	2894,3 ± 351,0
lot T	0	111,3 ± 35,4	111,3 ± 35,4
lot H	0,2 ± 0,2	2986,2 ± 182,8	2986,3 ± 182,7
lot C	0	0	0

TABLE 6 – Moyenne (± erreur standard) du comptage de larves de strongles pour chaque lot à l'autopsie (J-95). L4 : larves de quatrième âge. OT : lot infesté par *O. ovis* et *T. circumcincta*, O : lot infesté par *O. ovis*, OH : lot infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, T : lot infesté par *T. circumcincta*, H : lot infesté par *H. contortus* et C : lot contrôle.

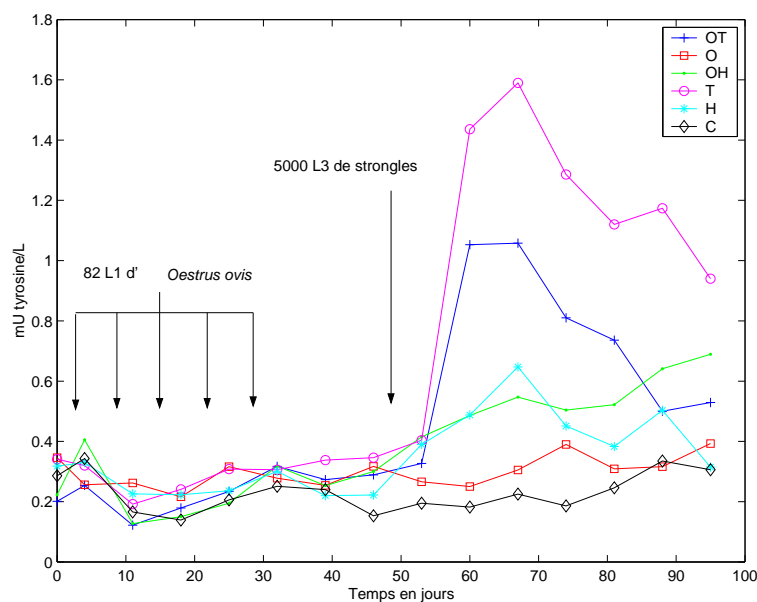


FIGURE 8 – Evolution de la concentration moyenne en pepsinogène sérique, en mU tyrosine/L, pour chaque lot, au cours du temps. OT : lot infesté par *O. ovis* et *T. circumcincta*, O : lot infesté par *O. ovis*, OH : lot infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, T : lot infesté par *T. circumcincta*, H : lot infesté par *H. contortus* et C : lot contrôle. L1 : larve de premier âge d'*O. ovis* et L3 : larve de 3<sup>ème</sup> âge de strongles.

## B Réactions organiques face aux différentes infestations

### 1 Comptage éosinophilique et hématoците

Ces deux paramètres sont restés stables pour les six moutons du lot contrôle tout au long de l'expérience. Les résultats du suivi cinétique du comptage éosinophilique sont présentés dans la figure 9. On a pu mettre en évidence que le nombre de GE évoluait similairement pour tous les lots infestés par *O. ovis*, entraînant une importante distinction par rapport aux lots non infestés par ces larves de diptères, 3 jours seulement après la première infestation ( $p < 0,01$ ). Ainsi, les quantités en GE ont atteint un maximum à J-18 (soit quatre jours après la troisième infestation). Après cette date, les quantités en GE se sont effondrées jusqu'à J-39. Par la suite et jusqu'à J-88, les pourcentages en GE du lot O sont restés stables mais significativement supérieurs au lot contrôle ( $p < 0,01$ ). Les lots infestés à la fois par les strongles et par *Æstrus ovis* (lot OH et lot OT) ont présenté le même profil avec un second pic à J-60 (soit douze jours après l'inoculation des strongles digestifs). Au même moment, des pics de plus faible intensité ont été observés pour les lots uniquement infestés par les strongles (lots T et H). En comparant avec les lots OT et OH, on a pu mettre en évidence de grandes différences significatives dans le comptage éosinophilique ( $p < 0,001$ ). La diminution du nombre de GE s'est amorcée pour tous les lots dès J-60, avec un léger retard pour le lot H (J-67), pour atteindre des valeurs semblables à celles du lot contrôle le jour de l'autopsie. Des valeurs supérieures en GE ont été observées pour les lots OH par rapport au lot H à J-81 et J-88 ( $p < 0,05$ ). Enfin, quel que soit le lot pris en compte, les quantités en GE avant et après chaque infestation sont apparues hautement significatives ( $p < 0,001$ ).

En ce qui concerne l'hématoците, dont l'évolution est représentée sur la figure 10, on a pu observer un décrochage net, pour les lots OH et H, à partir de J-67 (soit 19 jours après l'infestation par les strongles), par rapport aux autres lots non infestés par *Hæmonchus contortus* ( $p < 0,01$ ); la décroissance progressive a été présente jusqu'à J-95 (date de l'autopsie), moment où l'on a obtenu un hématoците moyen final inférieur à 50% de la valeur initiale. Malgré l'évolution similaire de ces deux cinétiques, les hématoцитес moyens du lot OH sont restés significativement supérieurs aux hématoцитес moyens du lot H ( $p < 0,01$ ) sur la période allant de J-67 à J-95. En ce qui concerne les lots OT et T infestés par *Teladorsagia circumcincta* à J-48, le décrochage n'est apparu qu'à partir de J-81 (soit 33 jours après les infestations parasitaires) et la décroissance a eu lieu jusqu'à J-95 ( $p < 0,05$ ). Cette diminution des hématoцитес a été de plus faible intensité que pour les lots OH et H. Ainsi, les hématoцитес moyens du lot T sont restés significativement plus élevés entre J-67 à J-95 que les hématoцитес moyens des lots H et OH ( $p < 0,01$ ). Ceux du lot OT ont été significativement différents de ceux du lot H ( $p < 0,05$ ) entre J-67 et J-95. Cependant, aucune différence n'est ressortie par rapport aux valeurs du lot OH.

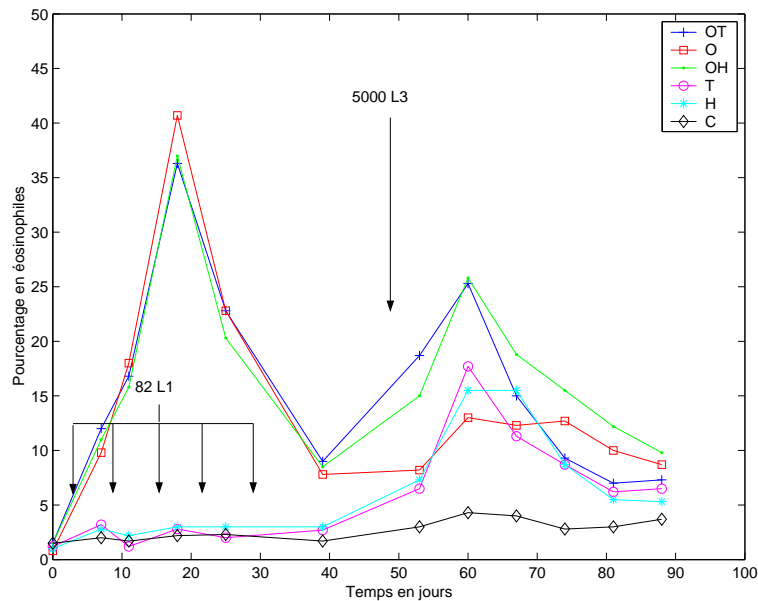


FIGURE 9 – Evolution de l'éosinophilie sanguine moyenne, en pourcentage, pour chaque lot, au cours du temps. OT: lot infesté par *O. ovis* et *T. circumcincta*, O: lot infesté par *O. ovis*, OH: lot infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, T: lot infesté par *T. circumcincta*, H: lot infesté par *H. contortus* et C: lot contrôle. L1: larve de premier âge d'*O. ovis* et L3: larve de 3<sup>ème</sup> âge de strongles.

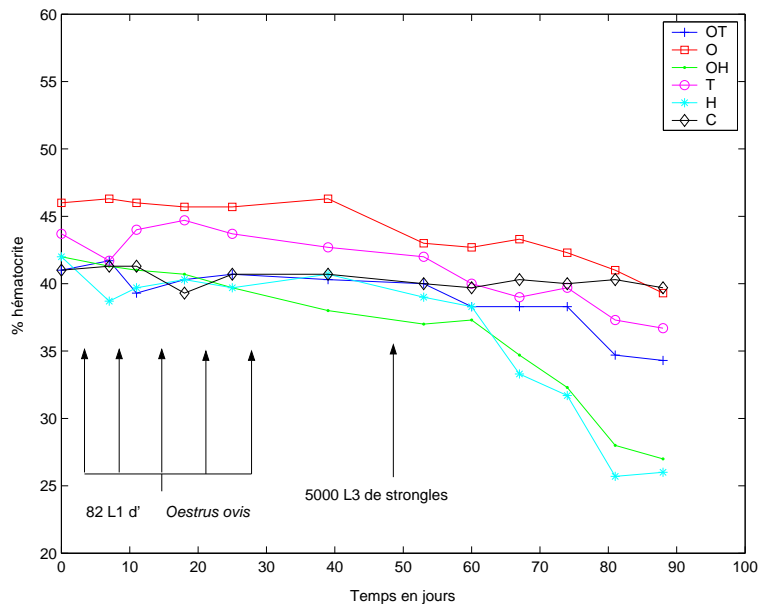


FIGURE 10 – Evolution de l'hématocrite moyen, en pourcentage, pour chaque lot, au cours du temps. OT: lot infesté par *O. ovis* et *T. circumcincta*, O: lot infesté par *O. ovis*, OH: lot infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, T: lot infesté par *T. circumcincta*, H: lot infesté par *H. contortus* et C: lot contrôle. L1: larve de premier âge d'*O. ovis* et L3: larve de 3<sup>ème</sup> âge de strongles.



## 2 Protéines totales : dosage par réfractométrie et par le bleu de Coomassie

### 2.1 Résultats obtenus par réfractométrie

Les résultats des protéinémies exprimées en g/L sont indiqués sur la figure 11. La protéinémie moyenne du lot contrôle est restée constante au cours de la période expérimentale, donnant les valeurs extrêmes. Aucune modification du profil du suivi cinétique de la protéinémie n'a été observée jusqu'à J-39 (ce qui correspond à dix jours après la dernière infestation par *O. ovis*). A cette date, comme le montre la figure 12, les lots O et OH ont présenté une augmentation significative par rapport aux lots T et C non infestés jusqu'à cette date ( $p < 0,05$  et  $< 0,01$  pour le lot O et le lot OH respectivement). Le lot OT, ayant reçu la même charge parasitaire, n'a présenté aucune modification significative et l'allure de la courbe est restée semblable à celle des lots T, H et C, pouvant être considérés comme un même grand lot jusqu'à J-48 (date d'infestation par les strongles). On a observé par la suite un décrochage à J-67 (soit 19 jours après les infestations par les strongles) pour les lots OH et H, beaucoup plus important pour ce dernier. Pour le lot H, les valeurs à J-67, -74, -81 et -88 (soit respectivement 19, 26, 33 et 40 jours après les infestations par les strongles) sont devenues significativement inférieures à celle de J-59 (soit onze jours après les infestations par les strongles) ( $p < 0,01$ ) et cette diminution a été significative par rapport au lot contrôle ( $p < 0,01$ ) à partir de J-60. Pour le lot OH, cette diminution n'est apparue significative qu'à J-88 ( $p < 0,05$ ). Enfin, si on considère deux grands lots jusqu'à J-48, il est ressorti qu'à J-39 ( $p < 0,05$ ), le lot considéré comme infesté par *Cæstrus ovis*, regroupant les lots OT, O et OH, avait une protéinémie significativement supérieure au lot considéré comme témoin, constitué par les lots T, H et C.

### 2.2 Résultats obtenus par le bleu de Coomassie

Les résultats expérimentaux des protéinémies, obtenus par dosage au Bleu de Coomassie, exprimées en g/L sont indiqués sur la figure 13. Cette technique chimique, utilisant le colorant bleu de Coomassie, vient conforter les résultats obtenus avec la réfractométrie, notamment en ce qui concerne la période s'étalant de J-67 à J-88. En effet, on a retrouvé un décrochage identique significatif du lot H par rapport au lot C à J-67, J-81 et à J-88 ( $p < 0,01$  pour J-67 et J-81 et  $p < 0,05$  pour J-88). Ce décrochage a été également remarquable par rapport aux lots OT et O, respectivement à J-74-J-81 et à J-81-J-88 ( $p < 0,05$ ). Le suivi cinétique de ce même lot était en adéquation avec les résultats précédents avec une diminution progressive significative ( $p < 0,01$ ) entre J-60 et J-81. Si les analyses statistiques de Mann et Withney n'ont pas permis de confirmer ce décrochage pour le lot OH par rapport au lot contrôle, elles ont mis en évidence une légère diminution significative ( $p < 0,05$ ) des valeurs moyennes de la protéinémie entre J-67 et J-81. Ces analyses ont également révélé une protéinémie moyenne du lot O supérieure à celle du lot C à J-18 et à J-11 (soit, respectivement, quatre jours après la troisième infestation et quatre jours après la deuxième infestation par *O. ovis*) (respectivement  $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ ). Enfin, la dichoto-

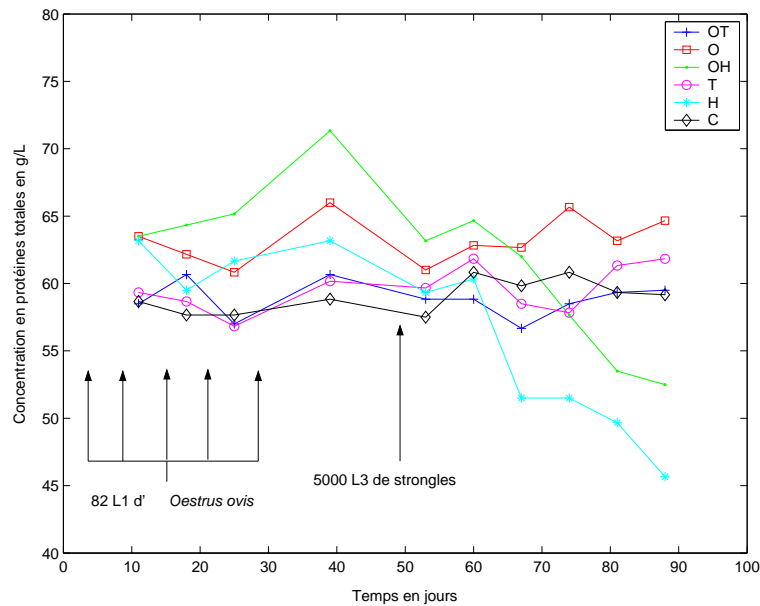


FIGURE 11 – Concentration moyenne en protéines totales, en g/L, pour chaque lot, en fonction du temps (méthode : réfractométrie). OT: lot infesté par *O. ovis* et *T. circumcincta*, O: lot infesté par *O. ovis*, OH: lot infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, T: lot infesté par *T. circumcincta*, H: lot infesté par *H. contortus* et C: lot contrôle. L1: larve de premier âge d'*O. ovis* et L3: larve de 3<sup>ème</sup> âge de strongles.

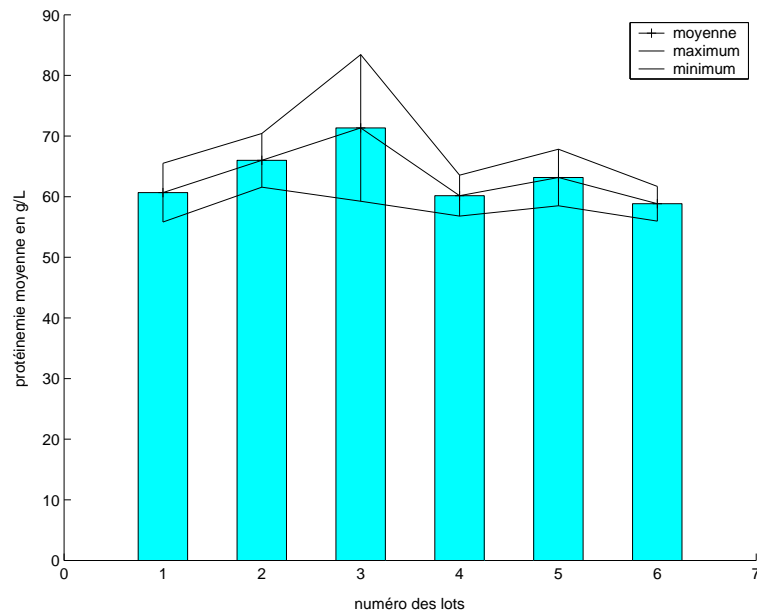


FIGURE 12 – Concentration moyenne (et valeurs extrêmes) en protéines totales, en g/L, pour chaque lot, à J-39 (méthode : réfractométrie). lot 1: lot OT infesté par *O. ovis* et *T. circumcincta*, lot 2: lot O infesté par *O. ovis*, lot 3: lot OH infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, lot 4: lot T infesté par *T. circumcincta*, lot 5: lot H infesté par *H. contortus*, lot 6: lot contrôle.

mie en deux grands lots, infesté et témoin, dans ce cas-là, n'a laissé percevoir aucune différence significative.

De plus, on a pu mettre en évidence une corrélation positive significative ( $r=0,546$ ,  $p<0,01$ ) entre les résultats des protéinémies individuelles obtenues par la réfractométrie et celles obtenues par la technique utilisant le bleu de Coomassie.

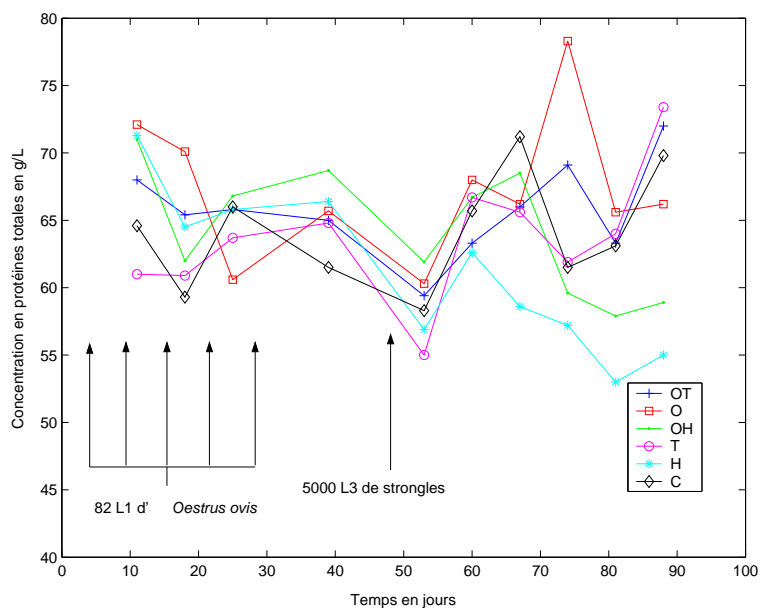


FIGURE 13 – Concentration moyenne en protéines totales, en g/L, pour chaque lot, en fonction du temps (méthode : bleu de Coomassie). OT : lot infesté par *O. circumcincta* et *T. circumcincta*, O : lot infesté par *O. ovis*, OH : lot infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, T : lot infesté par *T. circumcincta*, H : lot infesté par *H. contortus* et C : lot contrôle. L1 : larve de premier âge d'*O. ovis* et L3 : larve de 3<sup>ème</sup> âge de strongles.

### 3 Dosage de la céruloplasmine

Les résultats sont regroupés dans le tableau 7, représentant les moyennes ainsi que les déviations standards associées, calculées tous les sept jours entre J-11 et J-88, pour chaque lot. Dans un premier temps, on a pu mettre en évidence une légère augmentation significative par rapport au lot C de la concentration plasmatique en céruloplasmine à J-11 et J-18 pour les lots O et OH, tous deux infestés par *Oestrus ovis* ( $p<0,05$ ). Une augmentation plus marquée a été observable à J-39 (soit 11 jours après la dernière infestation par *O. ovis*) pour les lots OT et OH ( $p<0,05$ ) et à J-53 (soit cinq jours après les infestations par les strongles) pour le lot O ( $p<0,05$ ), la réponse apparaissant plus tardivement que pour les GE. De plus, il est ressorti que les lots OT et OH avaient une céruloplasminémie moyenne significativement supérieure au lot H à J-39 ( $p<0,05$ ). En considérant les deux grands lots décrits précédemment, il est apparu une différence significative ( $p<0,01$ ) à J-39, le "lot infesté" ayant une concentration en céruloplasmine plasmatique supérieure au "lot témoin". Au cours de la période de J-60 à J-67 (c'est-à-dire les

12 à 20 jours suivant les infestations par les strongles), une diminution significative des concentrations en céruloplasmine était comparable pour tous les lots ( $p < 0,05$ ), avec apparition d'un rebond général, consécutif à l'infestation par les strongles, à J-74. Enfin, les lots H et T n'ont présenté aucune variation notable de leur céruloplasminémie par rapport au lot C. Il est également important de remarquer que le lot C n'est pas resté stable et a subi les mêmes influences avec une augmentation entre J-39 et J-53 et une diminution à J-67.

En réalisant un tableau de corrélation entre les résultats des tests ELISA (IgG anti-œstres) et la concentration en Cp obtenue à J-53 (cf. Tableau 9), il est ressorti que des animaux infestés par *O. ovis* et présentant d'importantes quantités d'Ac anti-œstres avaient une céruloplasminémie élevée et inversement. Ainsi, sur les cinq moutons présentant un pourcentage ELISA supérieur à 20%, trois possédaient une concentration en Cp plasmatique supérieure ou égale à 50 U/mL et les deux autres avaient une céruloplasminémie comprise entre 39 et 49 U/mL. Quant aux cinq moutons présentant des pourcentages ELISA faibles (inférieurs à 20%), tous obtenaient des valeurs de Cp plasmatique inférieures à 30%. Ainsi, ces corrélations ont permis de mettre en évidence que malgré les fortes variations des résultats des pourcentages ELISA, les concentrations en Cp ne présentaient que très peu de dispersion.

#### 4 Dosage de l' $\alpha$ -1-antitrypsine

Comme le montre le tableau 8, les valeurs de chaque lot ont révélé une grande dispersion. Cette observation a été également constatée pour le lot C qui a présenté des fluctuations tout aussi importantes. Il n'est apparu aucune différence significative entre chaque lot et le temps ne semble avoir eu aucune conséquence sur l'activité anti-trypsique de chaque sérum.

### C Corrélation entre les différents marqueurs analysés

Les coefficients de corrélation reliant les différentes variables étudiées précédemment ont été calculés à partir du suivi des résultats obtenus de J-11 à J-88. Les valeurs de l'hématocrite et de la protéinémie (par réfractométrie) présentent une corrélation positive modérée ( $r = 0,286$ ,  $p < 0,01$ ) ; cette corrélation est non significative lorsqu'on considère les valeurs de protéinémie obtenues par la méthode BIO-RAD. Aucune autre corrélation n'apparaît significative entre les différents paramètres sanguins étudiés. Si on prend en compte le dénombrement des œufs de strongles dans les fèces, il en ressort des corrélations significatives avec certains paramètres sanguins. Ainsi, les coproscopies sont modérément corrélées ( $p < 0,01$ ) aux dosages des protéines totales, quelle que soit la méthode de dosage employée ( $r = 0,480$  pour la réfractométrie et  $r = 0,323$  pour la méthode utilisant le bleu de Coomassie,  $p < 0,01$ ) et corrélées négativement avec les hématocrites ( $r = -0,589$ ,  $p < 0,01$ ).

	Concentration sérique en Cp (U/mL)									
	J-11	J-18	J-25	J-39	J-53	J-60	J-67	J-74	J-81	J-88
OT	27,0 ± 3,5 <sup>b</sup>	27,3 ± 3,3 <sup>b</sup>	28,0 ± 4,7 <sup>b</sup>	42,0 ± 8,8 <sup>c</sup>	39,5 ± 8,3 <sup>c</sup>	34,1 ± 6,6 <sup>c</sup>	20,3 ± 3,0 <sup>a</sup>	32,9 ± 4,6 <sup>b</sup>	29,1 ± 4,1 <sup>b</sup>	32,7 ± 6,5 <sup>b</sup>
O	32,0 ± 3,2 <sup>b</sup>	29,0 ± 4,8 <sup>b</sup>	28,8 ± 2,8 <sup>b</sup>	33,1 ± 4,3 <sup>c</sup>	40,8 ± 7,1 <sup>c</sup>	32,0 ± 3,5 <sup>b</sup>	18,8 ± 2,2 <sup>a</sup>	31,1 ± 3,3 <sup>b</sup>	26,1 ± 1,9 <sup>b</sup>	33,0 ± 5,0 <sup>b</sup>
OH	30,0 ± 3,2 <sup>b</sup>	33,0 ± 2,5 <sup>b</sup>	31,7 ± 2,0 <sup>b</sup>	44,0 ± 6,3 <sup>c</sup>	46,2 ± 5,8 <sup>c</sup>	31,8 ± 2,7 <sup>b</sup>	22,8 ± 2,2 <sup>a</sup>	35,3 ± 3,8 <sup>b</sup>	27,3 ± 1,9 <sup>b</sup>	31,1 ± 1,8 <sup>b</sup>
T	28,5 ± 4,4	26,7 ± 4,0	28,9 ± 3,2	33,7 ± 5,4	35,1 ± 4,2	25,3 ± 3,1	23,1 ± 2,6	31,1 ± 2,8	29,4 ± 1,7	29,7 ± 3,0
H	28,5 ± 4,5	28,1 ± 3,5	26,6 ± 2,6	29,2 ± 3,0	34,2 ± 1,5	26,6 ± 2,7	19,1 ± 0,7	34,9 ± 4,1	28,0 ± 1,5	29,0 ± 1,8
C	23,5 ± 3,7 <sup>b</sup>	20,6 ± 0,8 <sup>b</sup>	25,6 ± 1,8 <sup>b</sup>	32,6 ± 2,0 <sup>b</sup>	43,0 ± 3,0 <sup>c</sup>	26,3 ± 2,9 <sup>b</sup>	18,6 ± 2,1 <sup>a</sup>	34,3 ± 4,1 <sup>b</sup>	25,1 ± 1,4 <sup>b</sup>	31,4 ± 5,5 <sup>b</sup>

TABLE 7 – Concentration moyenne en Cp ( $\pm$  déviation standard), pour chaque lot, en fonction du temps. Pour chacun de ces lots, les indices a, b ou c correspondent à des variations de concentration significativement différentes ( $p < 0,05$ ). OT : lot infesté par *O. ovis* et *T. circumcincta*, O : lot infesté par *O. ovis*, OH : lot infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, T : lot infesté par *T. circumcincta*, H : lot infesté par *H. contortus* et C : lot contrôle.

	Pourcentage d'inhibition trypsique									
	J-11	J-18	J-25	J-39	J-53	J-60	J-67	J-74	J-81	J-88
OT	30,1 ± 2,6	34,4 ± 4,2	48,4 ± 6,2	47,5 ± 5,8	58,5 ± 3,8	41 ± 4,1	45,9 ± 1,6	37,7 ± 3,0	41,0 ± 4,6	44,4 ± 2,0
O	34,3 ± 3,0	34,5 ± 2,8	55,9 ± 11,6	44,2 ± 4,9	50,1 ± 3,9	39,4 ± 3,1	43,8 ± 2,0	35,9 ± 2,0	35,7 ± 5,4	40,4 ± 4,4
OH	28,8 ± 2,3	35,0 ± 1,2	52,4 ± 3,4	38,9 ± 4,2	57,2 ± 3,1	39,1 ± 1,9	42,8 ± 3,8	34,2 ± 2,2	37,5 ± 4,2	51,9 ± 6,5
T	31,6 ± 0,5	32,2 ± 3,3	55,1 ± 9,8	38,4 ± 10,0	54,9 ± 2,8	33,6 ± 0,9	41,2 ± 1,7	32,2 ± 2,3	40,6 ± 2,6	40,9 ± 4,5
H	29,5 ± 3,3	33,9 ± 1,8	52,1 ± 7,8	48,4 ± 6,8	53,5 ± 4,9	36,8 ± 1,6	42,0 ± 3,1	32,0 ± 2,8	44,5 ± 7,2	42,2 ± 2,6
C	30,8 ± 2,6	30,3 ± 2,6	67,9 ± 5,0	38,9 ± 6,2	50,1 ± 2,9	38,5 ± 2,0	45,0 ± 2,8	33,2 ± 2,0	42,6 ± 2,0	48,5 ± 7,2

TABLE 8 – Valeur du pourcentage d'inhibition trypsique moyen ( $\pm$  déviation standard), pour chaque lot, en fonction du temps. OT : lot infesté par *O. ovis* et *T. circumcincta*, O : lot infesté par *O. ovis*, OH : lot infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, T : lot infesté par *T. circumcincta*, H : lot infesté par *H. contortus* et C : lot contrôle.

lot	n°animal	% ELISA	Concentration en Cp (U/mL)
lot OH	3103	58,9	39,0
	2082	62,6	55,5
lot O	4717	21,3	48,2
lot OT	4720	41,2	50,0
	3144	20,2	40,6
lot OH	3012	6,1	23,8
lot O	2079	13,4	18,2
	0900	17,0	28,0
lot OT	2151	6,7	21,9
	0899	6,2	13,2

TABLE 9 – Relation entre le pourcentage ELISA (IgG anti-œstres) et la concentration en Cp (U/mL) pour 5 moutons ayant un fort pourcentage ELISA et 5 moutons présentant un faible pourcentage ELISA, à J-53. OT: lot infesté par *O. ovis* et *T. circumcincta*, O: lot infesté par *O. ovis*, OH: lot infesté par *O. ovis* et *H. contortus*, T: lot infesté par *T. circumcincta*, H: lot infesté par *H. contortus* et C: lot contrôle.

## Chapitre III

# Discussion

Cette étude a été menée afin de définir assez précisément l'influence de mono- ou de poly-infestations parasitaires, en particulier par *Œstrus ovis* et par des nématodes de l'abomasum tels qu'*Hæmonchus contortus* et *Teladorsagia circumcincta*, sur la réaction inflammatoire que développe l'hôte suite à ces agressions. Dans le but de qualifier correctement le type de RI mise en jeu, plusieurs types de paramètres ont été analysés. D'autres expériences se sont déjà intéressées aux effets des co-infestations impliquant les larves d'œstres et les strongles [130, 129] et ont montré que l'infestation du tractus digestif par *Trichostrongylus colubriformis* ne modifiait pas la biologie des larves d'*Œstrus ovis*. *A contrario*, la présence de ces larves de diptères entraînait une réduction significative du nombre d'œufs excrétés, de la fécondité des vers et de la charge parasitaire en nématodes. Ces résultats indiquaient alors que l'inflammation d'une muqueuse donnée était responsable d'un recrutement de cellules inflammatoires sur l'ensemble des muqueuses de l'organisme [129]. Des études similaires s'intéressant aux interactions entre *O. ovis* et *H. contortus* ont permis de tirer les mêmes conclusions à l'exception près que la charge parasitaire en nématodes ne semblait pas subir les influences de la présence de larves de diptères [30].

Après avoir mis en évidence la réussite des infestations parasitaires par des larves de diptères et par des strongles gastriques, nous nous attacherons, dans un premier temps, à décrire certaines modalités de la réaction inflammatoire mise en jeu au cours de telles agressions. Dans un deuxième temps, seront discutées les différentes interactions hôte/parasites au cours de mono- ou de poly-infestations.

### **A Mise en évidence des infestations parasitaires par *O. ovis* et par les strongles**

La première étape consistait à confirmer les différentes infestations réalisées par 82 L1 d'*O. ovis* à J-0, J-7, J-14, J-21 et J-28 et par 5 000 L3 de strongles à J-48. Tout d'abord, les suivis sérologiques en IgG spécifiques anti-*O. ovis*, anti-*H. contortus* et anti-*T. circumcincta* ont permis

de mettre en évidence des différences significatives entre les lots non infestés et les lots infestés. Ces cinétiques ont également permis de visualiser les éventuelles séroconversions des différents moutons. Ainsi, en ce qui concerne les IgG anti-œstres, il n'est pas ressorti de différence significative parmi les différents lots infestés bien que les productions en Ac aient été accélérées et de plus forte intensité pour les lots OT et OH. Les séroconversions apparues à J-39, J-60 et J-67, respectivement pour les lots OH, OT et O, permettent de confirmer cette observation. Les productions d'IgG anti-strongles sont également significativement plus élevées pour les lots infestés que pour les lots non infestés. Cependant, la présence d'*O. ovis* dans les cavités nasales ne semble exercer aucune influence sur ces synthèses. La réponse en IgG spécifiques d'un parasite donné a été décrite par différents auteurs [2, 106]. Cependant, la mise en évidence d'une relation directe entre les concentrations sériques en Ac et le statut immunitaire du mouton infesté reste encore à l'étude. De nombreuses publications mettent en évidence le rôle des Ac dans le développement d'une résistance face à une primo-infestation [40, 114, 120] et de fortes quantités d'IgG sont souvent associées à des individus bons répondeurs présentant de faibles quantités d'œufs dans les fèces [2]. Dans notre étude, aucune corrélation significative n'a pu être établie entre les valeurs des concentrations en Ac et d'autres paramètres concernant la biologie des parasites tels que le nombre d'œufs excrétés, le taux de fécondité ou encore la longueur des vers.

Les résultats précédents sont à corrélérer avec les comptages de larves à l'autopsie. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les lots mono- et poly-infestés. Les trois lots (OT, OH et O) présentaient une grande majorité de L1 laissant peu de place aux autres stades larvaires (L2 et L3), ce qui peut être expliqué par les phénomènes d'hypobiose cités précédemment [33, 123, 132], étant donné que les expériences ont été réalisées pendant la saison froide. En ce qui concerne les infestations par *H. contortus* et *T. circumcincta*, les stades larvaires (L4) et les adultes de strongles retrouvés à l'autopsie confirment la réussite des infestations, ces quantités étant nulles pour les lots non infestés. Ces résultats révèlent une évolution normale du cycle parasitaire avec une large proportion de parasites adultes, très peu de L4 et l'absence de stade L3. Cependant, il faut souligner le fait que les œstres ne semblent avoir eu aucune influence ni sur la croissance des parasites ni sur la charge parasitaire. Cette conclusion est à la fois en contradiction avec les observations faites par des études précédentes [129] portant sur des co-infestations impliquant *Trichostrongylus colubriformis* et *Cæstrus ovis* et en accord avec celles réalisées par Dorchie *et al.* [30] lors de co-infestations avec *Hæmonchus contortus*.

Le comptage des œufs dans les selles indique que les animaux présentant des larves de diptères sont parasités par des strongles ayant une fécondité diminuée, ce constat étant valable pour les deux types de nématodes. En effet, le nombre d'œufs par gramme de fèces est significativement plus bas dans les lots OT et OH que dans les lots H et T. Cette influence négative des larves d'*Cæstrus ovis* sur la fécondité des nématodes est en accord avec d'autres modèles [129, 30].



Comme l'ont démontré de nombreuses études, le suivi des valeurs en pepsinogène sérique constitue un élément diagnostique pour des troupeaux présentant des infestations par des nématodes gastriques [76, 120]. En effet, on a observé assez rapidement, après une infestation par un nématode de l'abomasum, une augmentation significative de cette concentration, à la fois *in vivo* [51] et *in vitro* [76]. De ce fait, le dosage du pepsinogène sérique peut être utilisé comme un indicateur de sévérité d'une infestation parasitaire [120]. Les résultats obtenus dans cette étude révèlent des différences significatives précoces entre les lots infestés par les strongles et les lots non infestés, cinq jours environ après l'inoculation de 5 000 L3. Le lot OT a présenté une augmentation accrue entre J-53 et J-67 (semblable à celles observées dans des études précédentes [76]), alors que le lot OH, dont les valeurs ne sont pas significativement différentes des valeurs du lot H, a présenté une augmentation plus lente et plus progressive jusqu'à J-95. Les lots OT et T ont des valeurs significativement supérieures à celles des lots OH et H révélant une meilleure installation des nématodes de l'espèce *Hæmonchus contortus* au sein de la muqueuse abomasale. De plus, la présence d'*O. ovis* n'a pas eu d'influence significative sur la biologie de *T. circumcincta*. Ces résultats sont en contradiction avec des études précédentes qui ont pu mettre en évidence une corrélation positive entre l'augmentation du pepsinogène gastrique et la taille des nématodes (modèle: *T. circumcincta*) [120]. Ces augmentations de la concentration en pepsinogène sérique sont à associer à de sévères dommages de l'abomasum et plus précisément à une altération de la perméabilité de la muqueuse, par destruction des jonctions serrées. Ces altérations sont le résultat des phases intra-tissulaires des parasites, sites privilégiés des mues pour le passage des stades larvaires aux stades adultes [108, 120]. Les produits d'excrétion / sécrétion des parasites, tels que l'acétylcholinestérase, semblent également jouer un rôle dans les modifications morphologiques de la muqueuse [76]. Les parasites, logés dans les glandes, provoquent une augmentation du pH local ainsi qu'une augmentation de la synthèse de gastrine et de pepsinogène [76]. L'apparition de ces augmentations de la concentration en pepsinogène (notamment à J-53) est à corrélérer à la présence d'œufs dans les fèces à J-67 pour les quatre lots. Par la suite, la diminution progressive des valeurs peut s'expliquer par le fait que la majorité des larves L4 a mué et ainsi entame la phase intra-luminale [68], laissant aux tissus endommagés la capacité de cicatrifier et donc de recouvrer une perméabilité normale [76]. Les différences de profil cinétique (bien que non significatives) entre les lots seulement infestés par *O. ovis* et ceux infestés à la fois par *O. ovis* et par des strongles pourraient suggérer que la présence de larves d'œstres pourrait ralentir le passage des formes larvaires aux formes adultes dans la muqueuse abomasale.

## **B Modalités de la RI de l'hôte face à une ou plusieurs infestations parasitaires (modèles : *O. ovis*, *H. contortus* et *T. circumcincta*)**

### **1 Profil des variations des paramètres organiques étudiés (cf. Figure 14)**

De manière générale, au cours de notre étude, il est ressorti que l'on obtenait des cinétiques de paramètres différentes entre les lots uniquement infestés par *O. ovis*, les lots uniquement infestés par les strongles et ceux co-infestés par les deux types de parasites. En ce qui concerne le lot contrôle, ses valeurs sont restées stables au cours du temps sauf pour les dosages de la Cp et de l' $\alpha$ -1-AT. Il est également ressorti qu'une infestation parasitaire entraînait systématiquement une élévation du nombre de GE circulants (soit à J-18 pour *O. ovis* et à J-60 pour les strongles). Cependant, lors de multiples infestations par les larves de diptères, cette augmentation a significativement été de plus forte intensité. Les lots, préalablement infestés par *O. ovis*, ont présenté une réponse en GE plus précoce et plus importante que ceux ayant uniquement reçu un bolus de 5 000 L3. Dans tous les cas, ces pics étaient de courte durée et on a pu observer un retour rapide aux valeurs initiales. Les valeurs de l'hématocrite des lots OH et H ont subi une diminution remarquable à partir de J-67 ; des chutes mineures des valeurs des hématocrites ont également été observées pour les lots OT et T à J-81. Les *minima* ont été atteints dans tous les cas à J-95. De plus, les moutons des lots co-infestés (OT et OH) ont présenté une meilleure capacité à maintenir leurs hématocrites, ce qui a été décrit précédemment comme un critère de résistance face à une infestation par des nématodes gastriques hématophages [2, 4]. La concentration en protéines totales a augmenté pour les lots OH et O à J-39 (soit 10 jours après la dernière infestation par *O. ovis*). Les inoculations de L3 de strongles n'ont entraîné aucune modification de la protéinémie. A partir de J-60, parallèlement aux variations de l'hématocrite, la protéinémie des lots OH et H a présenté une diminution significative jusqu'à J-95. La concentration en Cp a augmenté significativement à J-39 pour les lots OH et OT et à J-53 pour le lot O. Puis, on a pu observer un retour à des valeurs de base. A l'instar des protéinémies, les strongles n'ont eu aucune influence sur l'expression et la sécrétion de cette protéine. Cette cinétique a été également marquée par des variations touchant l'ensemble des lots, avec tout d'abord une diminution générale entre J-60 et J-67 et ensuite une augmentation générale à J-74. Enfin, le suivi cinétique de la concentration en  $\alpha$ -1-AT n'a laissé apparaître aucune différence significative.

### **2 Eosinophilie sanguine et hématocrite : marqueurs d'infestation parasitaire et de résistance de l'hôte**

L'apparition d'une éosinophilie sanguine et locale est considérée comme un élément important dans la RI de l'hôte contre les helminthes et est souvent associée au développement d'une résistance au parasite [6, 12, 24, 82, 81, 103]. Notre expérience est en accord avec les études précédentes et on observe, quel que soit le parasite, de fortes élévations significatives

des concentrations en GE circulants par rapport à celles du lot contrôle. Cette réaction de l'organisme face aux larves d'œstres apparaît très précocement (soit trois jours après la première infestation). Par la suite, la cinétique des GE passe par un pic (à J-18 et J-60) et lors de l'arrêt des infestations, la décroissance s'amorce assez rapidement. Cependant, la décroissance plus lente pour les lots infestés par *O. ovis* peut s'expliquer par l'importante quantité de GE mobilisée au préalable ; on retrouve d'ailleurs, à J-88, des concentrations moyennes en GE supérieures pour le lot O par rapport au lot H et pour le lot OH par rapport au lot OT, à J-81 et J-88. Les deux types de parasites n'entraînent pas des mobilisations identiques en GE, comme montré par les études précédentes [34, 81, 102]. Chez les animaux ayant subi de multiples infestations avec *O. ovis*, on observe un recrutement massif de cellules inflammatoires et en particulier de GE. Les données histopathologiques permettent de mettre en évidence une migration trans-épithéliale de ces cellules indiquant qu'elles sont attirées dans la lumière des cavités nasales afin d'entrer en contact direct avec les larves. L'implication des GE dans la mort des larves L1 a été démontrée *in vitro*. Cet évènement serait consécutif à la dégranulation de ces cellules au contact des parasites [42]. Les infestations par *O. ovis* semblent influencer la vitesse de mobilisation des GE ainsi que les quantités recrutées puisque les lots OT et OH voient leur quantité en GE devenir significativement supérieure à celle des lots T et H après J-48 (jour de l'inoculation de 5 000 L3). De plus, ces hyper-éosinophilies sanguines sont à corrélérer négativement avec le nombre d'œufs dans les selles, la longueur des parasites femelles ainsi que leur taux de fécondité. Cette observation confirme le rôle des GE sur leur capacité à inhiber le développement des parasites [12]. L'organisme parasité par *O. ovis* semble répondre plus rapidement lors d'infestations ultérieures et en particulier dans le cas de parasitisme hétérologue. Les GE, rapidement mobilisés au niveau de la muqueuse, entrent alors en collaboration avec d'autres cellules (GB, mastocytes et globules leucocytes) et avec de nombreux médiateurs (Ig, facteurs du complément, produits du métabolisme de l'acide arachidonique...) et semblent entraîner l'immobilisation voire la mort des stades larvaires infestants de parasites homologues ou hétérologues [6, 49, 81]. La réponse en GE mise en évidence lors de parasitisme gastro-intestinal chez des moutons infestés au préalable par *O. ovis* est en accord avec les études précédentes menées par Meeusen *et al.* [56, 81]. Ainsi, il semblerait que les infestations par ces larves de diptères favorisent l'élimination des strongles par un mécanisme mettant en jeu les GE (*cf. supra*). Enfin, les deux strongles digestifs provoquent le même type de RI chez l'hôte malgré leurs différences biologiques (surtout en ce qui concerne le caractère plus ou moins marqué d'hématophagie) et les cinétiques des lots H et T sont significativement semblables avec un pic remarquable et significatif à J-60 suivi d'une décroissance progressive jusqu'à J-95.

La réponse en GE étant associée au développement d'une résistance par rapport à un parasite donné [12, 24, 103], on peut conclure des résultats précédents que des pré-infestations par des larves d'œstres seraient responsables de l'acquisition d'une résistance par rapport à d'autres infestations parasitaires et notamment par des strongles gastro-intestinaux.

L'hématocrite est un paramètre important qui peut être utilisé, à l'instar du dénombrement des œufs dans les selles, pour décrire la résistance d'un individu face à des infestations par des nématodes hématophages, comme cela a été démontré lors d'infestations par *H. contortus* [2, 4]. Ainsi, des individus considérés comme résistants et bons répondeurs à des infestations, parviennent à maintenir leur hématocrite à un niveau correct. Cependant, ce caractère semble être réversible et des moutons résistants lors d'une première infestation, peuvent devenir sensibles lors des infestations suivantes [2]. Le suivi cinétique de l'hématocrite de chaque lot présente un intérêt double. D'une part, il peut servir d'indicateur d'une infestation par *H. contortus* et dans une moindre mesure par *T. circumcincta*. D'autre part, il permet d'évaluer rapidement la capacité de l'individu parasité à résister à cette infestation. Ainsi, il est clairement apparu que les moutons infestés par les deux types de nématodes présentaient une diminution significative de leur hématocrite, par rapport aux lots C et O, à partir de J-67 pour les lots OH et H (soit 19 jours après les infestations) et de J-81 pour les lots OT et T (soit environ un mois après les infestations). Les adultes d'*H. contortus* sont reconnus pour être fortement hématophages et chaque ver adulte est en mesure d'ingérer 0,5 mL de sang par jour [18, 68]. Ainsi, certains animaux des lots H et OH, mauvais répondeurs, ont vu leur hématocrite chuter d'au moins 50%, entraînant une anémie sévère et faisant de l'hæmonchose une parasitose potentiellement fatale [68]. Ce caractère a été beaucoup moins marqué pour les lots OT et T car *T. circumcincta* est un hématophage discret, les hématocrites étant restés supérieurs à ceux des lots OH et H. Enfin, si on compare les lots OH et OT aux lots H et T, on a pu mettre en évidence que leur hématocrite était significativement plus élevé, ce qui pourrait être attribué à la différence de taille des nématodes, dont la croissance a été inhibée par la présence de larves d'*O. ovis*. Ainsi, les animaux infestés par ces larves de diptères semblent limiter les effets pathogènes de l'hæmonchose en minimisant la taille des nématodes et donc, la quantité de sang ingérée quotidiennement. De plus, la corrélation négative mise en évidence entre les résultats des coproscopies et les hématocrites ( $r=0,590$ ,  $p<0,01$ ) conforte la remarque précédente. En d'autres termes, plus la fécondité des vers est altérée, moins l'hématocrite s'effondre, ce qui revient à dire que le maintien de l'hématocrite est un caractère de résistance face à *H. contortus* ou *T. circumcincta*.

### 3 Les protéines sériques : témoins d'atteinte de l'intégrité tissulaire

#### 3.1 Evaluation des protéines totales et détection d'un état inflammatoire

Le dosage des protéines totales est depuis longtemps utilisé en médecine vétérinaire afin de détecter des états inflammatoires [45, 67]. Les valeurs ainsi obtenues sont souvent complétées par un profil électrophorétique permettant de préciser quelles fractions de protéines ont vu leur concentration modifiée et ainsi essayer de préciser l'affection en cause. En effet, les protéines sériques peuvent être subdivisées en deux grandes catégories (*cf. supra*, [67]). L'albumine représente 35 à 50% des protéines totales chez les animaux et l'autre partie est constituée de

globulines que l'on peut séparer en trois groupes :

- les  $\alpha$ -globulines dont l' $\alpha$ -1-AT, la Cp, l'Hp, l' $\alpha$ -2-M ;
- les  $\beta$ -globulines dont le Fb, les fractions C3 et C4 du complément, la transferrine ;
- les  $\gamma$ -globulines dont les IgG et les IgA, entre autres.

Le métabolisme des protéines totales peut être affecté aussi bien par des facteurs physiologiques (stress, état nutritionnel...) que par des facteurs pathologiques [75]. En ce qui concerne les états d'hyperprotéïnémie avec augmentation des fractions  $\alpha$  et  $\beta$ , de nombreuses études les ont mis en relation avec des phénomènes inflammatoires aigus chez le mouton tels que des mammites, des arthrites ou des infections pulmonaires [21, 22, 45, 98, 99]. Les augmentations des fractions  $\gamma$  sont souvent associées à des inflammations plus chroniques [67, 114]. Cependant ces examens complémentaires restent peu spécifiques d'une affection donnée. Notre étude semble ainsi être en accord avec les résultats des études précédentes puisqu'on remarque aisément des différences significatives dans les concentrations en protéines totales entre les lots infestés par *O. ovis* (notamment les lots OH et H) et les lots non infestés. Les augmentations obtenues apparaissent dix jours après la dernière infestation par les larves de diptères, ce qui est assez tardif si l'on considère les cinétiques obtenues par les comptages éosinophiliques (*cf. supra*). En effet, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les comptages de GE et les concentrations en protéines totales, révélant très certainement une chronologie particulière d'apparition des événements de la RI. Cette succession d'événements peut s'expliquer par les phénomènes suivants : la mobilisation des GE est due à la synthèse de l'IL-5 par les LTh2 [39, 85, 47] issus de la différenciation des LTh0 après avoir été en contact avec l'Ag présenté par des CPA. Parallèlement, les macrophages sont impliqués dans la synthèse d'autres types de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , responsables de la stimulation des hépatocytes. Ces derniers sont alors en mesure de synthétiser des PPA [50, 74, 75], modifiant ainsi le profil électrophorétique [67]. La deuxième augmentation remarquable de la quantité de GE à J-60 n'est pas retrouvée dans le profil des protéines totales qui ne présente aucune autre augmentation après celle de J-39 (*cf. supra*). Il semblerait donc que le métabolisme de ces dernières ne soit altéré que lors d'infestations multiples et/ou chroniques. En comparant ces deux mêmes cinétiques (GE et protéines totales), il apparaît, à l'échelle systémique, que les infestations par les strongles gastro-intestinaux sont moins invasives que celles réalisées par *O. ovis* et donc mieux supportées par l'hôte ; de ce fait, la RI engendrée est de plus faible intensité. Par la suite, à J-67, on observe une modification inverse du profil des protéines totales et les lots OH et H présentent progressivement une hypoprotéïnémie. Ces décrochages sont à mettre en relation avec ceux observés sur le profil des hématocrites, à la différence que les lots OT et T ne semblent pas être affectés par cette perte de protéines sériques. Ainsi, on a pu établir une corrélation positive significative entre ces deux paramètres ( $r=0,286$ ,  $p<0,01$ ). Les pertes sanguines expliquant les diminutions dramatiques des hématocrites sont probablement également à l'origine des hypoprotéïnémies observées [67], ces dernières étant renforcées par l'augmentation de perméabilité

abomasale, responsable de la fuite d'albumine, de globulines et d'Ig [86, 121]. Il n'existe aucune corrélation entre l'évolution des concentrations en protéines totales et en IgG. En effet, les IgG voient leur concentration augmenter significativement seulement à partir de J-60 (contre J-39 pour les protéines totales). Cette observation est en accord avec des études précédentes révélant la lenteur de leur cinétique lors d'infestations multiples par *H. contortus* [114]. Il est alors possible de déduire de cette observation que le pic de protéines observé à J-39 n'est pas la conséquence d'une importante production de  $\gamma$ -globulines mais plutôt d' $\alpha$ - et/ou de  $\beta$ -globulines. Enfin, les concentrations en protéines totales sont corrélées aux résultats des coproscopies et ce, quelle que soit la méthode de dosage utilisée ( $r=0,323$  pour la méthode physique et  $r=0,480$  pour la méthode chimique,  $p<0,01$ ). Bien que cela n'apparaisse pas graphiquement sur les figures précédentes (cf. Figures 13 et 11 et Tableau 5), plus la fécondité des vers augmente et plus l'hyperprotéïnémie est marquée. Ainsi, si un animal est considéré comme sensible vis-à-vis d'un parasite et qu'il présente un nombre élevé d'œufs dans les selles, celui-ci développera une importante RI marquée par une hyperprotéïnémie. Il apparaît également que les moutons infestés par *T. circumcincta*, responsable de la ponte d'un grand nombre d'œufs dans les selles (cf. Tableau 5), présentent des protéïnémies relativement stables et maintenues à un niveau semblable à celui du lot contrôle, tandis que les moutons infestés par *H. contortus*, ayant une fécondité inférieure (cf. Tableau 5), voient leur concentration en protéines totales chuter, à l'instar de l'hématocrite. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que les strongles du genre *T. circumcincta* sont mieux supportés en plus grande quantité par l'hôte et sont responsables de dégâts moindres au niveau de la muqueuse abomasale, qui conserve en grande partie sa perméabilité.

Peu d'études se sont intéressées à mettre en évidence les effets du parasitisme sur la réponse systémique de l'hôte, et en particulier d'un point de vue biochimique. Des comparaisons avec d'autres types d'infections ont été réalisées, mettant en jeu, par exemple, des infections chirurgicales iatrogènes, des infections à *Pasteurella haemolytica*, des endotoxines comme le LPS de certaines bactéries GRAM- ou encore certains nématodes comme *Ostertagia ostertagi*, parasite de la caillette des bovins [22]. Ces dosages se sont surtout orientés vers certaines  $\alpha$ -globulines, montrant la spécificité de la RI pour chaque type d'agent pathogène. La conclusion de cette analyse est marquée par l'hétérogénéité de la RI de l'hôte face à des infestations parasitaires. Les poly-infestations, comme celles réalisées avec *O. ovis*, sont responsables de nombreuses modifications au niveau systémique avec une augmentation marquée de la synthèse des PPA. Au contraire, une simple inoculation de L3 de strongles n'a que très peu d'effets notables. Ces variations sont peut-être le résultat des différences physiopathologiques de chaque parasite. Les larves de nématodes et de diptères ne semblent pas avoir les mêmes finalités et entretenir les mêmes relations avec les mécanismes de défense de l'hôte. Il est également probable que l'augmentation des protéines sériques soit associée à l'acquisition d'une résistance par rapport au parasite comme cela a été démontré pour d'autres paramètres (cf. *supra*). Ainsi, cela expli-

querait l'élévation de la concentration en protéines totales lors d'infestations multiples par *O. ovis* et l'absence de modification lors d'une simple infestation par *H. contortus* ou *T. circumcincta*.

### 3.2 Effets du parasitisme sur le métabolisme de deux protéines de la phase aiguë : la céruloplasmine (Cp) et l' $\alpha$ -1-antitrypsine

#### a La céruloplasmine : PPA d'importance majeure lors d'infestations parasitaires expérimentales

La céruloplasmine est une  $\alpha$ -2-globuline, dont les rôles restent encore un peu confus (*cf. supra*). En plus de ses implications dans le transport du *Cu* ou dans l'épuration des radicaux libres [17, 74], cette protéine est également considérée comme une protéine de la phase aiguë (PPA). Chez l'Homme, les variations de concentration de cette PPA sont modérées en comparaison avec d'autres protéines telles que l'Hp. Au cours d'un phénomène inflammatoire, sa concentration augmente de 50%. Elle est également caractérisée par une cinétique d'évolution lente et son temps de demi-vie est d'environ une semaine [74, 75], ce qui semble être un critère important dans le cadre d'un suivi cinétique à long terme, comme ce fut le cas dans le protocole mis en place. Les élévations de sa concentration sont dépendantes de l'agent pathogène mais ne semblent pas être systématiques. Ainsi, chez l'Homme, elle n'est pas considérée comme un bon indicateur d'une RI. Il en est tout autrement chez les ruminants, où elle constitue une PPA d'importance majeure [21, 46] ainsi qu'un bon marqueur d'état inflammatoire [55, 98, 99]. Chez les bovins, suite à une injection de turpentine, sa concentration peut être augmentée de 70 à 120% [21]. Chez les ovins, c'est lors d'infections bactériennes pulmonaires ou d'infections chirurgicales iatrogènes que l'on observe les élévations de concentration les plus importantes [98]. Il semblerait que la concentration en Cp lors d'état inflammatoire soit fixée au préalable et qu'elle soit invariable quelle que soit la sévérité de la RI. Dans notre étude, la première observation est en accord avec certaines études précédentes puisque les concentrations moyennes en Cp des lots infestés par *O. ovis* (en particulier les lots OT et OH) sont significativement supérieures à celles des lots non infestés par ce parasite (en particulier le lot H), à J-39 (soit 11 jours après la dernière infestation par *O. ovis*). Cette augmentation à J-39 coïncide avec celle observée pour la protéinémie, ce qui confirme que cette hyperprotéinémie était probablement due, entre autres, à une importante augmentation en  $\alpha$ -globulines. Les corrélations réalisées précédemment, entre les pourcentages ELISA (IgG anti-œstres) et la concentration en Cp plasmatique, confirment les résultats obtenus par Pfeiffer *et al.* [98] (*cf. supra*). Ainsi quel que soit le degré d'infestation par les larves de diptères, l'augmentation de la concentration en Cp plasmatique semble être fixée au préalable et les hyper-céruloplasminémies s'échelonnent ainsi entre 40 et 60 U/mL. Par la suite, la diminution observée pour tous les lots à J-67, rappelant l'hypoprotéinémie des lots OH, OT, H et T, s'expliquerait plus aisément par un phénomène général, pouvant toucher tous les lots à la fois. Dans le cas de la Cp, ce genre de profil peut être rencontré dans des états carenciels, notamment vis-à-vis du cuivre (*cf. supra*) [14]. Un second pic significatif est observé à J-74,

concernant également l'ensemble des lots. Celui-ci succède ainsi de 14 jours à l'augmentation en GE, impliquant seulement les lots infestés par les strongles. Cette augmentation, ne faisant aucune distinction de lot, pourrait s'expliquer par d'éventuelles infections intercurrentes. Les infections respiratoires sont souvent rapportées dans ce type de protocole, incluant les mois d'hiver. Cependant aucun symptôme respiratoire, autre que ceux occasionnés par l'œstrose, et aucun syndrome fébrile n'ont été détectés. Il est ainsi probable qu'une période de stress ou de croissance (par l'influence de la growth hormon (GH) sur l'axe corticotrope) [75] ou que la présence de coccidies dans les selles (objectivée par l'examen coproscopique en lame de Mac Master) aient occasionné une légère augmentation significative de la concentration de cette PPA.

Les variations que l'on observe indifféremment sur l'ensemble des lots peuvent également être imputées aux faiblesses de la méthode de dosage mise au point. En effet, le principal inconvénient réside dans le fait que l'activité oxydasique de la Cp diminue assez rapidement à température ambiante, d'environ 6,7% par mois lors d'une conservation à -20°C. De plus, le bon déroulement de la réaction d'oxydation de la para-phénylène diamine nécessite de travailler dans des conditions proches de celles obtenues dans l'organisme et, notamment, à 37°C [17]. Une telle condition est difficile à obtenir en pratique et les variations de température extérieure ont sûrement influencé les cinétiques.

La Cp semble être un relativement bon marqueur, à l'instar du dosage des protéines totales, pour la détection d'états inflammatoires assez marqués ou lors de poly-infestations successives. Si la Cp ne subit pas les influences du parasitisme gastro-intestinal, son augmentation reflète assez fidèlement les inflammations des cavités nasales occasionnées par des larves d'*O. ovis*.

### **b Métabolisme de l' $\alpha$ -1-antitrypsine lors d'infestations parasitaires**

L' $\alpha$ -1-antitrypsine ( $\alpha$ -1-AT) est également une  $\alpha$ -2-globuline. Chez l'Homme, lors de phénomènes inflammatoires, sa concentration peut être multipliée par deux à quatre [50, 74, 75]. Elle possède, à l'instar de la Cp, une cinétique d'évolution lente [50]. Son rôle essentiel est d'inactiver les enzymes leucocytaires (comme l'élastase) libérées au niveau du foyer inflammatoire. Elle constitue un bon indicateur d'un état inflammatoire aussi bien chez l'Homme que chez les ruminants. Il s'agit par exemple de la principale PPA retrouvée dans le lait lors de mammites [46]. Lors d'injection de turpentine chez les bovins [21], cette globuline augmente significativement au bout de trois jours, présente un pic entre quatre et sept jours et un retour aux valeurs initiales à partir du 17<sup>ème</sup> jour. Tout comme la Cp, l'intensité de son augmentation est indépendante de la sévérité de l'inflammation. Chez les ovins, son degré d'augmentation dépend aussi de l'agent pathogène et les augmentations les plus importantes ont été décelées lors d'infections bactériennes, notamment à *Pasteurella hæmolytica* ; de nettes augmentations ont également été mises en évidence dans le cas d'injection d'une endotoxine bactérienne de type LPS [22].



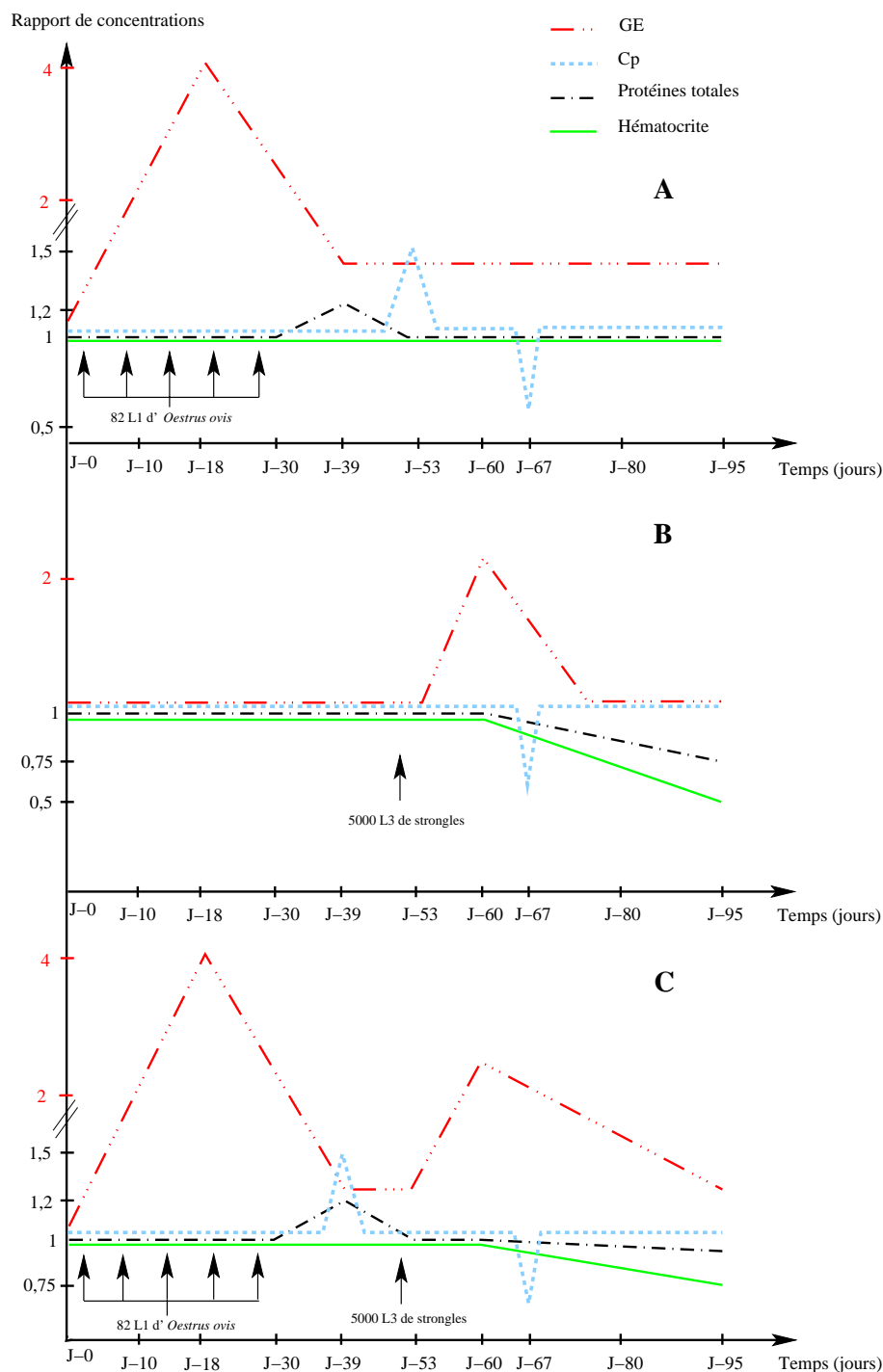


FIGURE 14 – Schéma de synthèse de l'évolution des paramètres sanguins au cours d'infestations parasitaires par *O. ovis*, *H. contortus* et *T. circumcincta*. A : lots infestés par 82 L1 d'*O. ovis*, B : lots infestés par 5000 L3 d'*H. contortus* et de *T. circumcincta*, C : lots co-infestés par 82 L1 d'*O. ovis*, 5 000 L3 d'*H. contortus* et 5 000 L3 de *T. circumcincta*. L1 : larve de premier âge d'*O. ovis* et L3 : larve de 3<sup>ème</sup> âge de strongles.

Les résultats obtenus, ne révélant aucune différence significative ni au cours du temps ni en fonction des lots, permettent de conclure que l' $\alpha$ -1-AT est une PPA peu spécifique d'une mono- ou d'une poly-infestation parasitaire et son dosage serait probablement plus adéquat lors de RI plus importantes dont l'agent causal serait une bactérie [22].

La méthode de dosage mise au point (*cf. supra*), bien que facile à mettre en œuvre, présente des contraintes et en particulier nécessite une température constante de 37°C. De plus, des problèmes de turbidité sont apparus lors de l'adjonction extemporanée du mélange BAPNA/DMSO dans la solution de tampon Tris, incriminant ainsi des problèmes de pureté de l'eau distillée. Cependant, de tels problèmes ne sont pas rapportés dans la littérature. Enfin, la mesure de l'activité anti-trypsique, utilisant comme substrat le BAPNA (*cf. supra*), n'est pas spécifique de l' $\alpha$ -1-AT et dose également l' $\alpha$ -2-AT [28], ce qui peut entraîner de nombreuses interférences avec les résultats obtenus.

Il ressort des résultats précédents que le dosage des protéines totales nécessite d'être complété par d'autres types d'examen tels que la réalisation d'un profil électrophorétique ou encore le dosage d'autres PPA, telles que l'haptoglobuline ou encore la protéine C-réactive (CRP). En effet, ces dernières, connues comme étant de bons marqueurs d'un état inflammatoire chez les ruminants [46, 45], présentent une cinétique d'évolution rapide et leurs concentrations peuvent être multipliées par 100 dans certains cas [75, 98].

## C Interactions hôte-parasites, influences réciproques

### 1 Mécanismes de la RI mis en jeu au cours de l'œstrose

#### 1.1 Mise en évidence de l'HS1 et conséquences sur la population parasitaire

Les résultats histopathologiques obtenus sont en accord avec les études précédentes [29, 90, 91, 93]. On observe ainsi une mobilisation de l'ensemble des cellules inflammatoires (mastocytes, GE et globules leucocytes (GL)), actrices de l'HS1, et ceci de façon significative en comparant les lots indemnes et infestés. Ces mêmes cellules sont présentes également selon un gradient de concentration et sont plus abondantes dans le chorion sous-épithélial, permettant de ce fait un contact étroit avec les larves de diptères. Ce type de RI semble permettre l'acquisition d'un équilibre dans lequel l'hôte parvient à limiter les populations parasites. Cependant, le parasite semble tirer profit de l'HS1 puisque les cellules inflammatoires sont responsables d'importants dégâts de la muqueuse à l'origine d'exsudats, substrats essentiels au développement des larves [69]. De plus, la présence d'épines et de crochets sur les L1, responsables de traumatismes sur la muqueuse pituitaire, permet de soutenir le fait que les larves peuvent effectivement tirer parti d'une telle abrasion tissulaire.

## 1.2 Conséquences de la RI sur l'hôte

La présence d'*O. ovis* dans les cavités nasales entraîne une mobilisation de cellules inflammatoires (*cf. supra*). Une infiltration des muqueuses fundique et pylorique par les mêmes types cellulaires est retrouvée à l'autopsie à la fois sur les lots infestés par les strongles et les lots non infestés. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Yacob *et al.* [129] qui suggéraient que l'inflammation d'une muqueuse donnée était responsable de l'inflammation généralisée de l'ensemble des muqueuses de l'organisme, le mécanisme mis en jeu n'ayant pas encore été entièrement élucidé.

Des études immunocytochimiques ont permis de mettre en évidence la participation d'autres types cellulaires tels que les lymphocytes T, les lymphocytes B et certaines cellules phagocytaires lors d'infestations répétées par *O. ovis* (*cf. supra*) [34]. Ce profil cellulaire suggère alors une production de cytokines de type TH2, ce qui a été largement démontré dans le cas de parasitisme gastro-intestinal [60, 102, 128]. Dans cette étude, l'élévation des populations de GE au niveau du site d'infestation est accompagnée de l'augmentation des concentrations en GE circulants, marqueurs de résistance [103]. Ces cellules sont retrouvées en grande quantité dans les mécanismes d'HS1 [6] ainsi que dans les RI de type TH2 [47, 82]. Cette élévation des quantités de GE est due à l'action de l'IL-5, responsable de la stimulation de l'éosinophilopoïèse, conjointement aux actions de l'ECF et du PAF, facteurs chimiotactiques synthétisés par les mastocytes (*cf. supra*).

Les infestations successives par des larves d'*O. ovis* entraînent une augmentation significative de la concentration en protéines totales. Cette élévation est la conséquence d'un état inflammatoire. Les macrophages stimulés produisent des cytokines, comme l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ , activant le métabolisme des hépatocytes [55, 75]. Les cellules hépatiques produisent ainsi des protéines de la phase aiguë (PPA) comme la Cp, dont la concentration des lots infestés est significativement plus élevée que celle des lots non infestés. De telles globulines (Cp et  $\alpha$ -1-AT) ont été retrouvées dans la composition des exsudats cutanés de moutons infestés par *Lucilia cuprina* [94]. Chez les individus résistants, la Cp et l' $\alpha$ -1-AT ont été retrouvées en plus grande quantité et de façon plus précoce que chez les individus sensibles [94]. Ces analyses avaient conclu aux résultats de synthèses locales. Nos études permettent d'infirmier cette hypothèse et de favoriser celle d'une production de PPA par le foie.

Les infestations multiples par ces larves de diptères sont également responsables de la production d'Ig par les plasmocytes. Ces derniers seraient issus de la différenciation de lymphocytes B suite à leur interaction avec des LTh2 (*cf.* Figure 5). Aucune corrélation nous permet d'affirmer qu'il s'agisse d'un critère de résistance à *O. ovis*.

## 2 Mécanisme de la RI mis en jeu au cours de parasitisme gastro-intestinal par *H. contortus* et *T. circumcincta*

### 2.1 Mise en évidence d'une réaction inflammatoire locale

L'étude réalisée par Terefe *et al.* [127] a permis de confirmer les résultats d'expériences précédentes en ce qui concerne la mise en évidence d'une RI locale. En effet, il a été démontré que, suite à des infestations gastro-intestinales, on pouvait voir apparaître des cellules inflammatoires (GE, GL et mastocytes) infiltrant la muqueuse abomasale [64, 102]. Contrairement à ce qui avait été démontré par Yacob *et al.* [129], l'inflammation de la muqueuse gastrique, consécutive à l'établissement des strongles, n'entraîne pas le recrutement de cellules réactionnelles au niveau de la muqueuse nasale. La mise en évidence de concentrations en IgG et IgA, au niveau local, plus élevées chez les moutons infestés que chez des moutons indemnes, permet de conclure que ces Ac pourraient jouer un rôle important dans la RI de l'hôte par rapport au parasite. Ces résultats convergent avec ceux obtenus précédemment [3, 40, 114, 120], montrant que les Ig seraient impliquées dans les phénomènes de résistance face à une primo-infestation. Cependant, nos études n'étant pas en mesure de démontrer des corrélations significatives avec des caractéristiques biologiques des nématodes, cette hypothèse semble être controversée. Les augmentations en pepsinogène plasmatique sont également les témoins d'une inflammation de la muqueuse caractérisée par une augmentation de perméabilité. Cette modification de l'intégrité de la barrière épithéliale est due à l'action conjointe des nématodes eux-mêmes (actions mécanique et traumatique) et des médiateurs pré-formés ou issus du métabolisme de l'acide arachidonique.

### 2.2 Existence d'une RI systémique

L'ensemble des acteurs cellulaires sus-cités et mis en évidence dans nos expériences permet de confirmer les hypothèses émises sur les mécanismes entrant en jeu dans ce type d'infestation. On peut ainsi être confronté à des réactions d'HS1 et/ou de type TH2 (*cf. supra*) caractérisées par certaines cytokines, en particulier l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  [1, 47, 128]. L'ensemble de ces phénomènes est responsable, dans la plupart des cas, de l'expulsion des parasites. Ce type d'immunité semble alors être protecteur contre des parasites extra-cellulaires.

Si les mécanismes cellulaires paraissent identiques d'une parasitose à l'autre, les conséquences biochimiques sont différentes. En effet, une infestation simple par des strongles n'entraîne aucune modification, ni de la concentration en protéines totales, ni du métabolisme des PPA. On peut ainsi émettre deux hypothèses :

- soit la RI est de plus faible intensité lors d'infestations par des nématodes gastriques ;
- soit, comme cela a déjà été décrit [23], l'inversion du rapport albumine/globuline entraîne une conservation de la concentration totale en protéines.

### 3 Mécanisme de la réaction inflammatoire mis en jeu lors de co-infestations parasitaires

#### 3.1 Influence de l'œstrose sur les nématodes *H. contortus* et *T. circumcincta* (cf. Figure 15)

##### a Conséquences sur le parasite

Dans notre étude, la présence de deux sortes de parasites interagit de nombreuses façons avec les mécanismes de défense de l'hôte dirigés contre l'un ou l'autre. Il a été démontré que des infestations répétées par des larves d'*O. ovis* avaient une influence importante sur le développement, la fécondité et la taille des nématodes femelles [30, 129]. Ceci a tout d'abord été évalué par le dosage du pepsinogène plasmatique, dont la concentration moyenne des lots OH et OT était plus faible que celle des lots H et T, mettant en évidence un retard de maturation induit par la présence des larves d'œstres. Par la suite, les coproscopies ont révélé du nombre moyen d'œufs des lots co-infestés inférieur à celui des lots seulement infestés par les strongles. Enfin, les autopsies ont permis de mettre en évidence une charge parasitaire inférieure pour les lots OT et OH. Parallèlement au recrutement et à la stimulation de cellules inflammatoires (GE, mastocytes...) et de leurs médiateurs (leucotriènes, PG, Ig...) au niveau de la muqueuse nasale, on observe des modifications identiques au niveau des muqueuses digestives. Cela crée un environnement défavorable à l'établissement des nématodes qui voient leur niche écologique modifiée [30, 129].

##### b Conséquences sur l'hôte

Si l'œstrose a des effets délétères sur l'établissement et le développement des parasites gastro-intestinaux, elle confère à l'hôte une certaine résistance face à de nouvelles infestations. C'est ce que nous montrent les suivis de la protéinémie et des hématocrites. A l'instar des résultats d'études précédentes [2], les lots OH et OT arrivent à plus facilement maintenir leur hématocrite ; ainsi, les moutons présentent une anémie moins sévère et le pronostic devient plus favorable. Les larves d'œstres pré-sensibilisent l'hôte ; les cellules inflammatoires interviennent alors plus précocement, ce qui diminue considérablement les effets délétères sur l'hôte. Les médiateurs libérés par les mastocytes et les GE, dans le but de modifier l'environnement des nématodes et d'entraîner leur expulsion, ont également des effets néfastes sur le mouton. En permettant la fuite d'Ac anti-nématodes, ils entraînent, à moyen terme, d'importantes pertes en albumine et globulines, perturbant ainsi la pression oncotique du secteur vasculaire, responsable de l'apparition d'œdème froid, notamment dans la région de l'auge [62, 63, 102]. Lors de co-infestations avec des larves de diptères, cette hypoprotéinémie est amoindrie. Cela peut s'expliquer par une charge parasitaire moins importante et donc par des pertes sanguines quotidiennes diminuées accompagnées d'une RI atténuée.

### 3.2 Influence des strongyloses gastriques sur l'œstrose ovine (cf. Figure 15)

#### a Conséquences sur la biologie du parasite

La présence de nématodes tels que *H. contortus* et *T. circumcincta* ne semble avoir aucune conséquence sur la biologie des larves d'*O. ovis*. Cela suggère que les interactions entre les parasites ne sont pas réciproques. Ceci est en accord avec d'autres études utilisant comme modèle des nématodes tels que *Trichostrongylus colubriformis* ou *H. contortus* [30, 129].

#### b Conséquences sur les infiltrations cellulaires

Contrairement à ce qui a été montré par Jacob *et al.* [129] sur le modèle *Trichostrongylus colubriformis*/*O. ovis*, les infiltrations des muqueuses fundique et pylorique suite à l'inoculation de 5 000 L3 n'entraînent pas l'infiltration de la muqueuse pituitaire des lots H et T.

La RI induite par les larves de diptères, de type HS1 et/ou de type TH2, semble être de plus forte intensité que celle induite par les strongles. Les deux types de parasites ne tirent pas le même profit de cette réaction de défense de l'hôte. Les larves d'œstres recherchent un équilibre entre une RI permettant une production suffisante d'exsudats, servant de substrat nutritionnel pour les larves, et une RI n'entraînant pas leur expulsion. Dans le cas des strongles abomasaux, leur but est de provoquer la RI la plus faible possible afin de pouvoir tirer le plus profit possible de l'hôte, dont ils ingèrent le sang. Dans les deux cas, les parasites ont l'aptitude de contrôler plus ou moins la RI de l'hôte par des mécanismes d'échappement. Ainsi, au terme de la RI, les parasites sont toujours présents, en plus faible quantité et de façon plus discrète. Ils semblent ainsi ne plus être reconnus par les mécanismes de défense de l'hôte mis en place pour identifier des molécules antigéniques faisant partie du non-soi. Les parasites sont ainsi capables de rentrer en hypobiose (au stade L4 pour les strongles et L1 pour les œstres) et de ralentir leur développement. Ce mécanisme est caractérisé par une diminution de la sécrétion d'Ag, issus des glandes salivaires et/ou du tube digestif, pendant ces périodes durant lesquelles le métabolisme parasitaire est ralenti [124]. Certains nématodes peuvent également se recouvrir de molécules libérées au cours de la RI de l'hôte telles que les fractions C3 du complément ou encore dégrader les Ig anti-parasites en sécrétant des protéases spécifiques [86, 102, 104]. En résumé, la RI développée par l'hôte à l'encontre des larves d'œstres est de forte intensité et présente des effets délétères à la fois pour le parasite, même si celui-ci arrive à en tirer profit, et pour le mouton qui développe alors des états d'HS et des signes cliniques plus ou moins sévères (*cf. supra*). Quant à la RI systémique développée par l'hôte à l'encontre des nématodes, elle est de faible intensité et présente peu d'effets néfastes sur les parasites et sur l'hôte, qui présente peu de signes cliniques (cas d'infestations par *T. circumcincta*) et peu de modifications de ses paramètres sanguins. Dans l'hæmonchose, l'important caractère spoliateur du parasite peut cependant être fatal pour l'hôte ; malgré tout, cette particularité peut être largement atténuée par la présence de larves d'*O. ovis* dans les cavités nasales.

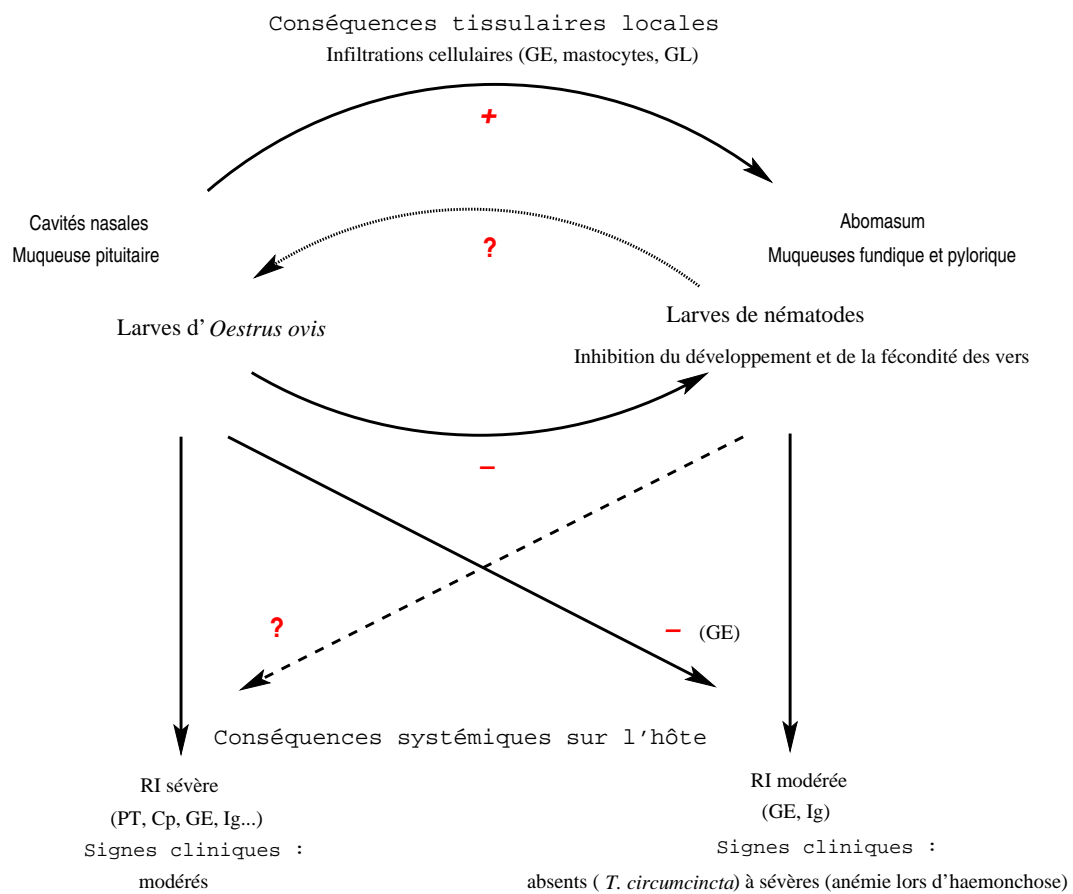


FIGURE 15 – Synthèse des interactions entre les larves d'*O. ovis* et de nématodes, au niveau local et systémique, et conséquences sur la RI de l'hôte.

Cp : céruloplasmine, GL : globule leucocyte, GE : granulocyte éosinophile, Ig : immunoglobuline, PT : protéines totales.





## Conclusion

L'originalité de cette étude est caractérisée par l'exploration, chez le mouton, des conséquences biochimiques lors de mono- ou de poly-infestations par des larves d'*Cestrus ovis* et/ou par des larves de strongles tels qu'*Hæmonchus contortus* ou *Teladorsagia circumcincta*. La réaction inflammatoire, définie comme une réaction physiologique de défense de l'organisme [75], est caractérisée, de façon non spécifique, par une élévation des protéines totales sériques et par des modifications du métabolisme de certaines protéines de la phase aiguë, telles que la céruloplasmine et l' $\alpha$ -1-antitrypsine [67, 50]. Quelques études ont permis de montrer l'existence de telles variations lors d'infestations de moutons par un parasite de l'intestin grêle *Trichostrongylus colubriformis* [23]. Les résultats de nos expériences ont permis de préciser ceux obtenus par O'Meara *et al.* [94], qui révélèrent la présence des protéines de la phase aiguë sus-citées dans les exsudats cutanés de moutons infestés par des larves de *Lucilia cuprina*. Ils ont également permis de supposer que l'hyperprotéïnémie obtenue était due à des augmentations des concentrations en  $\alpha$ -2-globulines, en particulier en céruloplasmine. Cette dernière, connue pour être un bon marqueur d'infections bactériennes chez le mouton [22, 99, 98], apparaît ici comme un marqueur assez spécifique de poly-infestations par des larves d'*Cestrus ovis*, avec d'éventuelles applications pratiques en médecine vétérinaire. *A contrario*, l' $\alpha$ -1-antitrypsine ne semble présenter aucun intérêt dans la détection de foyers inflammatoires d'origine parasitaire. Dans le cadre de cette étude, le métabolisme d'autres protéines de la phase aiguë lors de parasitoses gastro-intestinales reste encore à explorer et en particulier, celui de l'haptoglobuline, protéine de la phase aiguë, dont la cinétique d'évolution est plus rapide que celle de la céruloplasmine et qui semble impliquée dans bon nombre de réactions inflammatoires chez les ruminants [22, 45, 55].

Ces études, en collaboration avec celles menées par Terefe *et al.* [127], s'insèrent dans un ensemble de recherches ayant pour objectifs d'identifier les interactions à distance du parasitisme [30, 129]. En effet, bien que les deux types de parasites étudiés n'occupent pas les mêmes niches écologiques, ces derniers semblent tout de même entrer en compétition. On a ainsi réussi à mettre en évidence que des infestations répétées par des larves de diptères avaient d'importantes conséquences défavorables sur le développement et la fécondité des strongles et *a fortiori*, d'un point de vue épidémiologique, sur la contamination des pâtures. Ainsi, la réaction inflammatoire locale consécutive au développement des larves d'œstres, mettant en jeu de nombreux types cellulaires et médiateurs, semble se généraliser aux muqueuses fundique et pylorique.

De plus, les individus parasités par *Cæstrus ovis* semblent développer une certaine résistance (évaluée par différents paramètres tels que l'hématocrite, les protéines totales, les granulocytes éosinophiles, le pepsinogène...) aux infestations par *Hæmonchus contortus* ou *Teladorsagia circumcincta*. En ce qui concerne les effets inverses, des études précédentes ont mis en évidence la plus forte sensibilité à *Cæstrus ovis* des ovins sélectionnés pour leur résistance face aux nématodes digestifs [130]. Les situations de co-infestation par des nématodes et des larves de diptères sont des situations assez courantes dans le sud de l'Europe et dans les régions tropicales. Ainsi, ce type de recherches permet de mettre en œuvre des programmes de sélection génétique visant à obtenir des individus résistants à un parasite donné, alternative à l'utilisation de molécules anti-parasitaires.





# Bibliographie

- [1] A.K. Abbas, K.M. Murphy, and A. Sher. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 1996, 383 : 787–793.
- [2] W. Abebe, P. Jacquet, C. Duranton, J.P. Bergeaud, and P. Dorchies. Evolution des réponses individuelles chez le mouton (production d’anticorps, excrétion d’œufs et hématocrite) lors de deux infestations expérimentales successives par *Hæmonchus contortus*. *Revue Méd. Vét.*, 1997, 148(11) : 873–878.
- [3] D.B. Adams and K.J. Beh. Immunity acquired by sheep from an experimental infection with *Hæmonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.*, 1981, 11(5) : 381–386.
- [4] A.F.T. Amarante, P.A. Bricarello, R.A. Rocha, and S.M. Gennari. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Vet. Parasitol.*, 2004, 120 : 91–106.
- [5] D. Artis, N.E. Humphreys, A.J. Bancroft, N.J. Rothwell, C.S. Potten, and R.K. Grencis. Tumor necrosis factor  $\alpha$  is a critical component of interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 responses during helminth infection. *J. Exp. Med.*, 1999, 190(7) : 953–962.
- [6] M-T. Baixench and J-F. Magnaval. Eosinophiles, IgE et helminthiases. *Rev. Méd. Vét.*, 1993, 144(12) : 967–974.
- [7] M. Benoist. *Etude critique des techniques de mesure de la protéinémie chez le cheval*. Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, 2001.
- [8] J. Benveniste. L’hypersensibilité immédiate. In J.F. Bach, editor, *Immunologie*. Flammarion médecine-sciences, 3<sup>ème</sup> édition, 1986, pages 585–600.
- [9] C. Blackshaw. The measurement of serum hæmoglobin reactive protein in selected groups of cattle and its use in clinical practice. *N.Z. Vet. J.*, 1979, 27 : 103–105.
- [10] F.S. Blaisdell and W.J. Dodds. Evaluation of two microhematocrit methods for quantitating plasma fibrinogen. *JAVMA*, 1977, 171(4) : 340–342.
- [11] V.M. Bowles, J.P. Feehan, and R.M. Sandeman. Sheep plasma protease inhibitors influencing protease activity and growth of *Lucilia cuprina* larvæ *in vitro*. *Int. J. Parasitol.*, 1990, 20(2) : 169–174.

- [12] B.M. Buddle, G. Jowett, R.S. Green, P.G.C Douch, and P.L. Risdon. Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. *Int. J. Parasitol.*, 1992, 22(7) : 955–960.
- [13] A.E. Butterworth, R.F. Sturrock, V. Houba, A.A.F. Mahmoud, A. Sher, and P.H. Rees. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature*, 1975, 256(28) : 727–728.
- [14] L. Calabrese, E. Capuozzo, A. Galtieri, and E. Bellocco. Sheep ceruloplasmin isolation and characterization. *Mol. Cell. Biochem.*, 1983, 51 : 129–132.
- [15] S. Caracappa, S. Rilli, P. Zanghi, V. Di Marco, and P. Dorchies. Epidemiology of ovine oestrosis (*Cæstrus ovis* Linné 1761, Diptera : Cæstridæ) in Sicily. *Vet. Parasitol.*, 2000, 92 : 233–237.
- [16] J-M. Cavaillon. *Les cytokines*. Masson, 2<sup>ème</sup> edition, 1993, 589 p.
- [17] J-P. Chabornac, J. Barnouin, and T. Raboisson. Micro-dosage automatisé de la céruloplasmine plasmatique par mesure de l'activité oxydasique chez les bovins et les ovins. *Reprod. Nut. Dév.*, 1986, 26 (2A) : 417–427.
- [18] M.G. Christie. The fate of very large doses of *Hæmonchus contortus* in the ovine abomasum. *J. Comp. Pathol.*, 1970, 80 : 89–100.
- [19] R.L. Coffman, B.W.P. Seymour, S. Hudak, J. Jackson, and D. Rennick. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science*, 1989, 245 : 308–310.
- [20] E.H. Coles. Liver function. In E.H. Coles, editor, *Veterinary clinical pathology*. W.B. Saunders company, 3<sup>ème</sup> edition, 1980, pages 183–216.
- [21] J.G. Conner and P.D. Eckersall. Bovine acute phase response following turpentine injection. *Res. Vet. Sci.*, 1988, 44 : 82–88.
- [22] J.G. Conner, P.D. Eckersall, A. Wiseman, R.K. Bain, and T.A. Douglas. Acute phase response in calves following infection with *Pasteurella hæmolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration. *Res. vet. sci.*, 1989, 47 : 203–207.
- [23] R.L. Coop, A.R. Sykes, and K.W. Angus. Subclinical trichostrongylosis in growing lambs produced by continous larval dosing. the effect on performance and certain plasma constituents. *Res. Vet. Sci.*, 1976, 21 : 253–258.
- [24] H.J.S. Dawkins, R.G. Windon, and G.K. Eagleson. Eosinophil responses in sheep selected for high and low responsiveness to *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.*, 1989, 19(2) : 199–205.
- [25] J.P. De Boer, A.A. Creasey, A. Chang, J.J. Abbink, D. Roem, A.J.M. Eerenberg, C.E. Hack, and F.B. Taylor Jr.  $\alpha$ -2-macroglobulin functions as an inhibitor of fibrinolytic, clotting and neutrophilic proteinases in sepsis: studies using a baboon model. *Infect. Immun.*, 1993, 61(12) : 5035–5043.

- [26] M. Delverdier, L. Bret, I. Raymond, and J.P. Magnol. La réaction inflammatoire : dynamique et signification biologique. *Prat. Med. Chir. Anim. Comp.*, 1993, 28 : 589–603.
- [27] D. Dietz. Use of  $\alpha$ -n-benzoyl-l-arginine-p-nitroanilide as trypsin substrate in estimation of  $\alpha$ -1-antitrypsin. *Clin. Chem.*, 1976, 22(10) : 1754–1755.
- [28] D. Dietz and H. Rubinstein. Measurement of  $\alpha$ -1-antitrypsin in serum by immunodiffusion and by enzymatic assay. *Clin. Chem.*, 1974, 20(3) : 396–399.
- [29] L. Dolbois-Charrier and P. Dorchies. Œstrose ovine : éosinophiles et mastocytes de la pituitaire. *Vet. Res.*, 1993, 24 : 362–363.
- [30] P. Dorchies. Comparative physiopathology of *Cæstrus ovis* (Linné 1761) myiasis in man and animals. *Bull. Acad. Natl. Med.*, 1997, 181(4) : 673–683.
- [31] P. Dorchies, J-P. Bergeaud, G. Tabouret, C. Duranton, F. Prevot, and P. Jacquet. Prevalence and larval burden of *Cæstrus ovis* (Linné 1761) in sheep and goats in northern mediterranean region of France. *Vet. Parasitol.*, 2000, 88 : 269–273.
- [32] P. Dorchies, J.P. Bergeaud, V.K. Nguyen, and S. Morand. Reduced egg count in mixed infection with *Cæstrus ovis* and *Hæmonchus contortus* : influence of eosinophils. *Parasitol. Res.*, 1997, 83 : 727–730.
- [33] P. Dorchies, C. Duranton, and P. Jacquet. Pathophysiology of *Cæstrus ovis* infection in sheep and goats : a review. *Vet. Rec.*, 1998, 142 : 487–489.
- [34] P. Dorchies, G. Tabouret, H. Hoste, and P. Jacquet. Larval interactions of *Cæstrus ovis* in sheep and goats. *Unpublished data*, 2003.
- [35] P.G.C. Douch, G.B.L. Harrison, L.L. Buchanan, and K.S. Greer. *In vitro* bioassay of sheep gastrointestinal mucus for nematode paralysing activity mediated by substances with some properties characteristic of SRS-A. *Int. J. Parasitol.*, 1993, 13(2) : 207–212.
- [36] P.G.C. Douch, G.B.L. Harrison, D.C. Elliott, and L.L. Buchanan. Relationship of gastrointestinal histology and mucus antiparasite activity with the development of resistance to trichostrongyle infections in sheep. *Vet. Parasitol.*, 1986, 20 : 315–331.
- [37] P.G.C. Douch and P.E. Morum. The effect of age on the response of Romney sheep to gastrointestinal nematodes during grazing. *Int. J. Parasitol.*, 1993, 23(5) : 651–655.
- [38] P.G.C. Douch, P.E. Morum, and B. Rabel. Secretion of anti-parasite substances and leukotrienes from ovine gastrointestinal tissues and isolated mucosal mast cells. *Int. J. Parasitol.*, 1996, 26(2) : 205–211.
- [39] S. Dubucquoi, P. Desreumaux, A. Janin, O. Klein, M. Goldman, J. Tavernier, A. Capron, and M. Capron. Interleukin-5 synthesis by eosinophils : association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J. Exp. Med.*, 1994, 179 : 703–708.
- [40] J.L. Duncan, W.D. Smith, and J.D. Dargie. Possible relationship of levels of mucosal IgA and serum IgG to immune unresponsiveness of lambs to *Hæmonchus contortus*. *Vet. Parasitol.*, 1978, 4 : 21–27.

- [41] D.L. Dungworth. The respiratory system. In K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy, and N. Palmer, editors, *Pathology of domestic animals*, volume 2. Academic press, 3<sup>ème</sup> edition, 1985, pages 413–556.
- [42] C. Duranton and P. Dorchies. *In vitro* culture of *Cæstrus ovis* (Linné 1761) first instar larvæ : its application to antiparasitic drug screening. *Int. J. Parasitol.*, 1997, 27(1) : 125–128.
- [43] C. Duranton, P. Dorchies, S. Grand, C. Lesure, and I.P. Oswald. Changing reactivity of caprine and ovine mononuclear phagocytes throughout part of the life cycle of *Cæstrus ovis* : assessment through spontaneous and inductible NO production. *Vet. Res.*, 1999, 30 : 371–376.
- [44] S.K. Durum and J.J. Oppenheim. Macrophage-derived mediators : interleukin-1, tumor necrosis factor, interleukin-6, interferon and related cytokines. In W.E. Paul, editor, *Fundamental immunology*. Raven press, 2<sup>ème</sup> edition, 1989, pages 639–656.
- [45] P.D. Eckersall. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Rev. Méd. Vét.*, 2000, 151(7) : 577–584.
- [46] P.D. Eckersall and J.G. Conner. Bovine and canine acute phase proteins. *Vet. Res. Comm.*, 1988, 12(2-3) : 169–178.
- [47] K.J. Else and F.D. Finkelman. Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *Int. J. Parasitol.*, 1998, 28 : 1145–1158.
- [48] K.J. Else, F.D. Finkelman, C.R. Maliszewski, and R.K. Grencis. Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. *J. Exp. Med.*, 1994, 179 : 347–351.
- [49] D.L. Emery, B.M. Wagland, and S.J. MacClure. Rejection of heterologous nematodes by sheep immunised with larval or adult *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.*, 1993, 23(7) : 841–846.
- [50] R. Engler. Protéines de la réaction inflammatoire, fonctions régulatrices. *Ann. Biol. Clin.*, 1988, 46 : 336–342.
- [51] M.T. Fox. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants : recent development. *Vet. Parasitol.*, 1997, 72 : 285–308.
- [52] J.I. Gallin. Inflammation. In W.E. Paul, editor, *Fundamental Immunology*. Raven Press, 2<sup>ème</sup> edition, 1989, pages 721–733.
- [53] J.I. Gallin, I.M. Goldstein, and R. Snyderman. *Inflammation : basic principles and clinical correlates*. Raven press - New-York, 2<sup>ème</sup> edition, 1992, 1186 p.
- [54] M.W. Gregory. The globule leucocyte and parasitic infection — a brief history. *Vet. Bull.*, 1979, 49(11) : 821–827.
- [55] E. Gruys, M.J. Obwolo, and M.J.M. Toussaint. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry : a review. *Vet. Bull.*, 1994, 64(11) : 1009–1018.



- [56] G.B.L. Harrison, H.D. Pulford, T.K. Gatehouse, R.J. Shaw, A. Pfeffer, and C.B. Shoemaker. Studies on the role of mucus and mucosal hypersensitivity reactions during rejection of *Trichostrongylus colubriformis* from the intestine of immune sheep using an experimental challenge model. *Int. J. Parasitol.*, 1999, 29 : 459–468.
- [57] W.J. Horng and J.C. Gan. Purification and characterization of human plasma  $\alpha$ -1-antitrypsin. *Texas Rep. Biol. Med.*, 1974, 32(2) : 489–504.
- [58] L. Innocenti, M. Masseti, G. Macchioni, and F. Giorgi. Larval salivary gland proteins of the sheep nasal bow fly (*Cestrus ovis*) are major immunogens in infested sheep. *Vet. Parasitol.*, 1995, 60 : 273–282.
- [59] M.S. Jagannath, Nurulla Cozab, and S.K. Vijayarathi. Histopathological changes in the nasal passages of sheep and goats infested with *Cestrus ovis* (Diptera : Cestridae). *Indian J. Anim. Sci.*, 1989, 59(1) : 87–91.
- [60] D. Jankovic, A. Sher, and G. Yap. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection : decision making by committee. *Curr. Opin. Immunol.*, 2001, 13(4) : 403–409.
- [61] G.E. Jones and D.L. Mould. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. *Res. Vet. Sci.*, 1984, 37 : 87–92.
- [62] W.O. Jones and D.L. Emery. Demonstration of a range of inflammatory mediators released in trichostrongylosis of sheep. *Int. J. Parasitol.*, 1991, 21(3) : 361–363.
- [63] W.O. Jones, D.L. Emery, S.J. McClure, and B.M. Wagland. Changes in inflammatory mediators and larval inhibitory activity in intestinal contents and mucus during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.*, 1994, 24(4) : 519–525.
- [64] W.O. Jones, J.F. Huntley, and D.L. Emery. Isolation and granulation of mucosal mast cells from the small intestine of parasitized sheep. *Int. J. Parasitol.*, 1992, 22(4) : 519–521.
- [65] W.O. Jones, R.G. Windon, J.W. Steel, and P.M. Outteridge. Histamine and leukotriene concentrations in duodenal tissue and mucus of lambs selected for high and low responsiveness to vaccination and challenge with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.*, 1990, 20(8) : 1075–1079.
- [66] W.H. Busby JR and J.C. Travis. Structure and evolution of artiodactyla haptoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1977, 60B : 389–396.
- [67] J.J. Kaneko. Serum proteins and the dysproteinemias. In J.J. Kaneko, J. Harvey, and M. Bruss, editors, *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic Press, 5<sup>ème</sup> edition, 1997, pages 117–138.
- [68] T. Kassai. Part 1, phylum : Nematelminthes, class : Nematoda, order : Strongylida, trichostrongylidosis : parasitic gastroenteritis of ruminants. In T. Kassai, editor, *Veterinary helminthology*. Butterworth Heinemann, 1999, pages 75–82.

- [69] J. Kaufmann. Respiratory system, arthropods. In J. Kaufmann, editor, *Parasitic infections of domestic animals: a diagnosis manual*. Birkhäuser, 1996, pages 183–184.
- [70] J.D. Kelly and J.K. Dineen. Prostaglandins in the gastrointestinal tract evidence for a role in worm expulsion. *Aust. Vet. J.*, 1976, 52 : 391–397.
- [71] T. Klumpp. Détermination enzymatique de l'activité antitrypsique du sérum sur analyseur centrifuge. *Ann. Biol. Clin.*, 1977, 35 : 221–226.
- [72] C.H. Konings. Measurement of antitrypsic activity of serum with a centrifugal analyser. *Clin. Chem.*, 1977, 23(9) : 1760–1763.
- [73] J.W.A. Larsen, N. Anderson, A.L. Vizard, G.A. Anderson, and H. Hoste. Diarrhoea in Merino ewes during winter : association with trichostrongylid larvae. *Aust. Vet. J.*, 1994, 71(11) : 365–372.
- [74] C.B. Laurell. Acute phase proteins — a group of protective proteins. *Recent Adv. Clin. Biochem.*, 1985, pages 103–124.
- [75] P-E. Laurent. Induction et régulation de la réaction inflammatoire systémique. *Ann. Biol. Clin.*, 1988, 46 : 329–355.
- [76] D.E.B. Lawton, G.W. Reynolds, S.M. Hodgkinson, W.E. Pomroy, and H.V. Simpson. Infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta* : effects on abomasal pH and serum gastrin and pepsinogen. *Int. J. Parasitol.*, 1996, 26(10) : 1063–1074.
- [77] R.M. Locksley. Th2 cells : help for helminths. *J. Exp. Med.*, 1994, 179 : 1405–1407.
- [78] O. Lowry, N.J. Rosbrough, A.L. Fan, and R.J. Randal. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193 : 265–275.
- [79] J.A. MacDiarmid, R. Clarke, S.J. McClure, F.R. Bowen, and D.H. Burrell. Use a monoclonal antibody to ovine IgE for fly strike studies in sheep. *Int. J. Parasitol.*, 1995, 25(12) : 1505–1507.
- [80] S.J. McClure, D.L. Emery, B.M. Wagland, and W.O. Jones. A serial study of rejection of *Trichostrongylus colubriformis* by immune sheep. *Int. J. Parasitol.*, 1992, 22(2) : 227–234.
- [81] E.N.T. Meeusen and A. Balic. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol. Today*, 2000, 16(3) : 95–101.
- [82] N.T. Meeusen. Immunology of helminth infections with special reference to immunopathology. *Vet. Parasitol.*, 1999, 84 : 259–273.
- [83] P. Metais, J. Agneray, G. Ferard, J-C. Fruchart, J-C. Jardillier, A. Revol, G. Siest, and A. Staht. Protéines. In P. Metais, J. Agneray, G. Ferard, J-C. Fruchart, J-C. Jardillier, A. Revol, G. Siest, and A. Staht, editors, *Biochimie clinique, 1-Biochimie analytique*. Simep, 2<sup>ème</sup> édition, 1990, pages 114–163.

- [84] D.J. Meyer and J.W. Harvey. Hematopoiesis and evaluation of bone marrow. In D.J. Meyer and J.W. Harvey, editors, *Veterinary laboratory medicine : interpretation and diagnosis*. W.B. Saunders company, 2<sup>ème</sup> edition, 1998, pages 23–42.
- [85] H.R.P. Miller. The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1984, 6 : 167–259.
- [86] H.R.P. Miller. Prospects for the immunological control of ruminant gastrointestinal nematodes : natural immunity, can it be harnessed ? *Int. J. Parasitol.*, 1996, 26(8/9) : 801–811.
- [87] H.R.P. Miller, F. Jackson, G. Newlands, and W.T. Appleyard. Immune exclusion, a mechanism of protection against the ovine nematode *Hæmonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.*, 1983, 35 : 357–363.
- [88] R. Mistry, P.D. Snashall, N. Totty, A. Guz, and T.D. Tetley. Isolation and characterization of sheep  $\alpha$ -1-proteinase inhibitor. *Biochem. J.*, 1991, 273 : 685–690.
- [89] J. Moretti and R. Donati. Préparation et propriétés de l'haptoglobine de mouton. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1973, 277 : 677–680.
- [90] V-K. Nguyen. *Etude des populations de mastocytes et de granulocytes éosinophiles dans les muqueuses respiratoires supérieures des ruminants infestés par des larves d'œstridés : *Cæstrus ovis* (Linné 1758) et *Cephalopina titillator* (Clark 1816)*. Mémoire de maîtrise ès sciences vétérinaires, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, 1997.
- [91] V-K. Nguyen, N. Bourges, D. Concordet, and P. Dorchies. Mastocytes et éosinophiles de la muqueuse respiratoire du mouton infesté par *Cæstrus ovis* (Linné 1761). *Parasite*, 1996, 3 : 217–221.
- [92] V-K. Nguyen, M. Delverdier, P. Jacquiet, M-F. Amardeilh, and P. Dorchies. Expression tissulaire de l'épitope Ki67 dans le compartiment épithélial de la muqueuse nasale du mouton et de la chèvre infestés naturellement par *Cæstrus ovis* (Linné 1761). *Rev. Méd. Vét.*, 1998, 149(12) : 1109–1113.
- [93] V-K. Nguyen, P. Jacquiet, C. Duranton, J-P. Bergeaud, F. Prevot, and P. Dorchies. Réactions cellulaires des muqueuses nasales et sinusales des chèvres et des moutons à l'infestation naturelle par *Cæstrus ovis*, Linné 1758 (Diptera : Cestridés). *Parasite*, 1999, 2 : 141–149.
- [94] T.J. O'Meara, M. Nesa, D.S. Seaton, and R.M. Sandeman. A comparison of inflammatory exsudates released from myiasis wounds on sheep bred for resistance or susceptibility to *Lucilia cuprina*. *Vet. Parasitol.*, 1995, 56 : 207–223.
- [95] R. Pannell, D. Johnson, and J. Travis. Isolation and properties of human plasma  $\alpha$ -1-proteinase inhibitor. *Biochemistry*, 1974, 13(26) : 5439–5444.
- [96] E. Papadopoulos, F. Prevot, P. Jacquiet, C. Duranton, J.P. Bergeaud, E. Kalaitzakis, and P. Dorchies. Seasonal variation of *Cæstrus ovis*-specific antibodies in sheep and goats mixed flocks in Greece. *Vet. Parasitol.*, 2001, 95 : 73–77.

- [97] M.B. Pepyys and M.L. Baltz. Acute phase proteins. *Adv. Immunol.*, 1983, 34 : 141–212.
- [98] A. Pfeffer and K.M. Rogers. Acute phase response of sheep : changes in the concentration of ceruloplasmin, fibrinogen, haptoglobin and the major blood cell types associated with pulmonary damage. *Res. Vet. Sci.*, 1989, 46 : 118–124.
- [99] A. Pfeffer, K.M. Rogers, L. O’Keeffe, and P.J. Osborn. Acute phase protein response, food intake, liveweight change and lesions following intrathoracic injection of yeast in sheep. *Res. Vet. Sci.*, 1993, 55 : 360–366.
- [100] E. Porto and J. Moretti. Perturbation du dosage de l’haptoglobine dans le sérum de mouton en réaction inflammatoire. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1971, 272 : 643–646.
- [101] J.P. Raynaud. Etude de l’efficacité d’une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1970, 45 : 321–342.
- [102] T.L.W. Rothwell. Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. *Int. J. Parasitol.*, 1989, 19(2) : 139–168.
- [103] T.L.W. Rothwell, R.G. Windon, B.A. Horsburgh, and B.H. Anderson. Relationship between eosinophilia and responsiveness to infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.*, 1993, 23(2) : 203–211.
- [104] R.M. Sandeman, R.A. Chandler, N. Turner, and D.S. Seaton. Antibody degradation in wound exsudates from bowfly infections on sheep. *Int. J. Parasitol.*, 1995, 25(5) : 621–628.
- [105] C. Sapan, R. Lundblad, and C. Price. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1999, 29 : 99–108.
- [106] H.D.F.H. Schallig, S. Hornok, and J.B.W.J. Cornelissen. Comparison of two enzyme immunoassays for the detection of *Hæmonchus contortus* infections in sheep. *Vet. Parasitol.*, 1995, 57 : 329–338.
- [107] H.D. Schalling. Immunological responses of sheep to *Hæmonchus contortus*. *Parasitology*, 2000, 120 : 63–72.
- [108] I. Scott, S. Khalaf, D.C. Simcock, C.G. Knight, G.W. Reynolds, W.E. Pomroy, and H.V. Simpson. A sequential study of the pathology associated with the infection of sheep with the adult and larval *Ostertagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.*, 2000, 89 : 79–94.
- [109] U. Sinha, S. Sinha, and A. Janoff. Characterization of sheep  $\alpha$ -1-proteinase inhibitor. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1988, 137 : 558–563.
- [110] J.G. Skinner, R.A.L.I. Brown, and L. Roberts. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. *Vet. Rec.*, 1991, 128 : 147–149.
- [111] J.G. Skinner and L. Roberts. Haptoglobin as an indicator of infection in sheep. *Vet. Rec.*, 1994, 134(8) : 33–36.

- [112] B.S.W. Smith and H. Wright. Improved manual and automated procedures for estimation of cæruloplasmin oxidase activity. *Clin. Chim. Acta*, 1974, 50 : 359–366.
- [113] J.E. Smith, P.S. Chavey, and G.A. Andrews. Semiautomatic and robotic methods for determining serum haptoglobin levels. *Vet. Clin. Pathol.*, 1998, 27(1) : 11–14.
- [114] W.D. Smith. Anti-larval antibodies in the serum and abomasal mucus of sheep hyperinfected with *Hæmonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.*, 1977, 22 : 334–338.
- [115] W.D. Smith, F. Jackson, and E. Jackson. Changes in the flow and composition of gastric lymph in sheep given a primary infection of 10,000 *Hæmonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.*, 1982, 32 : 184–188.
- [116] W.D. Smith, F. Jackson, E. Jackson, and A. McL. Dawson. Changes in the flow and composition of gastric lymph in sheep repeatedly infected with *Ostertagia circumcincta*. *J. Comp. Pathol.*, 1981, 91 : 553–564.
- [117] W.D. Smith, F. Jackson, E. Jackson, and J. Williams. Local immunity and *Ostertagia circumcincta*: changes in the gastric lymph of immune sheep after a challenge infection. *J. Comp. Pathol.*, 1983, 93 : 479–488.
- [118] W.D. Smith, F. Jackson, E. Jackson, and J. Williams. Local immunity and *Ostertagia circumcincta*: changes in the gastric lymph of sheep after a primary infection. *J. Comp. Pathol.*, 1983, 93 : 471–478.
- [119] R.L. Spooner and J.K. Miller. The measurement of hæmoglobin reactive protein in ruminants as an aide to the diagnosis of acute inflammation. *Vet. Rec.*, 1971, 88 : 2–4.
- [120] M.J. Stear, S. Strain, and S.C. Bishop. How lambs control infection with *Ostertagia circumcincta*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1999, 72 : 213–218.
- [121] J.W. Steel, W.O. Jones, and B.M. Wagland. The response of immune sheep to challenge with *Trichostrongylus colubriformis*: enteric plasma loss and secretion of biogenic amines. *Int. J. Parasitol.*, 1990, 20(8) : 1067–1073.
- [122] P.V. Syversen, J. Juul, G. Marhaug, G. Husby, and K. Sletten. The primary structure of Serum Amyloid A protein in the sheep: comparison with Serum Amyloid A in other species. *Scand. J. Immunol.*, 1994, 39 : 88–94.
- [123] G. Tabouret, L. Bret-Bennis, P. Dorchies, and P. Jacquiet. Serine protease activity in excretory-secretory products of *Æstrus ovis* (Diptera: Æstridae) larvæ. *Vet. Parasitol.*, 2003, 114 : 305–314.
- [124] G. Tabouret, P. Jacquiet, P. Scholl, and P. Dorchies. *Æstrus ovis* in sheep: relative third-instar populations, risks of infection and parasitic control. *Vet. Res.*, 2001, 32 : 521–531.
- [125] H. Takahara, Y. Nakamura, K. Yamamoto, and H. Sinohara. Comparative studies on the serum levels of  $\alpha$ -1-antitrypsin and  $\alpha$ -macroglobulin in several mammals. *Tohoku J. exp. Med.*, 1983, 139 : 265–270.

- [126] P.H. Tarukoski. Quantitative spectrophotometric determination of haptoglobin. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 1966, 18 : 80–86.
- [127] G. Terefe, H.T. Jacob, C. Grisez, F. Prevot, E. Dumas, J.P. Bergeaud, P. Dorchies, H. Hoste, and P. Jacquiet. *Hæmonchus contortus* egg excretion and female length reduction in sheep previously infected with *O. ovis* larvæ. *Vet. Parasitol.*, 2004. soumis.
- [128] J.F. Urban Jr., R. Fayer, C. Sullivan, J. Goldhill, T. Shea-Donohue, K. Madden, S.C. Morris, I. Katona, W. Gause, M. Ruff, L.S. Mansfield, and F.D. Finkelman. Local TH1 and TH2 responses to parasitic infection in the intestine : regulation by INF- $\gamma$  and IL-4. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1996, 54 : 337–344.
- [129] H.T. Jacob, C. Duranton-Grisez, F. Prevot, J-P. Bergeaud, C. Bleuart, P. Jacquiet, P. Dorchies, and H. Hoste. Experimental concurrent infection of sheep with *Æstrus ovis* and *Trichostrongylus colubriformis* negative interactions between parasite populations and related changes in the cellular responses of nasal and digestive mucosae. *Vet. Parasitol.*, 2002, 104(4) : 307–317.
- [130] H.T. Jacob, H. Hoste, P. Jacquiet, C. Duranton-Grisez, P. Dorchies, and L. Gruner. Mucosal inflammatory responses after experimental infection with gastrointestinal nematodes in resistant and susceptible sheep naturally infected with *Æstrus ovis*. *Rev. Méd. Vét.*, 2001, 152(10) : 717–722.
- [131] J.M. Yilma. *Contribution à l'étude de l'épidémiologie du diagnostic immunologique et de la physiopathologie de l'æstrose ovine (Æstrus ovis, Linné 1761)*. Thèse I.N.P., Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, 1992.
- [132] J.M. Yilma and P. Dorchies. Epidemiology of *Æstrus ovis* in southwest France. *Vet. Parasitol.*, 1991, 40 : 315–323.

## Annexe I

# Caractéristiques métrologiques d'une méthode analytique

### A Répétabilité et reproductibilité

La précision de la technique analytique est l'aptitude de cette technique à toujours fournir le même signal analytique pour le même échantillon. On distingue la précision au sein même de la série (**répétabilité**) de la précision entre séries (**reproductibilité**).

### B Sensibilité

La sensibilité est souvent définie de deux manières qui se complètent :

- variation de l'intensité du signal analytique en fonction de la variation de concentration ;
- aptitude à distinguer des valeurs proches.

### C Limites de détection et de quantification

Pour déterminer ces deux limites, on mesure dix fois de suite le signal analytique fourni par un échantillon dans lequel la concentration en molécule recherchée est nulle (exemple : eau distillée).

### D Limite supérieure de linéarité

C'est la concentration à partir de laquelle la relation linéaire entre le signal analytique et la concentration n'est plus vérifiée. Elle peut être déterminée expérimentalement. Elle est plus souvent indiquée par les fabricants, soit directement, soit en indiquant la limite à partir de laquelle des dilutions sont nécessaires.

## **E Exactitude**

L'exactitude est l'aptitude d'une technique analytique à fournir la valeur vraie (c'est-à-dire la concentration réellement présente dans l'échantillon). Dans la pratique, on évalue l'inexactitude, c'est-à-dire l'écart entre cette valeur vraie (dans un échantillon de contrôle dont la concentration est connue) et la valeur moyenne mesurée dans cet échantillon.



## Annexe II

# Caractéristiques métrologiques des méthodes utilisées

### A Caractéristiques métrologiques de la méthode de dosage de la Cé- ruloplasmine

On utilise la gamme de concentrations suivante :

- S0 solution à 0 U/mL,
- S1 solution à 111,5 U/mL,
- S2 solution à 55,75 U/mL,
- S3 solution à 27,88 U/mL,
- S4 solution à 13,94 U/mL,
- S5 solution à 6,97 U/mL.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 10 et dans la figure 16.

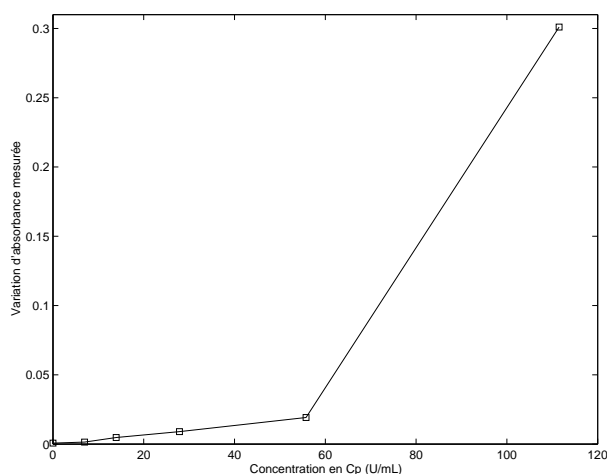


FIGURE 16 – Relation entre la variation d'absorbance mesurée et la concentration en Cp

	S1	S2	S3	S4	S5	S0
DO obtenues	0,032	0,017	0,009	0,008	0,003	0,007
	0,029	0,021	0,008	0,005	0,002	0
	0,027	0,011	0,009	0,004	0	0
	0,033	0,021	0,012	0,003	0,004	0
	0,029	0,02	0,006	0,005	0,001	0
	0,031	0,022	0,014	0,009	0,003	0,001
	0,03	0,021	0,007	0,007	0	0
	0,031	0,016	0,009	0,004	0,002	0
	0,029	0,023	0,008	0,004	0	0
	0,03	0,02	0,008	0	0,002	0
Moyenne	0,03	0,019	0,009	0,0049	0,0014	0,0007
Ecart-type	0,0017	0,0036	0,002	0,0026	0,002	0,002
CV (%)	5,6	19,0	25,5	63,8	70,0	ND
IC(95%)	[0,026 ; 0,033]	[0,012 ; 0,026]	[0,0045 ; 0,013]	[-0,0012 ; 0,011]	[-0,0028 ; 0,0051]	[-0,0038 ; 0,0052]
Minimum détectable (variation d'absorbance)						-0,0038

TABLE 10 – Imprécision déterminée pour le dosage de la Cp dans le sérum de mouton. S0 solution à 0 U/mL, S1 solution à 55,75 U/mL, S2 solution à 27,88 U/mL, S3 solution à 13,94 U/mL, S4 solution à 6,97 U/mL et S5 solution à 111,5 U/mL. CV : coefficient de variation, DO : densité optique et IC : intervalle de confiance.

## B Caractéristiques métrologiques de la méthode de dosage de l' $\alpha$ -1-antitrypsine

On utilise la gamme de concentrations suivante :

- S0 solution à 0% (0 U/mL),
- S1 solution à 25% (1441,6 U/mL),
- S2 solution à 40% (2310,8 U/mL),
- S3 solution à 75% (4324,8 U/mL),
- S4 solution à 100% (55766,4 U/mL),
- S5 solution à 150% (8649,6 U/mL).

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 11 et dans la figure 17.

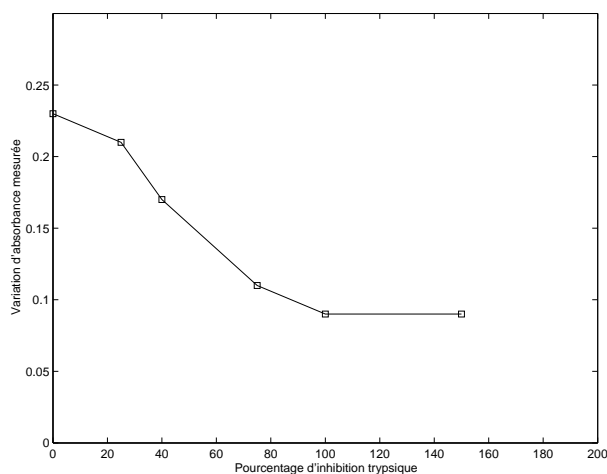


FIGURE 17 – Relation entre la variation d'absorbance mesurée et le pourcentage d'inhibition trypsique

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
DO obtenues	0,238	0,202	0,188	0,1	0,096	0,006
	0,241	0,21	0,168	0,123	0,089	0,005
	0,211	0,205	0,17	0,112	0,09	0,005
	0,225	0,206	0,175	0,11	0,091	0,008
	0,235	0,21	0,183	0,12	0,09	0,01
	0,238	0,206	0,173	0,115	0,095	0,005
	0,212	0,205	0,168	0,114	0,088	0,007
	0,23	0,211	0,174	0,122	0,094	0,006
	0,211	0,202	0,181	0,121	0,09	0,005
	0,237	0,205	0,175	0,11	0,089	0,09
Moyenne	0,23	0,2	0,17	0,11	0,09	0,01
Ecart-type	0,012	0,0031	0,0066	0,0071	0,0028	0,0026
CV (%)	5,4	1,5	3,8	6,2	3,0	ND
IC(95%)	[0,2 ; 0,25]	[0,19 ; 0,21]	[0,16 ; 0,18]	[0,1 ; 0,13]	[0,085 ; 0,1]	ND
Minimum détectable	0,2					

TABLE 11 – Imprécision déterminée pour le dosage de l' $\alpha$ -1-AT dans le sérum de mouton. S0 solution à 0% (0 U/mL), S1 solution à 25% (1441,6 U/mL), S2 solution à 40% (2310,8 U/mL), S3 solution à 75% (4324,8 U/mL), S4 solution à 100% (55766,4 U/mL) et S5 solution à 150% (8649,6 U/mL). CV : coefficient de variation, DO : densité optique et IC : intervalle de confiance.