

CONTRIBUTION BIBLIOGRAPHIQUE À L'ÉTUDE DES PRODUITS D'EXCRÉTION/SÉCRÉTION DES LARVES D'OESTRE ET APPARENTÉS

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

Jérôme, Pascal FOSTINELLI
Né, le 18 avril 1979 à LIBOURNE (Gironde)

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 : FOSTINELLI

PRENOM : Jérôme Pascal

TITRE : CONTRIBUTION A L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES PRODUITS
D'EXCRETION / SECRETION DES LARVES D'OESTRE ET APPARENTES

RESUME :

Les insectes Diptères *Oestrus ovis*, *Hypoderma lineatum* et *Lucilia cuprina* sont responsables de myiases chez les ruminants engendrant d'importantes pertes économiques. De nouvelles stratégies de lutte sont à l'étude, notamment celles basées sur le développement de vaccins à base d'antigènes extraits des produits d'excrétion/sécrétion des larves. Ces derniers sont majoritairement des sérine-protéases d'origine digestive ayant des activités enzymatiques similaires d'une espèce larvaire à l'autre. Ces protéases contribuent au développement des larves : elles assurent leur nutrition, leur établissement, leur migration et leur protection vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte. Les tentatives de vaccination utilisant des antigènes extraits des produits d'excrétion/sécrétion se sont soldées par un échec. Cependant, plusieurs pistes restent à explorer notamment chez *Oestrus ovis*.

MOTS CLES :

Oestrus ovis, *Hypoderma lineatum*, *Lucilia cuprina*, produits d'excrétion/sécrétion, myiase, larve.

TITLE: BIBLIOGRAPHIC CONTRIBUTION TO THE STUDY OF EXCRETION /
SECRETION PRODUCTS OF OESTRE LARVAE AND RELATED.

ABSTRACT:

The Diptera *Oestrus ovis*, *Hypoderma lineatum* and *Lucilia cuprina* are responsible for myiasis in ruminants causing significant economics losses. New counter strategies are being studied, one in particular concerning the development of vaccines using the antigen base extracts from larval excretion/secretion products. These are mainly serine-protease developed during digestion and have an enzymatic behaviour similar from one larval species to the next. These proteases contribute to the larval development and ensure their nutrition, migration and protection from the host immune system. Vaccination attempts using antigen extracts from larval excretion/secretion products result in failure. Nonetheless, several leads remain to be studied, especially in the case of *Oestrus ovis*.

KEYWORDS:

Oestrus ovis, *Hypoderma lineatum*, *Lucilia cuprina*, excretion/secretion products, myiasis, larvae.

ERRATUM

Page 12 :

« $\alpha\alpha\alpha$ » au lieu de « $\alpha\alpha\alpha$ »
« kilos Dalton » au lieu de « kilo »
« Interleukine 2 » au lieu de « Interleukine 2s Dalton »

Page 25, ligne 8 :

« α glucosidase » au lieu de « a glucosidase »

Page 26, tableau 1 :

« α Trypsine » au lieu de « a Trypsine »
« β Chymotrypsine » au lieu de « ? Chymotrypsine »
« β galactosidase » au lieu de « ? galactosidase »
« β glucuronidase » au lieu de « ? glucuronidase »
« α glucosidase » au lieu de « ? glucosidase »
« β glucosidase » au lieu de « ? glucosidase »
« N-acétyl- β -glucoaminidase » au lieu de « N-acétyl- ?-glucoaminidase »
« α mannosidase » au lieu de « ? mannosidase »
« α fucosidase » au lieu de « ? fucosidase »

Page 27 :

Ligne 5 : « 40 nmol/40 μ l » au lieu de « 40 nmol/40 ?l »

Ligne 6 : « 30 nmol/ μ l » au lieu de « 30 nmol/ ?l »

Ligne 10 : « 20 nmol/40 μ l » au lieu de « 20 nmol/40 ?l »

Page 29, ligne 23 et 28 ; page 30, ligne 5 ; page 33, ligne 7 ; page 34, ligne 13 ; page 35, ligne 25 ; page 40, ligne 4, 5, 11 et 21 ; page 67, ligne 24 :

« acides α aminés » au lieu de « acides a aminés »

Page 38, ligne 25 et 26 ; page 39, ligne 11 :

« μ mol/l » au lieu de « ?mol/l »

Page 39, ligne 17 :

« \leftrightarrow » au lieu de « ? »

Page 53, ligne 26 ; page 68, ligne 15 :

« Elle » au lieu de « Il »

Page 64, ligne 23, 25 et 26 ; page 65, ligne 18 :

« INF γ » au lieu de « INF ? »

Page 70, ligne 17 :

« TNF α » au lieu de « TNF ? »

Page 80, ligne 14 :

« $\gamma\delta$ -TCR+ » au lieu de « ?d-TCR+ »

Page 84, ligne 27 ; page 85, ligne 2 :

« T $\gamma\delta$ + » au lieu de « T ?d+ »

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

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

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^{ère} 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^e 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**, *Zootechne*
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. **MARENDA 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 **PRYMENKO 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 mes parents adorés, pour tous leurs sacrifices et leur soutien.

A mon frère, que j'adore et à qui je souhaite plein de bonnes choses.

A Emilie, ma petite femme que j'aime à la folie et avec qui je souhaite passée ma vie.

A toute ma famille et à tous mes proches que j'aime.

A mon cousin David pour son soutien logistique entre autres.

A Trevor, pour son soutien linguistique.

A tous mes ami(e)s : Arnaud « el » baroudeur, « el » Nordiste, Eric ou pépé « main »lin, Bribrice ou « gwande zoweille », Puch et son lit, Olive et sa bande de castors, Matmat et son ordi, Paulo et le professeur Thibault, Fred le toubib, Psy et sa femme, Alexis mon « ptit » poulot, Norélie et Ch « w »istine mes réunionnaises, Justine et Tiphaine, Christophe et Lidwine, Michel et Céline, Vincent et Fanny, et à tous ceux que j'ai oublié involontairement, merci pour tous ces moments géniaux passés avec vous et vivement les prochains !

Table des matières

Tables des illustrations.....	10
Tables des abréviations.....	11
Introduction.....	13
I. Caractérisation des PES des larves	15
1. La biologie des parasites	15
1.1. Chez <i>Oestrus ovis</i>	15
1.2. Chez <i>Hypoderma lineatum</i>	19
1.3. Chez <i>Lucilia cuprina</i>	21
2. Les enzymes sécrétées/excrétées	24
2.1. Les différentes activités enzymatiques	24
2.2. Les protéases excrétées/sécrétées	29
3. Les produits excrétés/sécrétés non enzymatiques.....	38
3.1. L'ammoniac.....	38
3.2. La protéine Péritrophine-95 (P-95)	39
3.3. Les PES synthétisés dans les glandes salivaires.....	43
4. Bilan.....	44
II. Rôle des PES dans le développement larvaire	47
1. Protection vis à vis du système immunitaire de l'hôte	47
1.1. Clivage des IgG et des IgA.....	47
1.2. Action sur le complément.....	52
1.3. Action sur la prolifération lymphocytaire	55
1.4. Rôle immunosuppresseur de l'ammoniac	60
1.5. Bilan	60
2. Nutrition des larves	62
2.1. Modalité de la digestion	62
2.2. Maintien d'un apport constant en nutriments	64
3. Facilitation de l'établissement larvaire	67
3.1. Chez <i>Oestrus ovis</i>	67
3.2. Rôle de LCTb chez <i>Lucilia cuprina</i>	67
4. Migration larvaire	68
4.1. Chez <i>Hypoderma lineatum</i>	68
4.2. Chez <i>Lucilia cuprina</i>	68
5. Les lésions induites	69
5.1. Chez <i>Oestrus ovis</i>	69
5.2. Chez <i>Hypoderma lineatum</i>	70
5.3. Chez <i>Lucilia cuprina</i>	72
6. Bilan général	74

III. PES et perspectives vaccinales.....	77
1. Développement d'une immunité naturelle.....	77
2. Les intérêts d'un vaccin	80
3. Les tentatives de vaccination	81
3.1. Immunogénicité des PES larvaires.....	81
3.2. Essais vaccinaux.....	83
4. Discussion sur les essais	86
4.1. Choix de l'Ag vaccinal.....	86
4.2. Voie d'administration.....	89
4.3. Rôle des adjuvants.....	89
4.4. Production de protéines recombinantes.....	91
Conclusion.....	93
Bibliographie.....	95

Table des illustrations

Tableau 1 : Analyse semi-quantitative par API-ZYM des activités enzymatiques de solution larvaire.....	26
Tableau 2 : Enzymes (nanomoles / 40µl) dans les sécrétions stériles de <i>Lucilia cuprina</i>	28
Tableau 3 : Spectre d'inhibition des molécules utilisées (d'après les laboratoires Roche, France)	31
Tableau 4 : Les PES larvaires : synthèse.....	44
Tableau 5 : Propriétés immunomodulatrices des PES larvaires.....	61
Figure 1 : cycle biologique d' <i>Oestrus ovis</i>	17
Figure 2 : cycle biologique d' <i>Hypoderma lineatum</i>	20
Figure 3 : cycle biologique de <i>Lucilia cuprina</i>	23
Figure 4 : Diagramme de représentation de la protéine Péritrophine-95.	41
Figure 5 : Disposition de la Péritrophine-95 au sein de la Membrane Péritrophique	42
Figure 6 : Structure d'une immunoglobuline	48
Figure 7 : Activité protéasique des PES sur les IgG et les IgA et conséquences pour le système immunitaire.	51
Figure 8 : Bilan : Rôles des PES dans le développement larvaire.	75

Table des abréviations

aaa : acide α aminé
Ac : Anticorps
Ag : Antigène
APMSF : (4-amidinophenyl)-methanesulfonyl fluoride
BAPNA : Benzoyl-arginine-nitroanilide
CMH I : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CMH II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II
Dip-F : Diisopropylfluorophosphate
EDTA : éthylène diamine tétra acétate
HA : Hypodermine A
HB : Hypodermine B
HC : Hypodermine C
IgA : Immunoglobuline A
IgG : Immunoglobuline G
kDa : kilo
IL-2 : Interleukine 2s Dalton
L1 : Larve de premier stade
L2 : Larve de deuxième stade
L3 : Larve de troisième stade
LB : Lymphocyte B
LCT : Lucilia chymotrypsine
LT : Lymphocyte T
NO : Monoxyde d'azote
P-55 : Péritrophine-55
P-95 : Péritrophine-95
PES : Produit d'Excrétion/Sécrétion
PM : Membrane/Matrice Péritrophique
PMSF : Phénylméthonylsulfonyl Fluoride),
SALNA : Succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-leucine-nitrosanilide
SAPNA : Succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-phenylalanine-nitroanilide
SBTI : soybean trypsin inhibitor
TLCK : tosyl-L-lysine chlorométhyle ketone
TPCK : tosyl-L-phenylalaline chlorométhyle ketone
VALNA : valyl-leucyl-lysine-nitroanilide

Introduction

Oestrus ovis (Linné 1761), insecte Diptère de la famille des Oestridés est un mésoparasite obligatoire à l'état larvaire, des cavités nasales et des sinus du mouton et de la chèvre. Ce parasitisme protélien provoque une myiase cavitaire : l'œstrose (Papavero, 1977).

Une myiase (du grec « myia » : mouche), est une infestation de l'homme ou des animaux provoquée par des larves de Diptères se nourrissant, au moins pendant une période de leur vie, de tissus ou des liquides organiques de leur hôte. (Rodhain *et al.*, 1985).

En France, l'œstrose touche 50% du cheptel. Les femelles d'*Oestrus ovis* pondent directement des larves de premier stade autour des narines des moutons. Ces larves pénètrent activement par les orifices nasaux pour venir coloniser les fosses nasales et engendrer après deux mues successives des larves de troisième âge plus profondément situées dans les voies nasales et pouvant même coloniser les sinus frontaux. Cela se manifeste notamment sur les moutons par des signes cliniques de type jetage, mouchage, problèmes respiratoires qui peuvent entraîner des retards de croissance et donc des pertes économiques notables (Alzieu et Chiarisoli, 1990).

Dans le cadre de cette étude bibliographique, nous allons inclure les recherches portées sur deux autres agents Diptères responsables de myiase : *Hypoderma lineatum* qui appartient à la famille des Oestridés tout comme *Oestrus ovis* et *Lucilia cuprina* qui appartient à la famille des Calliphoridés. Ce choix a été motivé par la disponibilité d'études parallèles menées sur ces trois insectes Diptères et sur leurs produits d'excrétion/sécrétion dans le but d'une vaccination éventuelle. En ce qui concerne les autres agents de myiase, les données disponibles sur le sujet traité se sont révélées être insuffisantes voir absentes.

Hypoderma lineatum est responsable d'une myiase nommée l'hypodermose qui touche tout l'hémisphère nord et donc la France. Cette mouche pond ses œufs sur le poil des bovins principalement. La larve obtenue après éclosion migre dans l'organisme au sein du tissu conjonctif profond qui l'amène après huit mois dans le tissu conjonctif sous-cutané. Là elle continuera ses mues larvaires puis formera un nodule sous-cutané. Une fois le troisième stade larvaire atteint, elle sort et tombe sur le sol pour poursuivre son cycle. La lésion provoquée sur

la peau, ou « varron » fragilise la peau des bovins et la rend inutilisable pour le cuir. De plus, les bovins parasités ont des baisses de performances zootechniques (croissance des animaux et production laitière) (Benakhla *et al.*, 1993).

Lucilia cuprina est elle responsable d'une myiase des plaies. En Australie et en Nouvelle Zélande notamment, l'odeur des plaies mal nettoyées et sans protection attire ces mouches qui pondent à cet endroit, entraînant le développement des larves *in situ*. Cette myiase peut également se développer sur des toisons humides ou fragilisées par des infections bactériennes (Bourée et Resende, 2001). Le développement larvaire engendre des pertes économiques très importantes pour l'industrie textile australienne : Arundel et Sutherland, (1988) évoquent des pertes allant jusqu'à cent millions de dollars par an.

La lutte contre ces myiases, justifiée par les pertes économiques qu'elles occasionnent, a été basée jusqu'à présent sur l'emploi d'insecticides et de larvicides. Mais les résistances se développent et de nouvelles stratégies de lutte sont étudiées en particulier la lutte biologique fondée sur le développement de vaccins à base d'antigènes extraits des produits d'excrétion/sécrétion des larves. En effet, les larves de la famille des Oestridés sont acéphales et n'ont pas d'appareil buccal développé tout comme les larves de premier stade de *Lucilia cuprina*. Par conséquent, la nutrition des larves et donc la poursuite du cycle parasitaire font appel à des produits excrétés/sécrétés par les larves. Ainsi, la vaccination a pour but de développer sur l'animal parasité une immunité à base d'anticorps, capable d'inhiber les fonctions des PES et donc le développement larvaire.

L'objectif de cette étude bibliographique est de synthétiser les données existantes sur la caractérisation de ces produits d'excrétion/sécrétion, leur rôle au sein du développement larvaire et les conséquences que leur présence engendre sur la formation des lésions et sur les perspectives vaccinales envisagées.

I. Caractérisation des PES des larves

Dans cette partie, la biologie des trois parasites est abordée et notamment le cycle d'infestation, les différents stades larvaires afin de souligner la nature des besoins propres à chaque stade, puis les PES et leur composition chimique sont analysés.

I.1. La biologie des parasites

*1.1. Chez *Oestrus ovis**

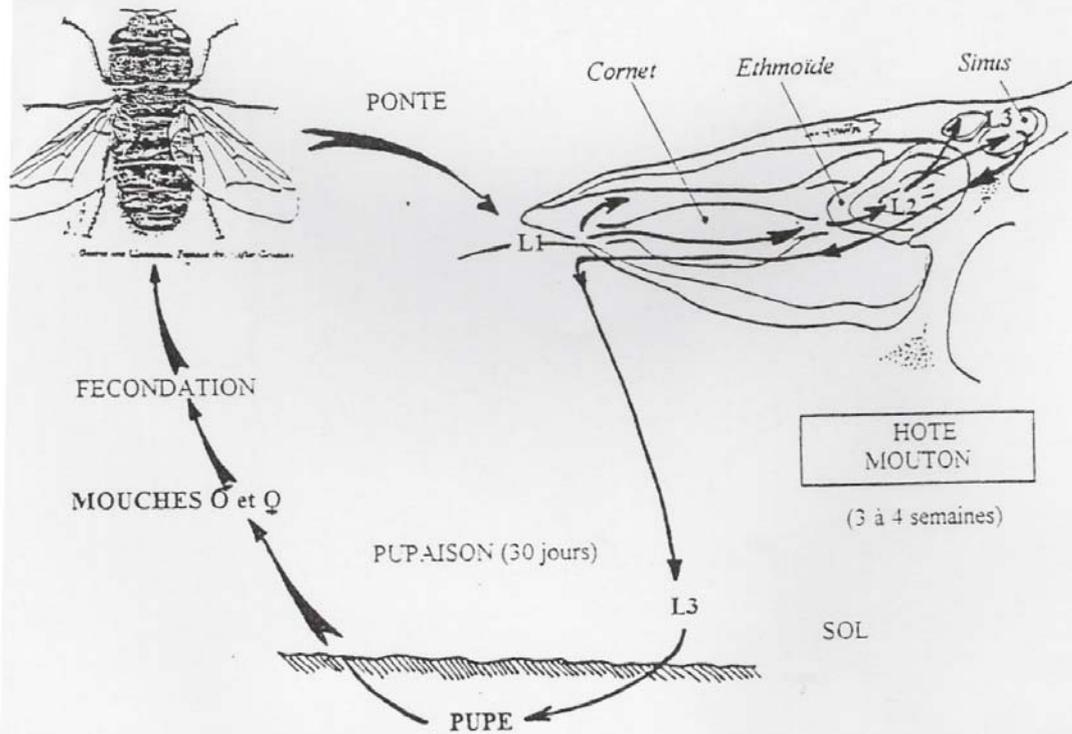
a) Le cycle parasitaire (Tabouret, 1998)

Après éclosion, les mouches se regroupent au niveau d'un site d'agrégation où a lieu l'accouplement. La femelle, larvipare, s'envole à la recherche de l'hôte. Elle dépose aux commissures nasales des larves de premier stade (L1). Les L1 pénètrent dans les cavités nasales et migrent jusque dans l'ethmoïde où se déroule la première mue (L1-L2). La L2 gagne les sinus et se transforme en larve de troisième stade (L3) qui retourne dans le milieu extérieur par le chemin inverse : lorsque ces dernières ont atteint une taille et un poids suffisant, elles retournent dans les cavités nasales d'où elles sont expulsées à l'occasion des éternuements de l'hôte. Elles s'enterrent et débute alors la pupaison pendant laquelle se déroule la nymphose. Trente à 40 jours plus tard, en fonction de la température et du degré d'humidité, émerge un nouvel imago.

C'est un cycle holoxène à infestation active (figure 1), stratégie d'infestation inhabituelle pour un mésoparasite. En effet, une grande majorité des mésoparasites s'introduisent passivement dans l'hôte à la faveur de son comportement trophique.

La durée du cycle varie selon la région et le climat. Lorsque les conditions présidant à l'accomplissement du cycle sont favorables (fin de printemps, été des zones tempérées), l'évolution de L1 à L3 dure quatre semaines environ. Dans le cas contraire, lors de basses températures ou de fortes sécheresses, (hiver ou saison sèche des régions sahéliennes), les larves de premier stade sont capables d'arrêter leur développement au sein de l'hôte en entrant en vie ralentie ou diapause. En ce qui concerne la pupaison, des conditions précises de température et d'humidité sont essentielles à la réussite de cette étape. Le seuil thermique minimum nécessaire est de 12°C pour les mâles et de 15,5°C pour les femelles. Les besoins énergétiques supérieurs chez la femelle peuvent s'expliquer par la nécessité d'une maturation sexuelle. Les températures trop basses ou trop hautes peuvent ainsi être néfastes pour le développement de l'insecte durant cette période. La durée de pupaison semble subir de grandes variations : de 27/34 jours à plus d'un an suivant les conditions climatiques.

CYCLE BIOLOGIQUE D'ÆSTRUS OVIS



CHRONOBIOLOGIE D'ÆSTRUS OVIS

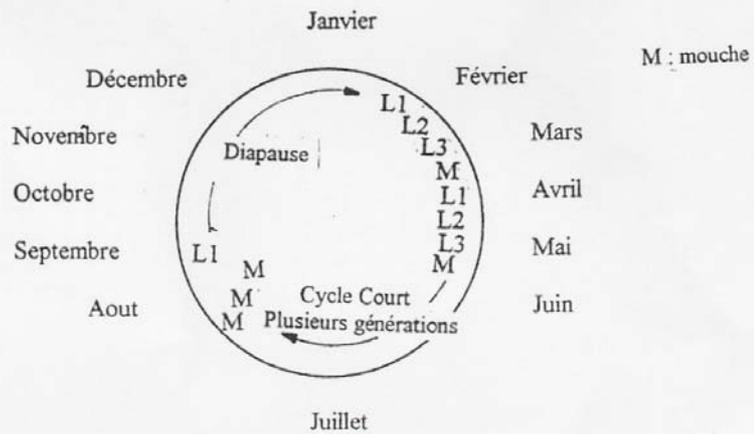


Figure 1 : cycle biologique d'*Oestrus ovis*
D'après (Tabouret, 1998)

b) Les différents stades larvaires

Les L1 mesurent de 1 à 2 mm de long. Elles sont translucides à blanchâtres. Le premier segment porte de part et d'autre de la bouche deux crochets massifs. Il existe plusieurs rangées d'épines par métamères. Ces appendices permettent de faciliter les déplacements des larves ainsi que leur fixation à la muqueuse pituitaire évitant l'élimination brutale au moment des éternuements. Ces larves ont un aspect fusiforme et aplati. Dans les cavités nasales, elles se nourrissent de mucus et ont une durée de développement très variable (2 semaines à 9 mois) (Dorchies et Alzieu 1997).

Les L2 sont opaques et blanches (les plaques stigmatiques postérieures deviennent visibles). Elles mesurent de 3,5 à 12 mm et possèdent un équipement en crochets et en épines beaucoup plus réduit que celui de la L1. Il est vraisemblable que sa position dans les sinus, à l'abri des turbulences, lui permet de faire l'économie de ces appendices. A la face postérieure du dernier segment, les plaques stigmatiques, de couleur orange, sont grossièrement pentagonales (Dorchies et Alzieu 1997).

Les L3 sont volumineuses (plus de 2 cm). Au cours de leur évolution, leur couleur, blanc-jaunâtre, s'obscurcit jusqu'à devenir noirâtre, à la suite de l'apparition de bandes transversales plus foncées. La face dorsale de la larve est bombée. La face ventrale est plane et possède une multitude de petites épines facilitant la reptation. Le premier anneau est muni de deux crochets et porte les ébauches antennaires qui ont deux ocelles chacune. Le dernier anneau constitue une chambre stigmatique dont les marges présentent des organes sensoriels (Dorchies et Alzieu 1997).

c) Les besoins propres à chaque stade

Dans la famille des Oestridés, les pièces buccales des adultes sont atrophiées, (Zumt, 1965), ce qui empêche toute nutrition. Les réserves énergétiques et protéiques indispensables aux activités des adultes (vol, recherche du partenaire, recherche de l'hôte, reproduction...) seront accumulées uniquement au cours des stades larvaires.

L'adulte ne prend aucun repas alors que les larves absorbent les exsudats présents dans les cavités nasales et les sinus. Il a été montré *in vitro* qu'elles avaient besoin d'une quantité élevée de protéines ce qui est aussi confirmé par leur sensibilité aux médicaments étroitement liés aux protéines plasmatiques comme le closantel (Dorchies, Alzieu, 1994).

Les trois stades larvaires se nourrissent. Les larves L1 utilisent comme source de protéines l'exsudat nasal et des sérosités contenues dans les fosses nasales (Alzieu et Charisioli, 1990).

Le stade L3 accumule suffisamment de réserves nutritives pour assurer la pupaison (étape fondamentale nécessitant un haut niveau énergétique pour donner un adulte).

Il a été démontré par Cepeda-Palacios *et al.*, (1999) que le gain de poids le plus important pour la larve (45% du poids définitif moyen qui est de 518 mg) se produit juste après la mue L2-L3, pendant le stade précoce de L3.

Ces résultats sont en accord avec l'étude faite par Tabouret, (2001) qui a montré que les quantités de protéases excrétées pendant les trois stades larvaires *in vitro* étaient variables. Les larves L1 sécrètent moins de protéases que les larves L2 et L3. Ainsi la quantité de PES sécrétée par les larves augmentent avec le degré d'évolution et traduit des besoins plus importants pour les stades L2 et L3.

1.2. Chez Hypoderma lineatum

a) Le cycle parasitaire (Benakhla *et al.*, 1993)

Ces insectes sont actifs à la belle saison, de mai à juillet surtout. Leur rayon d'action est limité de 500 m à 1 km. Elles sont attirées par les couleurs sombres et les bovins sur lesquels elles pondent les œufs. Ces derniers sont disposés sur les poils, en ligne les uns à côté des autres. Ils sont pondus en grand nombre, environ 1000 œufs par mouche, sur la partie inférieure des membres antérieurs.

Deux à 7 jours après la ponte, les œufs éclosent et libèrent des larves L1 qui traversent le tégument activement et migrent à travers le tissu conjonctif profond jusqu'à octobre/novembre pour arriver au niveau de l'œsophage où elles s'installent dans la sous-muqueuse parallèlement à son axe. Ces L1 s'accumulent ainsi en régions sous œsophagiennes. En janvier, les larves reprennent leur migration jusqu'au tissu conjonctif sous-cutané dorsal du bovin parasité. En février/mars, elles percent un trou (pertuis) dans la peau et se retournent en face de celui-ci, de manière à disposer leur partie arrière en face du pertuis : ainsi les stigmates du dernier anneau leur permettent de respirer à l'extérieur. Au total, la migration de L1 dure de 7 à 8 mois.

Les larves muent alors en L2 puis en L3. Cette mue entraîne progressivement une déformation de la peau du bovin qui forme un nodule isolé du reste de l'organisme par une coque fibreuse, élaborée par le bovin. C'est un kyste parasitaire. La larve est alors appelée communément « varron ».

La larve L3 quitte ensuite le bovin entre avril et juillet soit par contraction des muscles du bovin lorsqu'il se lève, soit par ses propres mouvements. Elle tombe alors sur le sol et

s'enfonce dans l'humus. Sa paroi se durcit, elle reste immobile et forme la puppe. A l'intérieur de cette puppe se forme l'imago qui quitte la larve par la fente circulaire : ces diptères sont donc des cycloraphes. Quatre à six semaines plus tard naîtra une nouvelle mouche.

Le cycle parasitaire est présenté dans la figure 2.

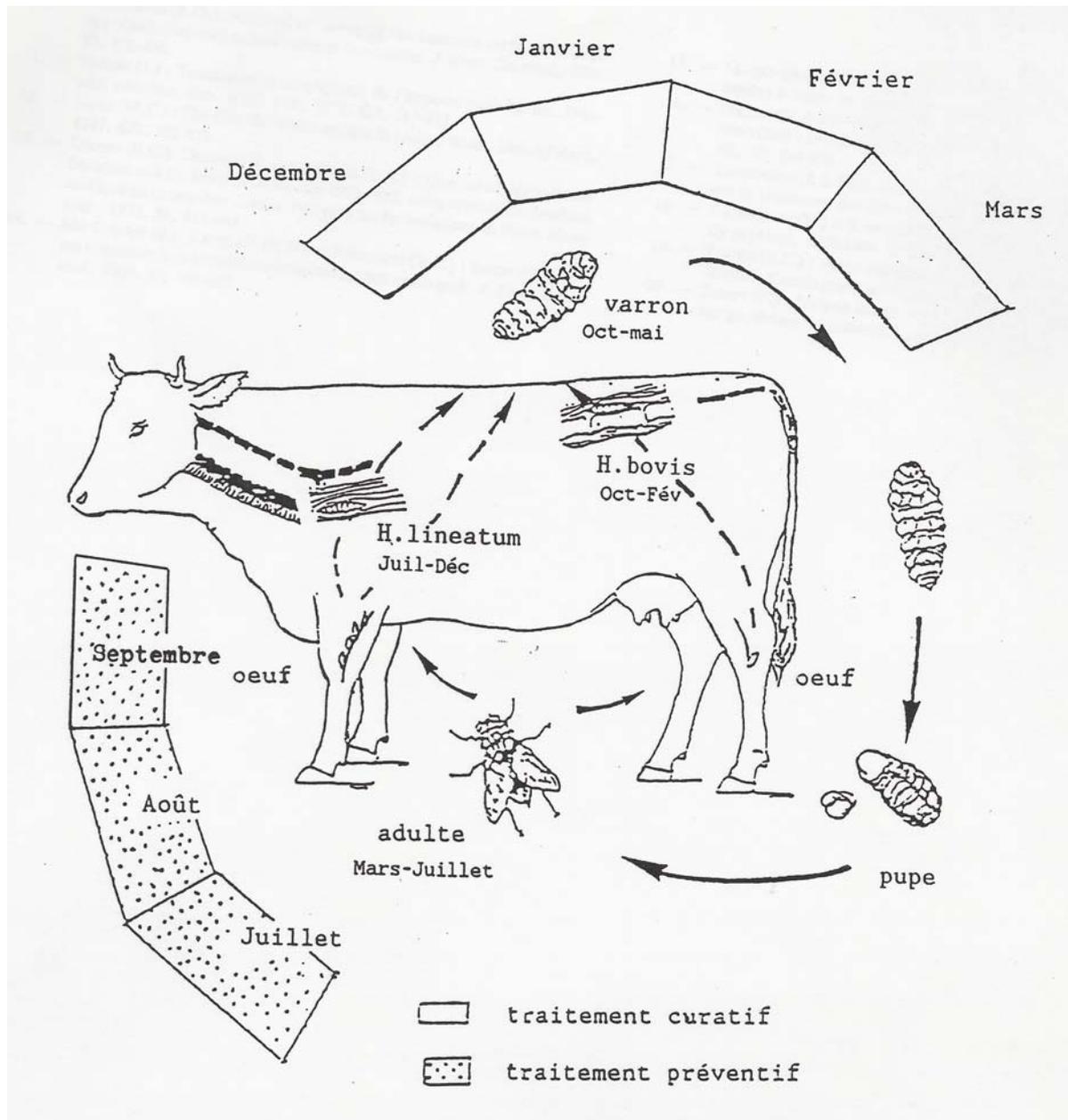


Figure 2 : cycle biologique d'*Hypoderma lineatum*
D'après (Benakhla *et al.*, 1993)

b) Les différents stades larvaires

A l'éclosion, les larves L1 mesurent de 0.6 à 0.7 mm et peuvent atteindre 10 à 17 mm de long en fin de croissance c'est à dire avant la première mue larvaire. Elles sont pourvues de pièces buccales et sont mobiles (Boulard and Garrone, 1978).

Les larves L2 n'ont pas de crochets mais des stigmates. Les larves L3 mesurent de 2 à 3 cm de long. Elles ont une allure générale en nacelle, bombée, constituée de 11 segments : sur chaque segment, excepté le premier, on trouve trois rangées de tubérosités sur le côté. Sur le dernier segment, on peut observer des plaques stigmatiques en forme de fer à cheval relativement ouvert. Ces deux derniers stades larvaires sont immobiles (Boulard and Garrone, 1978).

c) Les besoins propres à chaque stade

La mouche adulte ne vit que quelques jours, une semaine au maximum. Elle survit grâce aux réserves accumulées au cours de la vie larvaire. Dépourvue d'orifice buccal, elle ne peut s'alimenter. Le stade adulte est uniquement voué à la reproduction. Boulard et Weintraub, (1973) ont démontré que les sécrétions de la larve L1 étaient en continuelle augmentation au cours de son évolution, notamment les fractions à activité protéolytique. La lyse des tissus est en conséquence plus importante et les produits de dégradation plus abondants. Plus la larve L1 progresse au cours de sa migration, plus elle stocke des réserves nutritives pour les stades L2 et L3 qui sont des stades immobiles. Ces dernières se nourrissent en plus de l'abcès formé dans le tissus sous cutané dorsal.

1.3. Chez *Lucilia cuprina*

a) Le cycle parasitaire (<http://www.dpi.qld.gov.au/sheep/10041.html>)

Les adultes vivent à peu près de 2 à 3 semaines. Les femelles possèdent des organes sensoriels bien développés sur les pattes qui servent à détecter un environnement propice à la ponte des œufs. Les femelles matures pondront de 2 à 3 groupes d'œufs avec environ 200 œufs par groupe. Les œufs sont pondus individuellement à 15 secondes d'intervalle ce qui signifie que la ponte des œufs durent à peu près une heure par groupe.

Le nombre de larves nécessaires à l'établissement d'une lésion sur la peau des moutons et donc à leur développement est d'au moins 15000. Par conséquent les lésions formées sont le résultat de pontes de plusieurs femelles et cela d'autant plus que chaque œuf pondu ne donne pas forcément naissance à une larve viable.

Les œufs éclosent en larves L1 12 à 24 heures après la ponte en général, mais des exceptions sont possibles. En effet dans des conditions idéales, c'est à dire avec une température tempérée et une toison humide par exemple, les œufs peuvent éclore sous 8 heures. Les larves L1 muent en L2 qui elles-mêmes muent en L3 à la surface de la peau. Ces dernières atteignent la longueur de 10 à 15 mm. Ces deux mues successives se déroulent la plus part du temps en trois à quatre jours.

Puis la larve L3 tombe du mouton et s'enterre dans le sol afin de former la puppe. Ce stade dure de un à deux jours. Cela se passe généralement pendant la nuit ou tôt le matin quand les températures sont les plus basses. La puppe donne naissance à un adulte deux jours après sa formation.

Ce cycle met en évidence le maintien d'une population de *Lucilia cuprina* en contact avec le troupeau de moutons infestés puisque les larves tombent directement du mouton donc dans son aire vitale. De plus les adultes ne volent normalement pas au-delà de trois kilomètres de leur lieu d'éclosion.

Après leur naissance, les femelles ont des besoins en protéines pour rendre leur organe de reproduction mature. Elles auront également besoin d'une quantité élevée de protéines durant la période précédant l'éclosion. Les sources de protéines disponibles pour la femelle sont les carcasses, le fumier ou les plaies déjà existantes à la surface cutanée des moutons.

Le cycle parasitaire est présenté dans la figure 3.

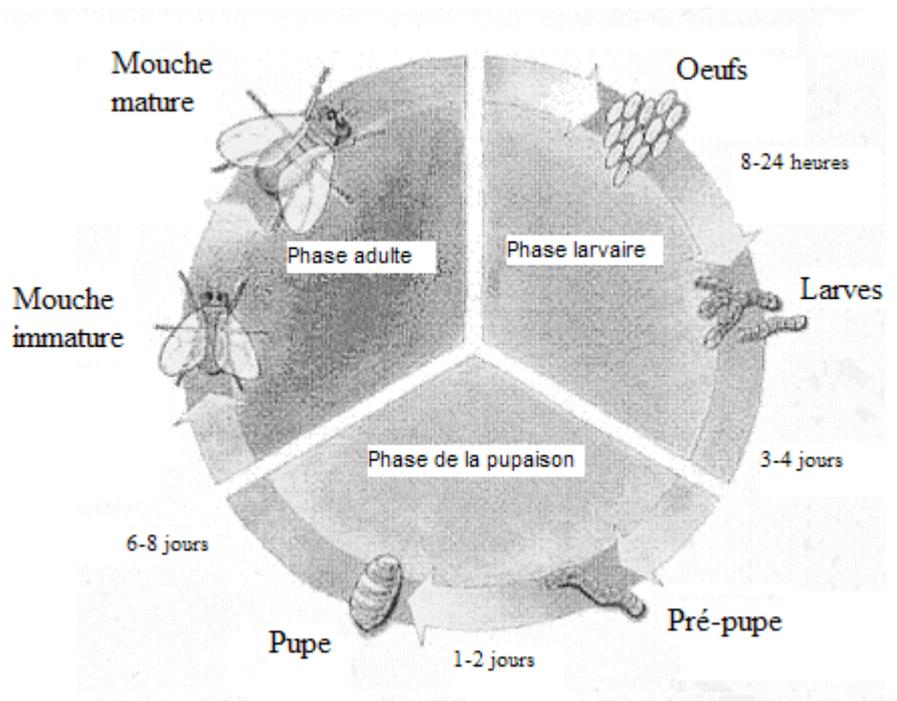


Figure 3 : cycle biologique de *Lucilia cuprina*
 (D'après <http://www.dpi.qld.gov.au/sheep/10041.html>)

b) Les différents stades larvaires

Les larves L1 ne possèdent pas de crochets buccaux comme L2 et L3. Par contre les larves L1 ont deux rangées d'épines dans la cavité buccale qui abrasent les couches cellulaires les plus externes de la peau (Sandeman *et al.*, 1987).

Les larves L2 et L3 possèdent des grosses mandibules qui permettent par rapport à L1 une rupture de l'intégrité cutanée. Ainsi ces deux larves ont un meilleur efflux d'exsudat, un meilleur accès aux enzymes larvaires et une pénétration plus facile dans le tissu (Sandeman *et al.*, 1987).

c) Les besoins propres à chaque stade

Les besoins alimentaires accrus pour les stades L2 et L3 se traduisent anatomiquement par la présence de grosses mandibules qui permettent un meilleur efflux d'exsudat, un meilleur accès aux enzymes larvaires et une pénétration plus facile des larves dans les tissus. La présence de ces grosses mandibules sur L2 et L3 correspond à la croissance la plus importante et donc le moment où il faut le plus de nutriments accessibles pour la larve. Cela se traduit par l'augmentation de la dégradation cutanée qui correspond au passage L1/L2. Parallèlement, la

quantité de protéases excrétées augmentent également avec le stade larvaire (Sandeman *et al.*, 1987).

I.2. Les enzymes sécrétées/excrétées

2.1. Les différentes activités enzymatiques

2.1.1. Mise en évidence

a) API-ZYM

Ce test, réalisé avec des PES de larves d'*Oestrus ovis* de premier, second et troisième stade, est basé sur des galeries bactériologiques API et permet la mise en évidence et la semi-quantification de certaines activités telles que phosphatase, protéase, osidase. L'activité enzymatique a été chiffrée selon une grille de lecture quantifiant l'intensité de la coloration de 0 à 5. (Tabouret, 2001)

Ce test a été également réalisé avec des sécrétions stériles de larves de *Lucilia cuprina* de premier, second et troisième stade (Guerrini *et al.*, 1988). L'activité enzymatique a été évaluée en obtenant les concentrations des différentes enzymes dans les sécrétions et tout au long des trois stades larvaires. Le pH optimum pour l'activité de chaque enzyme est aussi pris en compte.

b) Test de la protéolyse d'un substrat synthétique aspécifique

L'activité protéolytique des PES des larves d'*Oestrus ovis* a été mise en évidence après incubation avec un substrat synthétique chromogène : l'Azocoll (Azo-Dye-Impregnated-Collagen). L'intensité de la protéolyse a été estimée après lecture au spectrophotomètre à 490 nm (Tabouret, 2001).

2.1.2. Résultats

a) Chez *Oestrus ovis* (Tabouret, 2001)

L'analyse des PES sur galeries API-ZYM (Tableau 1) a mis en évidence une forte activité protéolytique de type trypsine : le substrat correspondant a été dégradé. Parallèlement aucune activité de type chymotrypsine n'a été observée. On note également une forte activité phosphatase (alcaline et acide phosphatase), leucine arylamidase et naphthol-AS-BI-phosphohydrolase. L'activité osidase reste modérée : il n'y a pas d'activité galactosidase et β glucosidase notamment, mais on trouve des activités α glucosidase, glucuronidase, glucoaminidase et mannosidase. On note également une activité estérase en C4. Il n'y a aucune activité lipasique. L'Azocoll a été digéré par les PES à hauteur de 32.6% pour L1, 36.2% pour L2 et 60.3% de l'activité d'une clostridiopeptidase pure. On montre ainsi que l'activité protéolytique des PES est plus forte pour les L3.

Par ailleurs, une forte activité protéolytique a été mise en évidence avec des extraits du tractus digestif mais aucune n'a été mise en évidence dans le contenu des glandes salivaires.

Tableau 1 : Exemple d'analyse semi-quantitative par API-ZYM des activités enzymatiques de solution provenant des trois stades larvaires d'après Tabouret, (2001).

Activité	Produit larvaire			
	PES	CI	PIM	CGS
Contrôle	0	0	0	0
Phosphatase alcaline	5	5	5	0
Esterase (C4)	4	3	4	1
Lipase esterase	1	2	3	1
Lipase (C14)	0	0	0	0
Leucine arylamidase	5	5	5	0
Valine arylamidase	1	0	0	0
Cystine arylamidase	1	1	1	0
α Trypsine	5	4	5	0
α Chymotrypsine	0	0	0	0
Acide phosphatase	5	5	5	1
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	5	5	5	1
Galactosidase	0	0	0	0
β galactosidase	0	0	0	0
β glucuronidase	1	2	2	0
α glucosidase	1	2	3	0
β glucosidase	0	0	0	0
N-acétyl- β -glucoaminidase	2	3	3	0
α mannosidase	2	1	4	0
α fucosidase	0	1	0	0

Légende : PES : Produit d'Excrétion/Sécrétion
 CI : Contenu Intestinal
 PIM : Protéine Intégrée à la Membrane
 CGS : Contenu des Glandes Salivaires

b) Chez *Lucilia cuprina*

L'analyse des PES stériles par Guerrini et *al.*, (1988) par API-ZYM (Tableau 2) sur les trois stades larvaires permet d'évaluer les concentrations enzymatiques. Cette étude révèle une forte activité alcaline phosphatase et leucine arylamidase avec des concentrations d'enzymes supérieures à 40 nmol/40µl de sécrétions. Les activités acide phosphatase et naphthol phosphohydrolase suivent avec des concentrations d'enzymes de 30 nmol /µl de sécrétions. Ces concentrations se maintiennent tout au long des trois stades larvaires avec une petite augmentation pour l'enzyme naphthol phosphohydrolase au cours du passage L1/L2.

L'activité protéolytique de type trypsine est marquée au cours du premier stade larvaire (20 nmol/40 µl de sécrétions), augmente lors du passage L1/L2 puis diminue pendant le troisième stade larvaire. L'activité de type chymotrypsine n'a pas été détectée.

Les autres activités restent faibles pendant le premier stade larvaire, puis :

- augmentent au cours des autres stades, c'est le cas pour les activités estérase, estérase lipase et cystéine arylamidase avec des variations des concentrations de chacune.

- augmentent fortement au cours du passage L1/L2 puis diminuent lors du passage L2/L 3 : c'est le cas pour l'activité valine arylamidase.

- stagnent à un niveau très faible voire nul : c'est le cas pour l'activité lipase.

Les valeurs de pH obtenues montrent que 7 enzymes sur 10 détectées ont un pH optimum compris entre 7.5 et 9.0 c'est à dire qu'elles sont très efficaces en pH alcalin.

Tableau 2 : Activités enzymatiques (nanomoles / 40µl) dans les sécrétions stériles de *Lucilia cuprina* d'après Guerrini et al., (1988).

Enzyme	pH optimum	Stade larvaire		
		Premier stade	Deuxième stade	Troisième stade
Phosphatase alcaline	8.5	>40	>40	>40
Acide phosphatase	5.4	30	30	30
Esterase (C4)	6.5	5	15	20
Lipase esterase	7.5	5	5	10
Lipase	7.5	0	5	0
Leucine arylamidase	7.5	>40	>40	>40
Valine arylamidase	7.5	5	25	15
Cystine arylamidase	7.5	5	10	15
Trypsine	9.0	20	25	15
Naphtol phosphohydrolase	5.4	20	30	30

2.1.3. Bilan et comparaison des activités enzymatiques

Si on compare les deux types de résultats obtenus, on constate que la méthode utilisée est la même pour *Lucilia cuprina* et pour *Oestrus ovis*. Cependant, Guerrini et al., (1988) ont réalisé une étude sur le profil enzymatique suivant le stade larvaire de *Lucilia cuprina*. Ce type de profil n'a pas été étudié pour *Oestrus ovis* pour lequel les données disponibles concernent un mélange des PES des trois stades larvaires. De plus, on peut voir que l'exploitation des résultats obtenus par API-ZYM diffère d'une étude à l'autre. En ce qui concerne *Oestrus ovis*, l'activité enzymatique a été semi-quantifiée en se basant sur l'intensité de coloration. Dans le cas de *Lucilia cuprina*, les auteurs ne précisent pas comment ils ont obtenu ces concentrations enzymatiques à partir de la méthode API-ZYM. Ainsi, on ne peut pas comparer la précision des résultats des deux études. En effet, l'intensité de coloration pour suivre une activité enzymatique paraît être une mesure plus subjective que l'obtention de concentrations enzymatiques. Mais les données sur le passage de la méthode API-ZYM aux concentrations enzymatiques sont trop insuffisantes et ne permettent pas de juger la précision de ces résultats.

Néanmoins, on constate des similitudes entre les deux profils enzymatiques. On retrouve notamment une forte activité phosphatase (alcaline et acide), naphthol-phosphohydrolase et leucine arylamidase dans les deux cas. De même les activités estérase et estérase lipase apparaissent semblables. Les activités lipase et de type chymotrypsine sont inexistantes à la fois chez *Oestrus ovis* et *Lucilia cuprina*. En ce qui concerne l'activité trypsique, elle paraît plus importante chez dans les PES d'*Oestrus ovis* que dans ceux de *Lucilia cuprina*.

Si on analyse les profils enzymatiques de *Lucilia cuprina*, il ressort que les concentrations enzymatiques évoluent d'un stade larvaire à l'autre. On peut très bien imaginer que l'on obtiendrait également des variations de concentrations enzymatiques suivant les stades larvaires si une étude similaire était réalisée sur les PES d'*Oestrus ovis*. On peut supposer que ces variations traduisent des besoins différents pour chaque stade larvaire. Les larves d'*Oestrus ovis* et de *Lucilia cuprina* ont besoin de protéases pour digérer les protéines de leur environnement qui constituent leur principale source de nutriments et ce, quelque soit le stade larvaire considéré. Les augmentations des concentrations des protéases d'un stade larvaire à l'autre traduisent des besoins croissants au cours du cycle parasitaire. Dans les deux cas, les larves L3 doivent accumuler des réserves pour le stade pupaison. En revanche, il est difficile d'expliquer la différence observée pour l'activité trypsique. On peut émettre l'hypothèse que les larves d'*Oestrus ovis* sont confrontées majoritairement à des protéines constituées d'acides aminés basiques et donc nécessitant des enzymes à activité trypsique pour les digérer.

2.2. Les protéases excrétées/sécrétées

2.2.1. Définitions

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de liaisons peptidiques. Elles se répartissent en deux catégories : les exopeptidases qui détachent les acides α aminés un à un à partir des extrémités de la protéine et les endopeptidases qui catalysent le clivage d'une liaison peptique interne à la protéine (McKerrow, 1989).

Les protéases sont séparées en 4 classes suivant l'importance des groupements chimiques impliqués dans leur site catalytique. Les sérines-protéases forment une des 4 classes. Ce sont des endopeptidases qui possèdent toutes un acide α aminé sérine au sein de leur site catalytique. Ce groupement sérine permet de polariser la liaison peptidique destinée à être rompue sous

forme alcoolate. Pour atteindre cet état, une histidine et un aspartate formant une triade avec la sérine doivent être positionnés pour que la liaison OH de la sérine soit très fortement polarisée.

Au sein de cette classe de protéases, on retrouve les enzymes de type chymotrypsine et les enzymes de type trypsine. Les premières catalysent des hydrolyses de liaisons peptidiques impliquant des acides α aminés volumineux et hydrophobes aromatiques (Phénylalanine, Tyrosine, Tryptophane) tandis que les secondes hydrolysent la liaison peptidique du côté carboxylique des acides α aminés basiques (lysine et arginine).

2.2.2. Caractérisation biochimique des protéases

Des inhibiteurs spécifiques tel que le PMSF (phénylméthonylsulfonyl fluoride), l'APMSF (4-amidinophenyl)-methanesulfonyl fluoride), le TLCK (tosyl-L-lysine chloromethyle ketone), le TPCK (tosyl-L-phenylalaline chloromethyle ketone) et le SBTI (soybean trypsin inhibitor) notamment sont utilisés pour révéler la classe des protéases contenues dans les PES ainsi que leur activité type trypsine ou chymotrypsine. Leur spectre d'action est résumé dans le tableau 3.

L'emploi de substrat spécifique tel que le BAPNA (Benzoyl-arginine-nitroanilide), le SALNA (Succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-leucine-nitrosanilide), SAPNA (Succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-phenylalanine-nitroanilide) et VALNA (valyl-leucyl-lysine-nitroanilide) sert également à identifier la nature des protéases. Le premier est un substrat spécifique de l'activité tryptique, le deuxième est spécifique de l'activité chymotrypsique et élastase, le troisième est spécifique de l'activité chymotrypsique et le quatrième de l'activité tryptique et plasminique (Sandeman *et al*, 1990 et Tabouret, 2001).

Le pH optimum pour l'activité enzymatique des protéases a été identifié par variation des tampons d'incubation (entre pH 4.5 et 9.5).

Les protéases ont été ensuite analysées par SDS-PAGE ou GS-PAGE (Gelatin Substrat PAGE).

Tableau 3 : Spectre d'inhibition des molécules utilisées (d'après les laboratoires Roche, France)

Inhibiteur	<i>Classe</i>		<i>Protéases</i>	
	<u>Inhibée</u>	<u>Non inhibée</u>	<u>Inhibée</u>	<u>Non inhibée</u>
APMSF	Sérine		Trypsine, Thrombine, etc...	Chymotrypsine
PMSF	Sérine/Cystéine	Cystéine, Métallo et aspartique protéases	Chymotrypsine, Trypsine, Thrombine, Papaïne	
EDTA	Métalloprotéases			
TLCK	Sérine/Cystéine		Trypsine	Chymotrypsine
TPCK	Sérine/Cystéine		Chymotrypsine	Trypsine, Bromélaïne, Ficine, Papaïne
Bestatine	Amino-peptidases			
E64	Cystéine			
SBTI	Sérine	Métallo, Cystéine et Aspartique protéases	Plasmine, Kallikréine tissulaire	

2.2.3. Mise en évidence des sérine-protéases et propriétés biochimiques

a) Chez *Oestrus ovis*

- Mise en évidence des sérine-protéases à activité trypsique et chymotrypsique :

La dégradation de l'azocoll par les PES de L3 n'est pas inhibée :

- par l'EDTA (éthylène diamine tétra acétate) qui est un inhibiteur de métallo-protéases
- par l'E64, inhibiteur de cystéine-protéases
- par la bestatin, inhibiteur d'aminopeptidases.

Par contre, les inhibiteurs spécifiques des sérine-protéases tels que l'APMSF, le PMSF et le SBTI réduisent la dégradation de l'azocoll de respectivement 68%, 72% et 89%. On peut donc en déduire que les protéases contenues dans les PES sont majoritairement des sérine-protéases (Tabouret *et al*, 2003).

L'analyse des PES a déjà montré une activité trypsique. L'emploi du TLCK en présence des PES et de l'azocoll réduit la dégradation de ce dernier de 88%. De plus BAPNA, un

substrat spécifique de l'activité trypsique, est hydrolysé en présence des PES de L3. Cette hydrolyse est de même fortement diminuée par l'ajout de TLCK . On peut donc conclure à la présence de sérine-protéases à activité trypsique au sein des PES (Tabouret *et al*, 2003).

Nous avons vu par API-ZYM que l'on ne constatait aucune activité protéasique de type chymotrypsine. Malgré cela, la dégradation de l'azocoll est réduite de 68% en présence de TPCK. De plus, si on ajoute ce dernier au peptide synthétique SALNA, la dégradation du peptide est inhibée. Ces résultats confirment l'existence d'activités chymotryptiques ou élastinolytiques au sein des PES.

- Propriétés biochimiques :

Le pH optimal de dégradation des peptides synthétiques par les PES s'étend de 7 à 9.5. Les études en SDS-PAGE et GS-PAGE ont mis en évidence plusieurs protéases : un groupe d'environ 100 kDa, un doublet à 69 kDa, un doublet à 45 kDa, une seule bande à 36 kDa et enfin un triplet entre 20, 24 et 29 kDa. L'activité de ces protéases n'a pu être observée qu'en conditions électrophorétiques non réductrices : cela suggère que ces molécules possèdent des structures oligodimériques nécessaires à l'activité enzymatique (Tabouret, 2001). APMSF et TLCK ont inhibé l'activité protéasique des bandes des PES de 36 kDa, 20/24/29 kDa. On peut donc en déduire qu'elles caractérisent des protéases à activité trypsique.

Le pH optimal de dégradation des peptides synthétiques est le même que pour celui des protéases à activité trypsique.

L'utilisation de TPCK a inhibé partiellement l'activité des bandes des PES de 69 kDa et de 36 kDa mais n'a eu aucune action sur l'activité des bandes 20/24/29 kDa. On peut donc en déduire que la bande 69 kDa doit caractériser une protéase à activité chymotrypsique. Pour la bande de 36 kDa on ne peut pas conclure car elle est également inhibée par le TLCK comme nous l'avons vu précédemment (Tabouret, 2001). Chez *Oestrus ovis* la majorité des sérine-protéases a donc une activité trypsique (Tabouret, 2001).

b) Chez *Hypoderma lineatum*

- Mise en évidence des sérine-protéases à activité trypsique et chymotrypsique :

L'activité de l'hypodermine C (HC) n'est pas inhibée par l'EDTA, on peut donc en conclure que ce n'est pas une métallo-protéase. Mais l'utilisation d'un inhibiteur tel que Dip-F

(Diisopropylfluorophosphate) inhibe complètement l'activité de HC sur le collagène dans des proportions stœchiométriques. On peut ainsi conclure que l'HC possède un groupement sérine au sein de son site catalytique et donc appartient à la classe des sérine-protéases. En revanche, ses activités chymotrypsique et trypsique sont nulles : l'utilisation du TPCK et du TLCK n'ont eu aucun effet sur l'enzyme (Lecroisey *et al*, 1979). Cependant l'appartenance à la famille trypsine ou chymotrypsine est discutée : l'HC se rapprocherait plus de la famille chymotrypsine. Lors de l'établissement de sa séquence en acides α aminés complète, Lecroisey *et al*, (1987) ont mis en évidence 32% d'homologie avec la chymotrypsine bovine et 38% d'homologie avec la protéinase I (Collagénase du crabe *Uca pugilator* appartenant à la famille chymotrypsine).

TLCK inhibe l'activité de l'hypodermine A (HA), tout comme la benzamidine qui est un inhibiteur compétitif. Le TPCK n'a aucune influence sur l'activité confirmant le fait que HA est une sérine-protéase de type trypsine (Tong *et al*, 1981).

L'utilisation d'inhibiteurs polypeptidiques naturels de trypsine tel que SBTI réduit l'activité de l'hypodermine B (HB) de 90% pour un ratio moléculaire de 1/1 et de 100% pour un ratio moléculaire de 2/1. De même TLCK inhibe l'activité protéasique de HB tandis que TPCK est sans effet. Ces résultats révèlent que HB a une activité protéasique de type trypsine (Lecroisey *et al*, 1983).

- Propriétés biochimiques :

L'hypodermine A (HA) a une activité maximale pour un pH compris entre 7 et 8.5. L'HA est stable pour une température inférieure à 55°C : lorsque la température est maintenue à 55°C pendant 10 minutes, l'activité estérasiq ue est maintenue. En contre-partie si l'on dépasse ce seuil de température, l'HA montre une perte d'activité protéasique très importante. Son poids moléculaire est de 27 kDa. Deux ponts disulfures sont intégrés à la structure de la protéine. Elle a une activité de type estérase et amidase sur les substrats synthétiques spécifiques de l'activité trypsique. Aucune activité sur les substrats spécifiques de l'activité chymotrypsique n'est constatée (Tong *et al*, 1981).

L'hypodermine B (HB) a une activité maximale pour un pH compris entre 8.5 et 10.2 avec un maximum à pH 8.5. Son activité protéasique est totalement inhibée à un pH inférieur à 4.5, mais cette inactivation est réversible : elle est retrouvée après une incubation à pH 8.5. L'HB est stable thermiquement à 55°C. Elle perd 50% de son activité après 20 minutes à 60°C. Au delà de 65°C aucune activité n'est constatée. Son poids moléculaire est de 23 kDa. Deux ponts disulfures seraient présents au sein de sa structure. Elle exerce une activité estérase et

amidase sur des substrats spécifiques de l'activité trypsique mais aucune sur des substrats spécifiques de l'activité chymotrypsique. Aucun effet sur le collagène natif n'est observé (Lecroisey *et al*, 1983). Aucune enzyme à activité chymotrypsique n'a été retrouvée chez *Hypoderma lineatum*

L'hypodermine C (HC) a une activité maximale pour un pH optimal compris entre 8 et 8.5 et ce, avec du collagène comme substrat. En dessous d'un pH de 4.5, l'enzyme est totalement inactive. Comme pour les deux autres hypodermines, cette inactivation est totalement réversible. En effet, si on incube en suivant l'enzyme à pH 8.5, elle retrouve son activité maximale (Lecroisey *et al*, 1985). HC est également très stable à haute température : en dessous de 60°C, après une incubation de 2 heures, aucune perte d'activité n'est constatée. L'inactivation totale de l'enzyme a lieu lorsque la température est amenée à 75°C pendant 2 heures (Lecroisey *et al*, 1985). L'HC a un poids moléculaire de 25,23 kDa et sa séquence est de 230 acides α aminés (Lecroisey *et al*, 1987). Son point isoélectrique est de 4.1 (Lecroisey *et al*, 1979). L'HC n'a aucune action sur les substrats synthétiques spécifiques des activités chymotrypsique et trypsique. De même aucune activité de type élastase n'a pu être constatée. En revanche son activité collagénolytique a été démontrée : elle clive le collagène dans sa partie hélicoïdale (dans la triple hélice) en deux fragments, N-41 (3/4 de longueur) et 44-C (1/4 de longueur). Elle a également une activité caséinolytique (Lecroisey *et al*, 1985).

c) Chez *Lucilia cuprina*

- Mise en évidence des sérine-protéases à activité trypsique et chymotrypsique :

L'aprotinine et le PMSF inhibent l'activité des protéases neutres et alcalines des PES de L2. Ces inhibiteurs réagissent spécifiquement avec des groupements de type sérine et mettent ainsi en évidence que ces protéases sont des sérine-protéases (Bowles *et al*, 1988).

L'enzyme ayant une activité collagénolytique n'est pas inhibée par l'EDTA et n'est donc pas une métallo-protéase. Elle est identifiée comme une sérine-protéase par les inhibiteurs cités ci-dessus (Bowles *et al*, 1988) et présente de ce point de vue une ressemblance avec l'HC.

Elvin *et al*, (1994) ont mis en évidence la présence de 125 à 220 gènes différents codant pour des sérine-protéases.

Sandeman *et al*, (1990) ont mis en évidence une activité trypsique en analysant par SDS-PAGE les PES après incubation avec le peptide spécifique VALNA. Deux bandes majeures sont visibles avec comme poids moléculaire 20 et 26 kDa. Les PES provenaient de larves de 48

heures post-éclosion qui étaient majoritairement sous forme de L2 et L3. On peut ajouter que la dégradation de ce peptide met aussi en évidence la présence d'activité de type plasmine au sein des PES.

- Propriétés biochimiques :

Sandeman *et al*, (1990) ont incubé des PES de larve de *Lucilia cuprina* avec un peptide spécifique de l'activité chymotrypsique : SAPNA. L'analyse par SDS-PAGE montre la présence d'une bande mineure correspondant à un poids moléculaire de 20 kDa avec les PES obtenus directement avec des larves 48 heures post-infection. On observe deux bandes majeures à 20 et 48 kDa et 3 bandes mineures aux environs de 28, 34 et 54 kDa avec des PES obtenus après 48 heures de culture.

Bowles *et al*, (1988) ont mis en évidence un pH optimal de 7.0 pour l'activité trypsique des PES des larves L2. Le nombre d'enzymes à activité trypsique, leur structure ainsi que leurs propriétés biochimiques n'ont pas fait l'objet d'études approfondies. En s'appuyant sur les résultats de Sandeman *et al*, (1990), on peut dire que 2 enzymes à activité trypsique sont présentes dans les PES des larves L2 et L3 avec comme poids moléculaire 20 et 26 kDa.

Tellam *et al*, (1994) ont isolé et purifié deux chymotrypsines nommées LCTb et LCTa des PES de L1. Il n'y a pas de réaction croisée entre ces deux enzymes donc cela amène à penser qu'elles sont synthétisées par des gènes différents ou alors que ce sont des variants alléliques. Leur poids moléculaire est voisin de 25 kDa. Casu *et al*, (1994) ont également travaillé sur ces deux enzymes. Ils ont confirmé le poids moléculaire de LCTb tandis que celui de LCTa a changé pour une valeur de 24 kDa. De ces deux enzymes, c'est LCTb qui est prédominante. Elles sont très instables : LCTa est très sensible à l'autolyse même conservée à 4°C. LCTb est plus stable mais reste sensible notamment lorsque sa conservation dépasse 3 à 4 jours à 4°C. LCTa et LCTb purifiées n'ont aucune action sur le substrat spécifique BAPNA et donc aucune activité trypsique. LCTb a été séquencée, 255 acides α aminés ont été identifiés. Cette séquence possède de nombreuses homologues avec la séquence de chymotrypsines à activité collagénolytique ce qui laisse supposer que LCTb pourrait dégrader le collagène. En ce qui concerne le pH, Bowles *et al*, (1988) ont montré que les protéases des PES de L2 ont une activité maximale pour un pH compris entre 7.0 et 8.0. Ces valeurs sont donc valables pour ces chymotrypsines.

Les enzymes à activité chymotrypsique ne sont sûrement pas toutes identifiées, en effet Sandeman *et al*, (1990) ont mis en évidence des enzymes à activité chymotrypsique avec des poids moléculaires de 20 et 48 kDa notamment.

2.2.4. Lieu de synthèse et évolution au cours des stades larvaires

a) Chez *Oestrus ovis*

En GS-PAGE, la comparaison des profils de dégradation de la gélatine par les PES avec le contenu protéique et les protéines membranaires de cellules épithéliales du tube digestif a révélé une forte homologie. On peut donc en conclure que l'origine des protéases est digestive. Elles seraient sécrétées par les cellules épithéliales du tube digestif, exportées dans la lumière et sécrétées sur la muqueuse nasale (Tabouret, 2001).

D'après Tabouret (2001), il n'y a pas de variation qualitative entre le profil des PES de L1, L2 et L3. Les protéases seraient donc conservées au cours du développement larvaire. Mais la quantité de protéases libérées *in vitro* par chacun de trois stades est variable : les larves L1 sécrètent moins de protéases que les larves L2 et L3. Il semblerait donc que la quantité de PES libérés par les larves augmente avec le degré d'évolution du parasite (Tabouret, 2001).

b) Chez *Hypoderma lineatum*

D'après Boulard (1969), les trois hypodermes seraient sécrétées pendant la phase mobile du cycle c'est à dire durant la migration de L1 dans les glandes salivaires. Elles seraient ensuite réabsorbées avec du tissu conjonctif dégradé, et stockées au sein de l'intestin moyen de la larve. Elles seraient ensuite excrétées de nouveau pendant la première mue du stade larvaire L2 immobile.

Le contenu enzymatique entre L1, larve mobile, et L2 et L3, larves immobiles, est différent (Boulard, 1969). En effet, L1 doit progresser à travers le tissu conjonctif de l'hôte et accumuler des réserves utilisables pour les stades larvaires suivants. Par conséquent les PES de L1 ont des concentrations enzymatiques supérieures en collagénases et en protéases notamment par rapport à L2 et L3.

c) Chez *Lucilia cuprina*

Casu *et al*, (1996) ont montré par RT-PCR et immunoblotting que l'enzyme à activité chymotrypsique (LCTb) contenue dans les PES larvaires est une protéase digestive d'origine intestinale. Elle est synthétisée au sein du cardia, petit organe contenant peu de cellules sécrétrices (environ 1000) et responsable également de la synthèse du type 2 de la matrice péritrophique, localisée en avant de l'extrémité postérieure de l'intestin moyen. La synthèse au niveau de l'intestin postérieur est minime alors qu'il n'y a aucune synthèse au niveau des glandes salivaires. L'enzyme est exprimée au stade œuf et durant les trois stades larvaires. Elle est absente des stades pupes et adulte. Casu *et al*, (1996) ont aussi montré que le niveau relatif d'expression cellulaire de LCTb dans chaque stade larvaire est constant, même si les larves sont de tailles différentes. Il y a deux hypothèses pour expliquer la présence de cette enzyme dans les PES : soit elle est évacuée avec les déchets, il faut pour cela qu'elle soit produite en grande quantité et qu'elle soit très stable, soit elle accompagne les régurgitations des composants intestinaux. Cette dernière supposition serait la plus probable d'autant plus que l'on a retrouvé une petite quantité de LCTb dans le jabot, organe antérieur au cardia qui ne synthétise pas l'enzyme (Casu *et al*, (1996)).

Casu *et al*, (1994) ont montré que les trypsines étaient les enzymes digestives majeures de l'intestin. On peut donc penser que tout comme LCTb, les trypsines pourraient être synthétisées à ce niveau.

Bowles *et al*, (1988) ont mis en évidence l'absence de différences majeures dans la composition enzymatique des PES des trois stades larvaires, ce qui est en accord avec les résultats présentés ci-dessus. De même Skelly *et al*, (1987) ont constaté que les profils électrophorétiques des PES de L1 et L2 étaient semblables. On peut conclure d'après ces résultats que l'équipement enzymatique des larves de *Lucilia cuprina* reste quasiment identique au cours des trois stades larvaires. Cependant Young *et al*, (1996) ont observé des variations au cours des heures suivant l'éclosion. Une protéase de 28 kDa apparaît une heure après l'éclosion et disparaît après 3 heures : elle doit avoir un rôle spécifique dans l'éclosion ou le développement larvaire précoce. De même on trouve des protéases de 32 et 36 kDa uniquement 3 heures post-éclosion ce qui laisse suggérer un rôle important dans la formation de la plaie. Des modifications enzymatiques sont donc effectuées au cours des premières heures de la vie

larvaire. Cette précocité peut expliquer le fait que ces changements n'aient pas été constatés lors des résultats évoqués ci-dessus.

I.3. Les produits excrétés/sécrétés non enzymatiques

3.1. L'ammoniac

3.1.1. Modalité de l'excrétion

L'excrétion d'ammoniac n'a été constatée que chez *Lucilia cuprina*.

- Quantité excrétée : Lennox, (1941) montre que 100 larves L1 produisent et excrètent plus de 80 mg d'azote de l'ammoniac par jour.
- Forme majoritaire excrétée : Lennox, (1941), Guerrini *et al.*, (1988a) montrent que l'ammonium est excrété majoritairement par les larves sous forme de bicarbonate d'ammonium (NH_4^+ , HCO_3^-).
- Devenir de l'ammonium excrété : Visek, (1984) montre qu'une large proportion de l'ammonium excrété est converti en ammoniac sous la forme lipidique soluble non ionisée et toxique, NH_3 , qui devient ainsi la forme majoritaire sur le site d'infection.

3.1.2. Toxicité de l'ammoniac

- Forme toxique : c'est la forme non ionisée, NH_3 , qui est la plus toxique de part sa faculté à pénétrer aisément à l'intérieur des cellules. Il en résulte une augmentation du pH intracellulaire qui a pour conséquence de modifier la structure des protéines et donc leur fonction (par exemple l'activité enzymatique), (Guerrini, 1988).
- Hyperammoniémie : Guerrini, (1988) constate une augmentation significative du pH sanguin, de la concentration en NH_4^+ et en NH_3 au niveau des jugulaires pendant l'infestation due aux larves de *Lucilia cuprina*. De plus, il a montré également une concentration en NH_3 dans les veines qui drainent l'infestation 8 fois supérieure par rapport à la concentration normale au niveau des jugulaires et des carotides (516 $\mu\text{mol/l}$ et 58 $\mu\text{mol/l}$ respectivement). Le passage de l'ammoniac dans les fluides corporels pourrait être facilité par l'inflammation accompagnant l'infestation.

- Lésions des organes : Guerrini *et al.*, (1988) montre par autopsie de moutons infestés avec des larves de *Lucilia cuprina* une dermatose aiguë sévère, une congestion du foie, du cœur, des reins, de la rate et des poumons. Des hémorragies ecchymotiques sont présentes sur le cœur, les reins et les glandes surrénales sur plusieurs moutons infestés. Au niveau microscopique, on note une vacuolisation pouvant être sévère du système nerveux central ainsi qu'une infiltration des tissus cutanés, pulmonaires, cardiaques, rénaux et hépatiques par des cellules mononucléaires, des neutrophiles ou des lymphocytes.
- « doses létales » : Guerrini, (1988) constate que sur douze moutons infestés par des larves de *Lucilia cuprina*, six meurent avec une concentration en NH_3 dans le sang supérieure à 200 $\mu\text{mol/l}$. Les 6 autres moutons ont maintenu leur concentration en NH_3 inférieure à cette concentration seuil et ne sont pas morts.
- Vissek, (1984) montre qu'une très légère augmentation de pH entraîne une augmentation très importante de la toxicité due à l'ammoniac sur les cellules. En effet, nous avons vu que la forme toxique de l'ammoniac était la forme non ionisée NH_3 de part sa faculté à diffuser à l'intérieur des cellules. Si l'on considère le couple acido-basique (NH_4^+ , NH_3) la formation de NH_3 est bien favorisée par une augmentation de pH ($\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$). De plus Lennox, (1941) a mis en évidence un pH optimum de 8.3 pour une production optimale d'ammoniac par les larves de *Lucilia cuprina*.

3.2. La protéine Péritrophine-95 (P-95)

3.2.1. Mise en évidence de P-95 dans les PES de larves de *Lucilia cuprina*

Tellam *et al.*, (2000) démontre par ELISA et Immuno-blots que des sérums de moutons infestés naturellement ou artificiellement avec des larves de *Lucilia cuprina* reconnaissent la P-95 alors que des sérums de moutons non infestés non. Ainsi il en a conclu que la protéine stimule la réaction immunitaire de l'hôte et donc qu'elle devait être exposée au système immunitaire du mouton.

En analysant les produits régurgités/excrétés larvaires par immuno-blots, purification par immuno-affinité et séquençage amino-terminal, il a mis en évidence la présence d'une forme soluble monomérique de la protéine P-95.

3.2.2. Structure et propriétés physico-chimiques ((Casu *et al*, (1997), Tellam *et al*, (1999)).

La protéine P-95 est une glycoprotéine qui se décompose selon l'ordre suivant (figure 4) :

- D'une séquence signal amino-terminale de 24 acides α aminés.
- De 5 domaines peritrophine-A successifs contenant chacun 60 à 70 acides α aminés et riches en résidus cystéine. Il y a six résidus cystéine par domaine qui seraient impliqués dans la formation de trois ponts disulfures intra-domaine. Au sein de cette partie de la protéine, quatre sites de glycosylations potentielles à partir de liaison amine sont connus. Ces cinq domaines riches en cystéine permettraient à la P-95 de se lier à d'autres protéines et à la chitine qui est un constituant de la membrane péritrophique.
- D'une séquence carboxyl-terminale de 139 acides α aminés riche en proline et en thréonine et ne contenant pas de cystéine. Cette séquence est composée de structures répétitives de deux types : le type 1 est une structure pentamérique à base de proline, glutamate et thréonine répétée dix-huit fois, le type 2 est une structure tétramérique à base de lysine, proline et thréonine répétée quatre fois. L'abondance de proline et de thréonine au sein de cette séquence offre également des sites de glycosylations potentielles à partir de liaison carboxyl. Cette dernière séquence est apparentée à la structure de la mucine des mammifères qui est une glycoprotéine qui assure une fonction de protection de l'épithélium des voies digestives notamment.

La P-95 a pour poids moléculaire, mesuré par SDS-PAGE, 80kDa, ce qui est contraire à celui calculé à partir de sa séquence en acides α aminés qui est de 50.1kDa. Ceci peut s'expliquer par les nombreux oligosaccharides qui peuvent se lier sur les nombreux sites de glycosylation notamment dans le domaine riche en proline et thréonine.

Le point isoélectrique a été mesuré à 4,5.

En conclusion c'est une protéine avec une structure très complexe et qui présente une homologie avec la mucine.

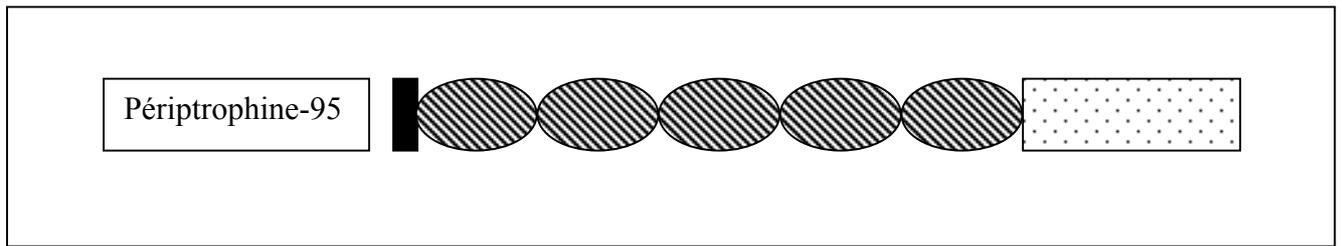
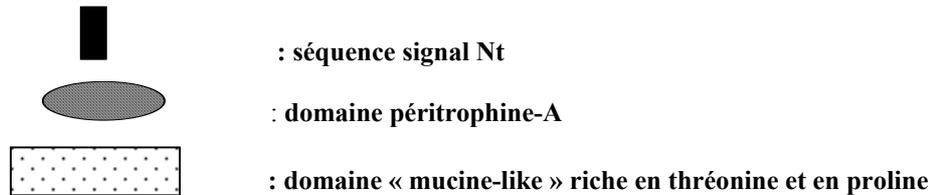


Figure 4 : Diagramme de représentation de la protéine Péritrophine-95.



3.2.3. Lieu de synthèse et distribution de la protéine

Tellam *et al*, (2000) ont montré par RT-PCR que l'expression de l'ARNm de P-95 était réduit au cardia, aucune expression n'ayant pu être décelée en particulier au niveau des glandes salivaires et de l'intestin moyen. On peut donc en déduire que la P-95 est synthétisée exclusivement au niveau du cardia. Ce dernier est un petit organe localisé antérieurement à l'intestin moyen. De plus cette synthèse a lieu pendant tous les stades larvaires mais est absente des stades œuf, pupe et adulte.

Tellam *et al*, (2000) ont localisé par immunofluorescence et immunogold la P-95 au sein de la matrice péritrophique ou membrane péritrophique (PM), avec une distribution uniforme.

La matrice péritrophique est une membrane semi-perméable constituée de protéines, de glycoprotéines, de microfibrilles de chitine dans une matrice de protéoglycannes. Elle se présente sous 2 formes : le type 1 qui est synthétisé à partir de l'épithélium de l'intestin moyen surtout en réponse à la nourriture et au type d'aliments ingérés, le type 2 qui est synthétisé par le cardia formant une gaine continue le long de l'intestin toujours présente (Lehane, 1997), (Eisemann and Binnington, 1994).

Elle compartimente ainsi la lumière intestinale en 2 zones: l'une entre l'épithélium intestinal et la matrice nommée espace ectopéritrophique et l'autre entre la matrice et la lumière intestinale nommée espace endopéritrophique (Eisemann and Binnington, 1994).

Elle a pour rôle de protéger l'épithélium intestinal moyen des particules abrasives, de protéger les insectes des invasions, notamment virales, bactériennes et protozoaires, et de faciliter le processus digestif dans l'intestin (Eisemann and Binnington, 1994).

Pour extraire la P-95 de la PM il faut employer un agent dénaturant très puissant type 6M urée (Casu *et al*, 1997). Cette constatation combinée avec sa distribution uniforme au sein de la membrane laisse supposer que la P-95 a un rôle structural au sein de cette dernière. La P-95 aurait son domaine riche en proline et thréonine exposé à l'extérieur de la matrice avec pour rôle de lubrifier les aliments pour permettre la progression au sein du tube digestif (figure 5). Tandis que l'ensemble des cinq domaines serait à l'intérieur de la matrice et interfèrerait notamment avec le réseau de chitine de la PM ce qui déterminerait la taille des pores et donc la perméabilité de la membrane (Casu *et al*, 1997), (Tellam *et al*, 1999).

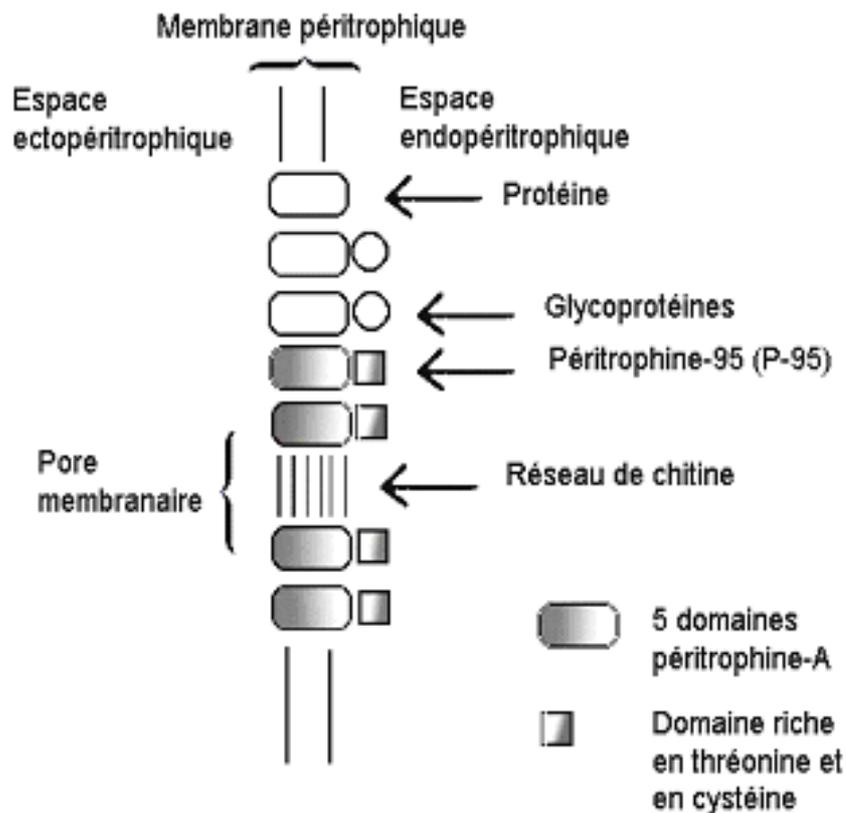


Figure 5 : Disposition de la Péritrophine-95 au sein de la Membrane Péritrophique

L'hypothèse évoquée par Tellam *et al*, (2000) pour expliquer la présence de cette protéine dans les régurgitations/excrétions larvaires serait que la P-95 soluble monomérique participerait à une phase de maturation de la membrane péritrophique. La P-95 soluble viendrait se lier à

une membrane péritrophique immature dans le but de favoriser l'incorporation de composants dans la matrice telle que les fibrilles de chitine et cela grâce au cinq domaines péritrophine-A. Une partie des protéines solubles utilisées pour la phase de maturation serait ainsi excrétée accidentellement.

3.3. Les PES synthétisés dans les glandes salivaires

Tabouret *et al.*, (2001) ont isolé et purifié par chromatographie d'échange d'ions un complexe protéique de 28 kDa synthétisé dans l'anneau des glandes salivaires des larves L2 et L3. L'analyse par Western-blotting montre que la bande obtenue par électrophorèse qui caractérise ce complexe protéique est en fait un ensemble complexe de protéines avec un poids moléculaire compris entre 24 et 29 kDa. Ce complexe protéique est retrouvé majoritairement dans les glandes salivaires et les PES et en petite quantité dans le contenu du tube digestif. Il existe une autre protéine majeure de 39 kDa (SDS-PAGE) retrouvée dans les glandes salivaires mais aussi dans les PES, l'extrait brut de L2 mais pas dans le contenu du tube digestif. Par Western-blots, le contenu des glandes salivaires et les PES se sont révélés être les plus antigéniques. Ces résultats diffèrent cependant de ceux de Innocenti *et al.*, (1995) qui avait identifié par SDS-PAGE des protéines de poids moléculaire 15, 18 et 23 kDa issues des glandes salivaires et retrouvées dans les PES des larves. On peut penser que la protéine identifiée à 23 kDa fait partie du complexe protéique évoqué ci-dessus. En revanche les deux autres valeurs ne correspondent pas. Ces protéines synthétisées au sein des glandes salivaires sont donc identifiées comme des PES larvaires et plus particulièrement des PES de L2 et L3. Cependant leur fonction biologique reste indéterminée et il n'y a pas de références bibliographiques disponibles à ce sujet. Il faudrait donc les séquencer afin de la déterminer. Mais le complexe de 28 kDa est très immunogène donc en contact avec le système immunitaire de l'hôte. De plus il n'intervient dans aucune fonction digestive larvaire. Par conséquent on peut se demander s'il n'est pas un complexe protéique de défense du parasite contre la réponse immunitaire de l'hôte ou s'il n'appartient pas à un système antioxydant.

I.4. Bilan

Tableau 4 : Les PES larvaires : synthèse.

Nature des PES	Espèce considérée	Activité, rôle	Poids moléculaires	Lieu de synthèse
Protéases	<i>Oestrus ovis</i>	chymotrypsique	20, 24, 29	Tube digestif
		Trypsique	69	Tube digestif
	<i>Hypoderma lineatum</i>	Trypsique (HA, HB)	HA : 27 HB : 23	Glandes salivaires
		Collagénolytique (HC)	HC : 25.23	Glandes salivaires
	<i>Lucilia cuprina</i>	trypsique	20, 26	Tube digestif
		Chymotrypsique (LTCb, LTCa)	LCTb : 25 LCTa : 24 20, 48	Tube digestif (cardia)
Protéines	<i>Oestrus ovis</i>	Indéterminée	15, 18, 28 (24-29), 39	Glandes salivaires
Pétriophine-95	<i>Lucilia cuprina</i>	Intégrité de la Matrice Péritrophique	80	Cardia
Ammoniac	<i>Lucilia cuprina</i>	Immunomodulation (NH ₄ ⁺ , HCO ₃ ⁻)		Indéterminé

Les PES de chacune des espèces de Diptères considérées montrent des similarités notamment en ce qui concerne les protéases (tableau 4). On retrouve les mêmes activités et les lieux de synthèses sont identiques pour *Lucilia cuprina* et pour *Oestrus ovis*. La comparaison des poids moléculaires n'éclaire pas la recherche du rôle du complexe protéique de 28 kDa. En effet, la protéine qui s'en rapprocherait le plus serait l'HA qui a un poids moléculaire de 27 kDa et qui est également synthétisée dans les glandes salivaires. Si on fait l'hypothèse d'un parallèle entre ces deux protéines, l'Ag de 28 kDa serait une protéase à activité trypsique. Cependant cette hypothèse est peu probable car d'une part ce dernier a été identifié par Innocenti *et al.*, (1995)

comme étant très immunogène et d'autre part Kumar, (1993) a montré que les protéases étaient des molécules peu immunogènes.

Nous avons pu également remarquer que la nature des PES quelle que soit l'espèce de larve variait très peu d'un stade larvaire à l'autre, contrairement à la quantité de protéases, qui augmente avec l'évolution des stades larvaires en relation sûrement avec des besoins larvaires croissants.

En ce qui concerne les protéines incorporées à la matrice péritrophique et excrétées par les larves, seules des recherches avec *Lucilia cuprina* ont été réalisées. C'est donc un domaine à explorer particulièrement pour *Oestrus ovis* dont l'intestin est lui aussi bordé par une membrane péritrophique.

Nous allons à présent nous intéresser aux rôles de ces PES dans le développement larvaire et notamment leur implication dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte et dans les mécanismes de nutrition larvaire.

II. Rôle des PES dans le développement larvaire

Les PES occupent une place prépondérante dans le développement larvaire. Ils interviennent notamment dans la protection des larves vis à vis du système immunitaire de l'hôte et dans la nutrition larvaire. Ils facilitent également l'établissement des larves, leur migration et la formation de lésions.

II.1. Protection vis à vis du système immunitaire de l'hôte

1.1. Clivage des IgG et des IgA

Les IgG ont une structure tétracaténaire c'est à dire formée de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes de poids moléculaires de 52 kDa qui sont nommées chaînes lourdes ou chaînes H (pour Heavy) et deux chaînes moléculaires de 23 kDa nommées chaînes légères ou chaînes L (pour Light). Les chaînes H et L sont identiques deux à deux. L et H sont unies par un pont disulfure et les deux chaînes H sont unies par des ponts disulfure de nombre variable. De plus des liaisons non covalentes renforcent la structure. Les extrémités NH₂-terminales de L et H constituent le site anticorps qui est la partie capable de reconnaître le déterminant antigénique. Les deux sites anticorps sont identiques entre eux. Une IgG possède toujours un minimum de deux sites anticorps.

Une IgG peut être attaquée par des enzymes protéolytiques (trypsine ou papaïne) qui clivent les chaînes en divers endroits (figure 6). On obtient ainsi trois fragments : deux fragments identiques entre eux qu'on appelle Fab (pour Ag binding), et un troisième fragment qui peut être obtenu à l'état cristallisé, d'où son nom : Fc.

Le fragment Fab peut reconnaître un déterminant antigénique tandis que le fragment Fc possède des propriétés effectrices. Les IgG peuvent se fixer au C1 du complément et donc l'activer *via* la voie classique. Elles peuvent aussi se lier à des récepteurs cellulaires engendrant

une promotion de la phagocytose par les polynucléaires et les macrophages appelée opsonisation, phénomène de cytotoxicité dépendant des anticorps.

D'autres enzymes peuvent attaquer les IgG comme par exemple la pepsine. Dans ce cas, cette attaque donne naissance à un gros fragment qui porte les deux sites anticorps. Il est donc bivalent et porte le nom de $F(ab')_2$ (ab' car il ne correspond pas vraiment à 2 Fab). Le reste de la molécule, le fragment F_c , est fragmenté en de nombreux petits polypeptides.

L'IgG est principalement retrouvée dans le sérum sous forme monomérique où sa concentration est voisine de 10 à 20 mg/ml.

L'IgA a une structure type équivalente à celle des IgG, par contre on peut la retrouver dans le sérum sous forme monomérique ou dimérique. Dans ce cas, c'est une chaîne J qui assure la fonction. Dans les sécrétions, ce dimère est uni par un composant sécrétoire dont le rôle présumé est de permettre à l'IgA de joindre les organes sécréteurs et de la protéger contre les enzymes protéolytiques sécrétées. L'IgA n'est pas capable de fixer le C1 et donc ne peut pas activer le complément (Bachet et Lesavre, (1991)) et n'entre pas non plus dans les mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps.

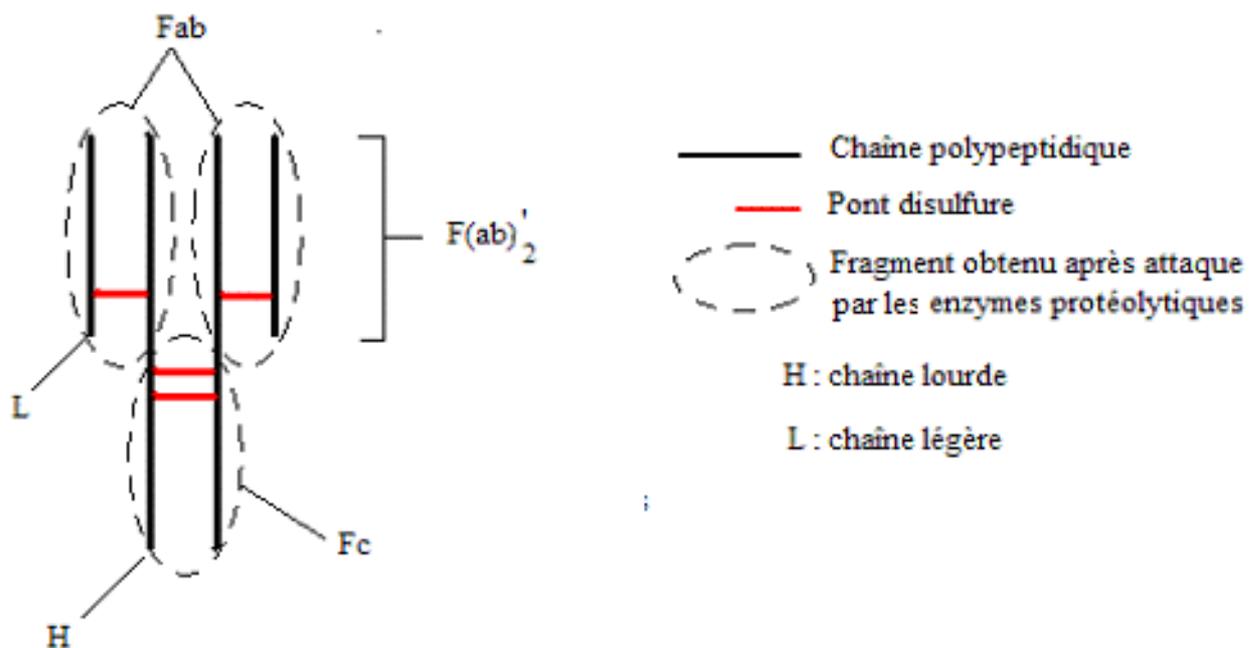


Figure 6 : Structure d'une immunoglobuline

1.1.1. Mise en évidence de l'activité protéasique des PES sur les IgG et les IgA

a) Chez *Oestrus ovis*

L'immunoglobuline G utilisée est un anticorps monoclonal de rat, de type IgG1. Les immunoglobulines A utilisées sont d'origine humaine. Elles sont mises en contact avec les PES de L1 et de L3 puis on analyse par électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices. Le profil de migration de la solution d'IgG1 témoin montre 3 bandes d'environ 25, 50 et 75 kDa. Après 12 heures de contact, les bandes 75 et 50 kDa disparaissent du profil de migration. Le profil de migration de l'IgA révèle 3 bandes d'environ 85, 55 et 25 kDa. Après un contact de 12 heures, les bandes de 85 et 55 kDa disparaissent.

Les bandes de 75 kDa de l'IgG et de 85 kDa de l'IgA correspondent très certainement à l'association d'une chaîne légère de 25 kDa et d'une chaîne lourde de 50 kDa pour l'IgG et de 55 kDa pour l'IgA. Ainsi les PES clivent la chaîne lourde des IgG et des IgA et laissent la chaîne légère intacte. On a donc la formation de deux fragments : F(ab')₂ qui conserve le site de liaison aux antigènes et Fc conservé.

b) Chez *Hypoderma lineatum*

Pruett, (1993) a incubé l'hypodermine A purifiée avec des IgG de bovins, moutons et de lapins. Les résultats sont analysés par SDS-PAGE en conditions non réductrices. Il apparaît que l'HA clive l'IgG bovine en deux fragments : le fragment F(ab')₂ et le fragment Fc qui reste intact. Il en ressort que les deux chaînes légères doivent rester intactes tandis que les deux chaînes lourdes sont clivées à la jonction Fc-F(ab')₂. Cette attaque est comparable à celle générée avec la pepsine. Ceci est en contradiction avec l'activité trypsique de l'hypodermine A. Cependant dans l'attaque de la pepsine, le fragment Fc est dégradé en de nombreux polypeptides tandis qu'avec l'HA il est conservé. Comme elle dégrade également les IgG des autres espèces à des degrés différents, on peut conclure que l'HA n'est pas spécifique des IgG d'origine bovine.

c) Chez *Lucilia cuprina*

Sandeman *et al.*, (1995) a réalisé des expériences sur des moutons immunisés avec de l'ovalbumine, puis infestés avec des larves de *Lucilia cuprina* dans le but d'étudier les immunoglobulines anti-ovalbumine, leur dégradation dans le sérum et dans l'exsudat des plaies de la myiase. Les exsudats sont analysés par SDS-PAGE et la dégradation des IgG par immunoblotting. Les anticorps monoclonaux mesurent la quantité d'IgG intactes dans l'exsudat tandis que les anticorps anti-IgG polyclonaux mesurent la quantité d'IgG intactes et d'IgG dégradées. Les résultats montrent que 60% des IgG dans l'exsudat sont dégradées six heures après infestation. Ces résultats sont confirmés par des travaux *in vitro* qui montrent la dégradation des anticorps de moutons par des enzymes larvaires de *Lucilia cuprina*.

Le suivi des produits issus de la dégradation des IgG par les PES des larves de *Lucilia cuprina* par immunoblotting montre que ces produits sont les mêmes que ceux obtenus en présence de chymotrypsine et de trypsine bovine. Cela laisse supposer que ce sont les protéases des PES à activité tryptique et chymotryptique qui sont responsables de cette dégradation.

1.1.2. Conséquence pour le système immunitaire

a) Chez *oestrus ovis*

L'activité protéasique a été mesurée sur des IgA humaines d'origine sérique. Or ce sont majoritairement les IgA sécrétoires qui arrivent au contact du parasite car elles possèdent une pièce sécrétoire, synthétisée par les plasmocytes sous-épithéliaux, qui facilite leur transport au travers de la barrière et les protège de la protéolyse. Mais une très faible proportion d'IgA d'origine plasmatique peut transsuder du plasma ou être transportée *via* des mécanismes sécrétoires annexes et arriver au contact des larves. Les IgG sont peu présentes dans les sécrétions du tractus intestinal mais très abondantes dans celles du tractus respiratoire. Elles transsudent probablement hors du plasma et viennent au contact du parasite. Ce phénomène s'accroît fortement dans les sites inflammatoires comme dans le cas de l'œstrose ovine.

En détruisant les anticorps, le parasite empêche leur fixation dans des régions anatomiques sensibles telles que les plaques stigmatiques (respiration) ou encore la zone péri-

orale (nutrition) et inhibe l'avènement des mécanismes cellulaires dépendants d'anticorps à sa surface (ADCC) ainsi que l'opsonisation (figure 7).

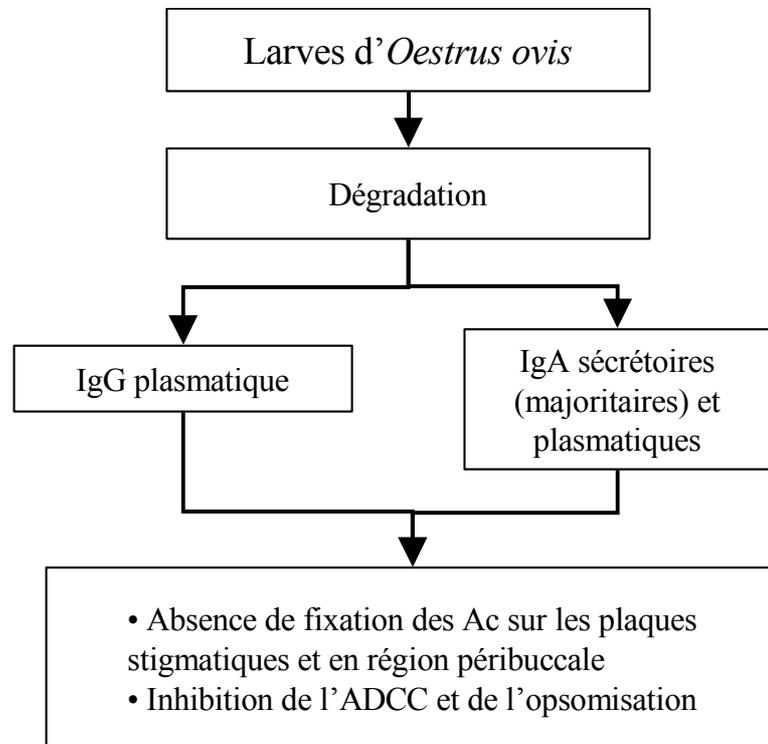


Figure 7 : Activité protéasique des PES sur les IgG et les IgA et conséquences pour le système immunitaire.

b) Chez *Hypoderma lineatum*

L'activité protéasique de l'hypodermine A est dirigée uniquement contre l'IgG contrairement aux protéases d'*Oestrus ovis*. Cependant, les conséquences sur le système immunitaire sont similaires à celles d'*Oestrus ovis*. La dégradation des IgG en deux fragments leur fait perdre leurs propriétés effectrices : elles ne peuvent plus activer le complément ni participer aux phénomènes de cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps. Le fragment F(ab')₂ conserve quant à lui sa capacité à se lier aux antigènes. C'est donc un moyen d'échapper aux réactions immunitaires spécifiques de l'hôte (Pruett, 1993).

c) Chez *Lucilia cuprina*

L'activité protéasique des PES des larves de *Lucilia cuprina* envers les IgG localisées dans l'exsudat de la plaie occasionnée par la myiase, entraîne une perte de leur fonction effectrice comme pour les deux myiases citées ci-dessus et donc diminue la capacité des anticorps à attaquer les larves. Mais cette dégradation ne condamne pas leur activité antigénique. Si le fragment Fab ou la chaîne lourde variable sont conservés, les IgG dégradées restent capables de se lier à leur antigène. Ces anticorps plus petits que l'on peut nommer des fragments d'anticorps auront une application vaccinale que nous verrons dans la prochaine partie. En effet, de par leur petite taille, ces fragments d'anticorps peuvent passer à travers la matrice péritrophique et ainsi atteindre d'autres cibles, d'autres antigènes et donc étendre les cibles vaccinales.

1.2. Action sur le complément

Le complément représente avec les anticorps, l'élément essentiel du système humoral de la défense contre les agents infectieux. Il est constitué d'une vingtaine de protéines circulantes capables d'interagir avec certaines membranes biologiques. L'activation en cascade de ses différents composés est à l'origine de l'apparition d'activités biologiques variées amenant à la lyse cellulaire, bactérienne ou virale. Elle entraîne également le recrutement et l'activation de nombreux effecteurs cellulaires, notamment en provoquant la production d'histamine par les mastocytes et en stimulant le chimiotactisme et la phagocytose des polynucléaires. Ce système est à la charnière entre l'immunité spécifique et l'immunité non spécifique, car l'activation du complément peut être déclenchée par certaines bactéries, parasites, virus ou par la formation d'immuns complexes sécrétés par le système immunitaire spécifique.

Le système « complément » peut être opérationnellement divisé en trois unités : deux unités de reconnaissance conduisant à des activations parallèles mais distinctes et une unité effectrice terminale commune. La voie classique est activée par les anticorps combinés à l'antigène. Elle ne se met donc en œuvre qu'en présence d'anticorps. La voie alterne est activée directement par certains polysaccharides bactériens en l'absence d'anticorps. Elle constitue un moyen de défense anti-infectieux immédiat, en place avant même le développement d'une immunité spécifique.

La protéine C3 est au carrefour des deux voies. Elle entre dans la cascade d'activation de la voie classique et dans l'activation de la voie alterne. Mais dans ce second cas, l'activation est effectuée par une stimulation directe de C3 sans l'activation préalable des facteurs C1, C2 et C4 comme dans la voie classique (Bach et Lesavre, 1991).

1.2.1. Clivage de la protéine C3 du complément par les PES des larves d'*Hypoderma lineatum*.

Boulard *et al.*, (1984) ont testé l'aptitude des 3 sérine-protéases HA, HB, HC des larves L1 d'*Hypoderma lineatum* à réduire l'activité du complément sérique de bovins naïfs ou préalablement immunisés. Ils ont montré sur les bovins naïfs, une diminution de l'activité du complément initiée par HB à travers la séquence C1-C3 avec une concentration en HB de 5µg/ml de sérum, et par HA sur la séquence C3-C9 à une concentration de 150µg/ml de sérum. HC, qui a une activité collagénolytique, n'a pas d'activité anti-complément. Cette diminution du complément s'effectue donc à travers les deux voies d'activation du complément : la voie classique et la voie alterne.

Ces travaux ont été poursuivis par Boulard, (1989). Les enzymes purifiées d'*Hypoderma lineatum* sont soumises à une expérience visant à évaluer leur activité protéolytique sur la protéine C3 de bovin dans un sérum de bovin normal. Les produits de clivage obtenus avec les sérine-protéases (HA, HB, HC) sont analysés par électrophorèse dans un gel SDS polyacrylamide suivi d'un immunoblotting.

Les résultats ont montré que l'attaque enzymatique était initiée sur la chaîne polypeptidique alpha de la protéine C3 par HA à la concentration de 1µg/ml de sérum de 24 heures et par HB à la concentration de 5µg/ml de sérum de 24 heures. Les peptides générés diffèrent par la taille moléculaire des produits obtenus par la dégradation naturelle de C3 dans un sérum de contrôle contenant des enzymes physiologiques. On peut donc en déduire que le clivage de C3 par les enzymes des larves d'*Hypoderma lineatum* entraîne une inactivation de la protéine et de ces fragments naturellement clivés. Il a constaté que l'HA à la concentration de 1µg/ml clive également la chaîne bêta de C3. Pour une concentration de 5µg/ml, HA entraîne une dégradation totale de C3. Comme dans les résultats présentés ci-dessus, HC ne montre aucune activité anti-complément dans un sérum normal.

Enfin Baron, (1990) a complété ces travaux. Il a montré également que l'HA et l'HB étaient efficaces pour dégrader la chaîne alpha de la protéine C3 purifiée à une concentration de

1µg/ml. Il a aussi mis en évidence que pour une concentration de 50 µg/ml, l'HA dégrade totalement les deux chaînes de C3. Ce résultat et celui concernant la valeur de la concentration en HB nécessaire au clivage de la chaîne alpha diffèrent de ceux obtenus par Boulard, (1989) et présentés ci-dessus. Ceci est peut-être en relation avec le fait que les expériences de Boulard se sont déroulées avec du sérum de bovin tandis que Baron a travaillé avec une protéine C3 purifiée. L'HB ne clive pas dans cette étude la chaîne bêta de C3.

1.2.2. Bilan

Les sérine-protéases HA et HB engendrent un clivage de la protéine C3 du complément sur du sérum de bovins naïfs : elles sont toutes les deux capables de cliver la chaîne alpha de la protéine. En revanche, seule l'HA semble en mesure de pouvoir cliver la chaîne bêta. De même la dégradation totale de la protéine n'est constatée qu'en présence de l'HA. Cette action est dose-dépendante. Les concentrations en HA et HB lors des expériences reflètent les concentrations *in vivo* auxquelles la protéine bovine C3 doit faire face lors d'infestation à *Hypoderma lineatum*. Par conséquent, on met bien en évidence le rôle immunomodulateur des hypodermes A et B par action sur le complément. C'est une stratégie du parasite pour échapper aux réactions de défense de l'hôte notamment aux réponses immunitaires spécifiques et non spécifiques. Cette dégradation de la protéine C3 entraîne une diminution de la réponse inflammatoire autour de la larve migrante qui peut ainsi échapper à la réponse immunitaire non spécifique d'un hôte non exposé antérieurement. Ce déficit de la réponse inflammatoire autour de la larve en migration sur des bovins non exposés aux parasites avait déjà été remarqué par Nelson et Weintraub, (1972). Il faut également remarquer que dans chacune des expériences, l'HC n'a montré aucune activité.

1.3. Action sur la prolifération lymphocytaire

1.3.1. Facteurs immunologiques

a) Les mitogènes

Ce sont des substances qui activent les lymphocytes indépendamment de leur spécificité pour l'antigène. Cette activation conduit à la différenciation et à la multiplication des cellules immunocompétentes. En effet les mitogènes sont capables d'activer une cellule jusqu'à la mitose. Au sein des mécanismes immunitaires, on les nomme aussi activateurs polyclonaux. Ils sont produits par les lymphocytes T auxiliaires qui stimulent les LT dans le cadre de la coopération LT-LB avec pour but l'activation des LB. On peut citer par exemple la concanavaline A (Bach et Lesavre, 1991).

b) Les molécules membranaires

Sur les différentes cellules actrices de la réponse immunitaire sont localisés des récepteurs membranaires. Parmi eux, on trouve des protéines appartenant au CMH I qui sont localisées sur toutes les membranes des cellules nucléées, et des protéines appartenant au CMH II qui sont localisées uniquement aux lymphocytes, et aux cellules présentatrices d'antigène dans le cas des cellules jouant un rôle dans la réponse immunitaire. Ces cellules pourvues à leur surface des molécules de classe I ou de classe II vont avoir pour rôle de présenter un antigène remanié aux lymphocytes T et déclencher ainsi une réponse immunitaire spécifique. Si la cellule de classe II présentatrice de l'antigène est un LB alors il y aura différenciation du LT en Lta2 (Lymphocyte T auxiliaire 2) qui engendrera une multiplication des LB et leur différenciation en plasmocytes, cellules sécrétrices des anticorps reconnaissant l'antigène présenté par les LB (Bach et Lesavre, 1991).

A la surface des LT sont localisés des antigènes de différenciation séparés en plusieurs classes, par exemple CD4 pour Cluster of Differentiation de classe 4. Ces antigènes ont pour certain d'entre eux un rôle bien défini : les CD4 et les CD8 participent à la liaison entre les cellules T et les protéines membranaires du complexe majeur d'histocompatibilité (classe I pour CD8 et classe II pour CD4) impliquées dans la reconnaissance de l'antigène. D'autres molécules telles que le CD2 sont responsables d'adhésion cellulaire et d'activation des LT

indépendamment du récepteur T. Le CD18 réparti à la surface des leucocytes et des phagocytes interagit quant à lui avec le récepteur du complément CR3 (Bach et Lesavre, 1991).

c) L'interleukine 2 ou IL-2.

C'est une cytokine synthétisée principalement par les lymphocytes T auxiliaires (LTa). Sa production nécessite l'intervention de deux signaux : le premier est l'antigène lui-même présenté aux cellules T CD4+ productrices d'IL-2 en association avec les antigènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMHII), le second est l'IL-1.

L'IL-2 induit la prolifération des cellules T (c'est un facteur de croissance des cellules T activées) après s'être fixée sur un récepteur membranaire de forte affinité. L'expression du récepteur de l'IL-2 à la surface des cellules T est transitoire et nécessite l'activation des cellules par un antigène ou un mitogène. Elle est aussi responsable de l'induction de la production d'autres cytokines, elle peut augmenter l'activité des cellules NK (Natural Killer) et LAK (Lymphokine Activated Killer). Elle a un rôle dans la prolifération des Lymphocytes B qui présentent un récepteur pour l'IL-2 à leur surface et elle agit sur les monocytes et les macrophages pour renforcer leur pouvoir de destruction des substances étrangères ingérées (Bach et Lesavre, 1991).

1.3.2. Inhibition de la prolifération lymphocytaire en réponse aux mitogènes

a) Chez *Oestrus ovis*

Les lymphocytes circulants ont été cultivés. Leur prolifération a été induite par addition de concanavaline A. Les lymphocytes ont ensuite été stimulés avec les PES de chaque stade larvaire à concentration croissante. Soixante-cinq heures post-stimulation, la prolifération cellulaire a été mesurée à l'aide d'un kit colorimétrique mesurant la quantité de cellules viables en prolifération. Les résultats montrent que les lymphocytes, provenant d'animaux indemnes d'*Oestrus ovis*, ont proliféré en présence de Concanavaline A. La prolifération des cellules, malgré la présence de concanavaline A, a été inhibée de 23% par les PES de L1 et de 16.4% par les PES de L2. Les PES de L3 n'ont pas modifié la prolifération des lymphocytes induite par la Concanavaline A (environ 3.8%) (Tabouret, 2001).

b) Chez *Hypoderma lineatum*

Boulard et Chabaudie, (1992) ont réalisé des expériences visant à évaluer l'effet de l'hypodermine A sur la réponse immunitaire cellulaire *in vitro* et *in vivo*. La prolifération lymphocytaire bovine a été stimulée avec les mitogènes phytohématagglutinine (PHA), concanavaline A (ConA) et pokeweed mitogène (PWM) ou avec l'antigène HA. *In vivo*, l'administration de HA a été réalisée sur des bovins naïfs et pré-infestés pour évaluer la sensibilité des lymphocytes périphériques sanguins aux antigènes et aux mitogènes. Ils ont observé une diminution de la prolifération des lymphocytes en réponse aux mitogènes sur les bovins naïfs comme sur les bovins immunisés. Cette activité inhibitrice a été constatée pendant le temps d'administration de HA seulement. Ces résultats sont similaires avec ceux présentés ci-dessus pour *Oestrus ovis*. En revanche, dans ce cas-ci, l'HA a de plus engendrée une forte inhibition de la prolifération lymphocytaire induite à la PHA, qui est un inducteur de la prolifération des LT, *in vivo* et *in vitro*. Après induction au PWM, qui est un inducteur de la prolifération des LB, et en contact avec l'HA, les lymphocytes ont proliféré. L'ensemble de ces résultats montre que l'HA réduit de façon significative la réponse immunitaire spécifique et empêche le développement des mécanismes de mémoires immunitaires.

Chabaudie et Boulard, (1993) ont montré *in vitro* et *in vivo* que l'hypodermine C ne modifiait pas la réponse proliférative des lymphocytes de bovins, immunisés ou non.

c) Chez *Lucilia cuprina*

Kerlin, (1993) a réalisé des expériences où il a mis en évidence que les PES des larves de *Lucilia cuprina* inhibaient significativement la prolifération des leucocytes sanguins périphériques stimulés par des mitogènes *in vitro*. Les effets immunosuppresseurs des PES ont également été observés *in vivo*. Des moutons ont reçu une injection de myoglobine simple ou associée à des PES. On a mesuré les concentrations d'anticorps anti-myoglobine dans leur sérum : ils se sont révélés très faibles dans le cas des moutons ayant reçu des PES par rapport à ceux n'ayant reçu qu'une injection seule de myoglobine. L'effet inhibiteur sur la prolifération lymphocytaire est bien un mécanisme qui a lieu *in vivo* lors d'une infestation aux larves de *Lucilia cuprina*. Il facilite la survie du parasite en inhibant la réponse immunitaire de l'hôte.

1.3.3. Action sur les molécules membranaires

a) Chez *Oestrus ovis*

L'inhibition de la prolifération lymphocytaire provoquée par les PES de L1 et L2, pourrait être le fait de l'activité des sérine-protéases contenues dans les PES sur l'expression des marqueurs de surface lymphocytaires impliqués dans la prolifération de ces cellules comme c'est le cas dans l'hypodermose (Moiré *et al*, 1997).

b) Chez *Hypoderma lineatum*

Moiré *et al*, (1997) ont étudié les effets de l'HA sur les marqueurs cellulaires de surface des lymphocytes bovins. Pour cela, ils ont utilisé des anticorps monoclonaux colorés spécifiques des antigènes de différenciation des lymphocytes bovins. En présence de l'HA, la coloration des anticorps anti-BoCD2 et CD5 disparaît totalement tandis que celle des anticorps anti-BoCD4, CD8 et CD18 est seulement réduite. Ils ont ainsi mis en évidence le clivage à des degrés différents des marqueurs cellulaires de surface des lymphocytes bovins par l'HA. Ces résultats sont confirmés par les faits suivants : un traitement à la chaleur ou avec le PMSF qui inhibe l'activité protéasique de l'HA permet de maintenir l'intégrité de la structure des antigènes de surface. Cette action est réversible et la concentration en HA nécessaire est de 100 µg/ml.

Ainsi l'activité enzymatique de l'HA sur les marqueurs de surface des lymphocytes peut être impliquée dans l'inhibition de la prolifération lymphocytaire comme le laisse suggérer les rôles de ces derniers. Sans CD4 et CD8, la reconnaissance de l'antigène présenté par les cellules de classe I ou de classe II n'est plus possible et donc le développement des réponses immunitaires à médiation cellulaire et humorale également.

c) Chez *Lucilia cuprina*

Kerlin, (1993) a constaté que la suppression de la prolifération des leucocytes sanguins n'était pas due à des dégradations irréversibles puisque les cellules cultivées pendant 24 heures avec de fortes concentrations en PES apparaissaient viables et que leur prolifération ne variait pas après un lavage et donc après la disparition des PES. De plus la suppression induite par les PES a pu être surmontée en augmentant la concentration en mitogènes.

D'autres expériences *in vitro* ont montré que l'activité inhibitrice des PES était labile à la chaleur et sensible aux traitements contenant de la trypsine. Il en ressort que les protéases contenues dans les PES des larves sont sûrement responsables de cette activité inhibitrice.

L'hypothèse retenue serait que les molécules du complexe d'histocompatibilité de classe II seraient clivées par ces protéases. Il en résulterait, d'après le rôle de ces molécules évoqué précédemment, une impossibilité ou une diminution des présentations d'antigènes aux lymphocytes T auxiliaires et donc une inhibition de la réaction immunitaire à médiation cellulaire et également humorale, puisque ces lymphocytes participent à la différenciation des Lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps.

1.3.4. Action sur la production d'IL-2

Nicolas-Gaulard et Moiré, (1995) ont étudié l'influence de l'HA sur la production d'IL-2. Ils ont observé que l'HA réduisait de façon importante la production d'IL-2 dans des cultures de cellules mononucléaires sanguines périphériques bovines stimulées par la PHA. D'autre part, en présence de l'indométhacine, qui est un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, l'effet immunosuppresseur de l'HA sur la prolifération des cellules mononucléaires disparaît. On observe également une augmentation de la concentration en prostaglandines PGE2 synthétisées par les macrophages au sein de cultures de cellules mononucléaires périphériques ou de monocytes incubés avec de l'HA.

Il apparaît d'après ces résultats que l'HA entraîne une diminution de la production d'IL-2 à travers une voie prostaglandine-dépendante. Cette action visant à diminuer la quantité d'IL-2 produite se répercute notamment sur la prolifération des lymphocytes T et des lymphocytes B portant un récepteur à IL-2 où l'IL-2 intervient de manière conséquente.

Lors de ces expériences, ils ont aussi constaté que l'HA inhibait la prolifération des cellules mononucléaires périphériques sanguines induite par la PHA et que cette inhibition était meilleure lorsqu'on préincubait les cellules avec l'HA avant l'activation par le mitogène. Cela suggère que l'HA peut affecter l'engagement du lymphocyte dans le phénomène de blastogenèse pendant les stades précoces de son activation.

1.4. Rôle immunosuppresseur de l'ammoniac

Guerrini, (1997) a montré que les larves de *Lucilia cuprina* excrètent du bicarbonate d'ammonium (HCO_3^- , NH_4^+) qui est immunosuppresseur. Sur douze moutons infestés, il a observé une augmentation de la concentration en ammoniac jugulaire (NH_3) de 3.5 à 5.6 fois au-dessus des concentrations initiales avant infestation. Cette augmentation est corrélée avec une augmentation du nombre de larves, une augmentation de la surface d'infestation, une mort précoce, une neutropénie, une éosinopénie et une lymphocytopenie. On constate également une très forte diminution des globulines séreuses et une très forte augmentation des neutrophiles toxiques.

La neutropénie et l'éosinopénie peuvent s'expliquer de la façon suivante : les surrénales ovines sont intensément activées par des augmentations très légères en ammoniac (Visek, 1984). Dans le cas d'une infestation aux larves de *Lucilia cuprina*, l'augmentation en ammoniac est très importante comme nous venons juste de le souligner. Par conséquent l'activation des surrénales sera exacerbée. Cette activation est en fait une réponse physiologique et a pour conséquence une augmentation de synthèse du cortisol qui est responsable d'une neutrophilie mature transitoire et d'une éosinopénie.

De plus, l'apparence des neutrophiles toxiques montre que l'ammoniac agit directement et de façon dommageable sur les cellules blanches ovines.

Il serait donc souhaitable de neutraliser l'ammoniac excrété par les larves dans l'optique d'une immunisation efficace contre *Lucilia cuprina*.

1.5. Bilan

Les larves sont toutes capables d'inhiber la réponse immunitaire de l'hôte et donc de promouvoir leur développement. Cette inhibition est aussi bien dirigée contre la réponse immunitaire non spécifique (c'est le cas des larves d'*Hypoderma lineatum* qui clivent la protéine C3 du complément et ont donc une activité anti-inflammatoire), que contre la réponse immunitaire spécifique qui fait intervenir les anticorps ou immunoglobulines et les lymphocytes notamment. Dans ce dernier cas, chaque espèce de larve est notamment capable de cliver les IgG et d'inhiber la prolifération lymphocytaire. Il faut remarquer que seule l'hypodermine A et l'hypodermine B ont une capacité anti-inflammatoire. L'hypodermine C n'a aucune activité immunomodulatrice du fait, en partie, de son activité collagénolytique.

Les différentes stratégies employées par chacune des larves pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte sont résumées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Propriétés immunomodulatrices des PES larvaires

Espèce considérée	Produits larvaires excrétés	Mode d'action	Conséquence pour le système immunitaire
<i>Oestrus ovis</i>	Protéases à activité trypsique et chymotrypsique	Clivage d'IgG et IgA	Perte des fonctions effectrices (ADCC, opsonisation)
		Clivage des marqueurs de surface cellulaire des lymphocytes	Inhibition de la prolifération des lymphocytes
<i>Hypoderma lineatum</i>	HA et HB	Clivage de C3	Inhibition de la réponse inflammatoire
	HA	Clivage d' IgG	Perte des fonctions effectrices (ADCC, opsonisation)
		Diminution de la production d'IL-2	Inhibition de la prolifération des lymphocytes
		<i>In vitro</i> , altération de la blastogénèse des lymphocytes dans les stades précoces	
Clivage des antigènes de différenciation CD2, CD4, CD5 CD8, CD18			
<i>Lucilia cuprina</i>	Protéases à activité trypsique et chymotrypsique	Clivage d'IgG	Perte des fonctions effectrices (ADCC, Opsonisation)
		Clivage des antigènes du CMH II	Inhibition de la prolifération des lymphocytes
	Ammoniac sous forme non ionisé (NH ₃)	Activation des surrénales, sécrétion de cortisol Dégradation des cellules blanches	Réduction des neutrophiles, éosinophiles et lymphocytes matures, augmentation des neutrophiles toxiques

II.2. Nutrition des larves

2.1. Modalité de la digestion

2.1.1. Activité protéasique des PES sur les protéines disponibles

L'albumine plasmatique est la principale protéine dégradée par les protéases des PES des larves.

Tabouret, (1998) a mené des travaux sur l'activité protéasique des PES des larves d'*Oestrus ovis* sur l'albumine plasmatique d'origine bovine en la mettant en contact avec les PES puis en analysant les protéines obtenues par électrophorèse en SDS-PAGE. La solution d'albumine témoin présentait un profil électrophorétique avec une bande de 70 kDa très marquée. Après contact de 12 heures avec les PES de L1, elle était légèrement atténuée et a disparu totalement après 12 heures de contact avec les PES de L3. Ces résultats montrent que les larves clivent l'albumine et tout particulièrement les L3 qui accumulent les réserves énergétiques. Les PES exercent donc une activité protéasique sur des protéines plasmatiques telles que l'albumine, et probablement sur des protéines tissulaires.

Tabouret, (2001) a aussi montré *in vitro* l'activité collagénolytique des PES des larves d'*Oestrus ovis* sur le collagène de type I et le collagène de type IV. Ainsi ces derniers seraient capables de dégrader les constituants de la matrice extracellulaire (collagène de type I) et de la lame basale de l'épithélium (collagène de type IV).

Par ailleurs, l'abondance du mucus dans les cavités nasales représente également pour les larves d'*Oestrus ovis* une autre source alimentaire rapidement accessible et durable (Tabouret, 2001).

Pruett, (1993) a mis en évidence que l'HA pouvait aussi cliver *in vitro* l'albumine d'origine bovine bien qu'elle ne soit pas totalement dégradée. L'hémoglobine, la thyroglobuline et le fibrinogène tous d'origine bovine sont aussi dégradés par l'HA. Mais contrairement à l'albumine, leur dégradation est complète.

Les larves de *Lucilia cuprina* possèdent la même activité enzymatique. En effet, O'Meara *et al.*, (1992) ont observé la dégradation de l'albumine par les enzymes larvaires 12 heures après l'infestation. Des produits de dégradation du fibrinogène sont aussi visibles. Ces résultats sont complétés par Young *et al.*, (1996). Ils ont montré que dès que la larve L1 était en contact avec la peau, elle commençait à se nourrir et à extraire les nutriments de l'environnement pour

sécréter des molécules visant à augmenter la taille de la plaie et donc permettre la survie de la larve. La dégradation des composants majeurs de la zone cutanée comme l'albumine est observée 6 heures après l'éclosion.

Les protéases des PES larvaires sont donc capables de dégrader les protéines plasmatiques disponibles dans leur environnement immédiat ou bien des molécules telles que le collagène afin de débiter le processus de nutrition des larves.

2.1.2. Digestion extra-intestinale

Dans chacune des trois myiases larvaires étudiées, la digestion commence de manière extra-intestinale. Les protéases excrétées avec les PES dégradent les protéines plasmatiques disponibles comme l'albumine dans leur environnement immédiat, puis la digestion est achevée dans l'intestin larvaire.

Nous venons de voir que les protéases contenues dans les PES des larves d'*Oestrus ovis* étaient capables de dégrader l'albumine plasmatique en position extra-larvaire (Tabouret, 2001).

De même, Boulard, (1975) a montré que les larves L1 d'*Hypoderma lineatum* régurgitaient les enzymes digestives intestinales et salivaires sur les tissus conjonctifs environnants montrant bien que la digestion commence de manière extra-intestinale.

Casu *et al.*, (1994) ont mis en évidence l'importance des protéases à activités chymotrypsique et trypsique excrétées/sécrétées par les larves de *Lucilia cuprina* en mettant en présence *in vitro* ces dernières avec des inhibiteurs de sérine-protéases inhibant à la fois ces deux activités. Les résultats montrent que la croissance et le développement larvaires sont inhibés. Si on augmente de façon très importante la concentration de l'inhibiteur, on constate même une mortalité larvaire. Ces protéases appartenant aux PES ont donc un rôle prépondérant dans la nutrition et dans le processus digestif intestinal des larves. Elles permettent une digestion extra-intestinale des protéines plasmatiques qui une fois inhibée peut aller jusqu'à la mort de la larve.

Une particularité dans le processus digestif est propre à la larve L1 d' *Hypoderma lineatum*. Boulard, (1969) a montré que pendant leur migration, les larves L1 réingurgitent partiellement les enzymes et les tissus dégradés (principalement du tissu conjonctif) et les stockent dans leur intestin qui est cloisonné dans sa partie terminale et qui constitue ainsi un réservoir. Après 8 mois d'accumulation, les enzymes et les produits dégradés sont ensuite

excrétés pendant la première mue à travers une ouverture de l'intestin pendant le stade L2 jeune.

2.2. Maintien d'un apport constant en nutriments

Il est important pour les larves d'avoir un apport de nutriments régulier et en grande quantité pendant le déroulement du cycle larvaire. Cela se traduit par la mise en place de stratégie visant à obtenir des sources nutritives constantes et importantes

2.2.1. Rôle du monoxyde d'azote (NO) dans la nutrition des larves d'œstre.

a) Propriétés du NO

Il est sécrété par les macrophages en tant que produit toxique pour détruire des agents étrangers de grande taille tels que les parasites. Sa synthèse est catalysée par les NO synthétases, présentes sous forme inductible dans les macrophages. Le NO est toxique car il agit sur des enzymes clés du métabolisme du parasite : les molécules possédant un noyau fer-soufre (enzyme du cycle de Krebs), la chaîne mitochondriale de transport d'électrons ou encore la ribonucléotide réductase impliquée dans la synthèse d'ADN (Clarck et Rockett, 1996).

b) Mise en évidence de l'effet modulateur de la sécrétion de NO par les PES (Tabouret, 1998).

On a utilisé des macrophages ovins et des macrophages murins tumoraux (RAW) stimulés soit par des PES de L1, L2, L3, soit par des antigènes bruts de L1, L2, L3. La production de NO est suivie par les teneurs en nitrites qui la reflète. Ces derniers sont mesurés par la méthode de Griess.

La nature des fractions actives sur la sécrétion de NO, la concentration minimale active (CMA), l'exploration de la voie d'activation et l'effet potentialisateur de l'interféron gamma (INF γ) sont également recherchés. L'INF γ est une cytokine qui active les mécanismes effecteurs du macrophage, et en particulier, la sécrétion de NO. Cet effet stimulateur est fortement augmenté quand les antigènes bactériens (LPS) sont associés à l'INF γ . L'étude a donc eu pour but de voir si l'association antigène E/S d'*Oestrus ovis* et INF γ avait les mêmes effets inducteurs de NO sur le macrophage.

Le dosage des nitrites a montré que les PES d'*Oestrus ovis* ont un effet inducteur de la production de NO par le macrophage murin de la lignée RAW, l'antigène brut de L1 semble au contraire l'inhiber. L'effet sur les macrophages ovins est semblable à celui obtenu sur les macrophages murins : la production de nitrite est augmentée particulièrement avec les PES de L1. L'effet des PES de larves d'*Oestrus ovis* sur la sécrétion de NO par le macrophage se vérifie sur un matériel cellulaire d'origine ovine.

Si on stimule les macrophages avec des PES mis en contact avec de la trypsine, on constate une diminution de la production de NO. La diminution s'accroît quand on augmente la concentration de trypsine. De même, la chaleur entraîne une diminution de la concentration en nitrites et donc une perte d'activité des PES. La fraction des PES responsable de la modulation de la sécrétion de NO est donc très certainement de nature protéique.

La concentration minimale active trouvée est inférieure à 1µg/ml de PES de L1 (qui sont les plus actifs). De plus, il a été constaté que la stimulation engendrée par les PES n'est pas proportionnelle à leur concentration. On a également observé que l'induction de la sécrétion de NO par les PES se faisait vraisemblablement par l'activation de la NO synthase inductible qui catalyse l'hydroxylation de la L-arginine permettant l'obtention du NO. Le mode d'action de l'activation de la NO synthase n'a pas été évoqué.

De plus l'effet potentialisateur de l'INF γ par les PES est supérieur à celui des LPS. L'analyse par électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices des PES stimulant la production de NO a révélé 5 bandes de protéines majeures, communes aux trois stades larvaires : une voisine de 81 kDa, deux moins marquées d'environ 60 kDa et deux très marquées pour les stades L2 et L3 de 35 et 25 kDa.

c) Conséquences pour la nutrition larvaire

La stimulation de la sécrétion de NO par les PES des trois stades larvaires est un phénomène surprenant et difficilement explicable dans l'état actuel des connaissances, puisque le NO est un gaz toxique favorisant l'élimination des parasites. L'hypothèse serait que la stimulation de la sécrétion de NO joue un rôle dans la nutrition larvaire. En effet, le NO est un médiateur physiologique de l'inflammation actif sur les cellules et les tissus de l'hôte. Le NO peut altérer les fonctions physiologiques du tissu inflammé. Il provoque ainsi un relâchement des muscles lisses des vaisseaux sanguins entraînant une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Ce phénomène facilite la fuite hors du compartiment sanguin de protéines plasmatiques, dont les larves d'*Oestrus ovis* se nourrissent. Ainsi, l'induction de la

sécrétion de NO permet l'entretien d'une réaction inflammatoire qui assure aux larves un apport constant en protéines plasmatiques (Tabouret, 1998).

2.2.2. Rôle de la formation de l'exsudat pour les larves de *Lucilia cuprina*

a) Formation de l'exsudat

Bowles *et al.*, (1988) ont mis en évidence au sein des PES des larves de *Lucilia cuprina* une enzyme capable de dégrader les fibrilles de collagène de type 1 de moutons. Les activités conjuguées de la collagénase et des protéases permettent la digestion de composants cutanés contribuant ainsi à la formation de lésions et à la production d'un exsudat.

L'exsudat est une exfoliation de l'épiderme qui amène à l'exposition du derme. Le premier signe clinique associé à la myiase est la fuite de quantité importante d'exsudats sur la peau et sur la laine (Sandeman *et al.*, 1987).

Sandeman *et al.*, (1995) ont montré que cette fuite des protéines plasmatiques au sein de l'exsudat commençait six heures après l'infestation et était bien établie au bout de douze heures. Durant cette période, l'exsudat résulte de l'action de médiateurs de l'inflammation causant la transsudation des capillaires cutanés et des activités enzymatiques des PES comme décrit ci-dessus. Dans les douze heures suivantes, les fuites exsudatives ne cessent d'augmenter en relation avec les besoins croissants des larves. La formation de l'exsudat vingt-quatre heures après le début de l'infestation est le résultat de microhémorragies.

b) L'exsudat : une source de protéines

O'Meara *et al.*, (1992) ont constaté que la réponse inflammatoire était plus importante dans les étapes précoces de l'infection quand les dommages physiques étaient peu importants. L'analyse de l'exsudat a montré qu'il contenait une grande quantité d'albumine séreuse, d'immunoglobulines, de fibrinogène et d'autres protéines séreuses. Il constitue donc une source principale de nutriments pour la larve de *Lucilia cuprina* riche en protéines plasmatiques et de nature variée.

II.3. Facilitation de l'établissement larvaire

3.1. Chez *Oestrus ovis*

a) Activité mucolytique des PES

Tabouret, (2001) a incubé une mucine d'origine bovine avec les PES puis a analysé les résultats par SDS-PAGE. La mucine est dégradée partiellement par les PES en de petits fragments plus facilement ingérables par les larves. Cette dégradation de la mucine se traduit très certainement par une modification des propriétés physico-chimiques du gel de mucus recouvrant et protégeant l'épithélium. Chez l'animal infesté, l'hypersécrétion de mucus fait encourir aux larves, surtout aux L1, deux risques majeurs si elles sont piégées dans le mucus : elles risquent d'être expulsées prématurément dans l'écoulement muqueux et elles sont exposées à l'asphyxie par obstruction de leurs plaques stigmatiques par le mucus. Ceci expliquerait l'activité mucolytique permettant aux larves d'évoluer dans le mucus sans y rester piégées en dégradant la mucine, le composant majeur du mucus. C'est donc une activité qui facilite l'établissement larvaire.

b) Protection du NO contre les bactéries

Tabouret (1998) a étudié le rôle du NO sur la prolifération bactérienne au sein de la muqueuse nasale parasitée. Des contaminations bactériennes surviennent fréquemment à la surface des muqueuses nasales, or les larves vivant au contact de cette muqueuse s'y nourrissent et y muent. Nous avons vu précédemment que les PES des trois stades larvaires étaient capables de stimuler la production de NO. On peut donc envisager que la stimulation de la sécrétion de NO, qui est un gaz toxique, aide au contrôle de la prolifération bactérienne au sein de l'habitat du parasite et participe ainsi au maintien des larves dans les cavités nasales.

3.2. Rôle de LCTb chez *Lucilia cuprina*

Casu *et al.* (1994) ont montré que la séquence en acides α aminés de LCTb avait beaucoup de similarité avec celle des sérine-protéases dont l'hypodermine C à activité

collagénolytique d' *Hypoderma lineatum*. LCTb doit donc dégrader le collagène et ainsi faciliter l'établissement de la larve de *Lucilia cuprina* dans les tissus cutanés du mouton.

Casu *et al.* (1996) ont mis en évidence que cette protéase digère les protéines des tissus de la peau où les nutriments se trouvent, et permet ainsi à la tête des larves de pénétrer dans le derme. Nous avons vu dans la première partie que cette enzyme n'était pas retrouvée dans les stades pupes et adulte. Cela est en accord avec le fait que LCTb soit impliquée dans l'établissement larvaire de la myiase. Quant au stade adulte, les besoins en protéases diminuent car le régime alimentaire évolue et la part de « grosses protéines » à digérer diminue. Par contre, elle est présente dans le stade oeuf pour être disponible dès l'éclosion en vue de faciliter l'établissement larvaire et d'apporter les nutriments à la nouvelle larve le plus rapidement possible.

II.4. Migration larvaire

4.1. Chez Hypoderma lineatum

Boulard (1975) a étudié les éléments lysés du tissu conjonctif suite à la migration de la larve L1 pendant 8 mois et la réaction inflammatoire causée par L1. Il a mis en évidence des processus de dégradation tissulaire engendrés par la présence d'enzymes à activité collagénolytique principalement (l'HC), qui concourent à faciliter la migration de la larve qui s'effectue à la vitesse de 1 à 2 cm par jour.

Boulard *et al.* (1978) montrent que la larve L1 après éclosion pénètre activement par l'épiderme et entreprend une migration de 8 mois dans le tissu conjonctif intermusculaire pour atteindre le tissu sous cutané dorsolombaire. Au cours de cette migration, la L1 sécrète et excrète des PES dont l'hypodermine C, qui, comme nous l'avons vu précédemment, a une activité collagénase. Ainsi cette dernière facilite la migration de la larve au travers des fibres de collagène en les lysant, et lui permet d'ingérer les fragments pour sa nutrition.

4.2. Chez Lucilia cuprina

Sandeman *et al.*, (1990) ont mis en évidence une activité collagénolytique. L'activité des PES avec le substrat SALNA montre une activité élastase au sein des PES. De même, l'activité des PES sur le substrat VALNA montre une activité plasmine dans les PES. Ces trois activités

conjuguées révèlent un rôle primaire des PES dans la dégradation cutanée. L'activité plasmine est aussi responsable d'une perte de l'adhésion cellulaire épidermique. L'ensemble de ces activités concoure à la formation des plaies myiasiques qui favorisent la migration larvaire dans le derme.

II.5. Les lésions induites

5.1. Chez *Oestrus ovis*

a) Description des lésions

Les remaniements histologiques et les altérations de la muqueuse, consécutives à l'infestation, ont été appréciés sur coupes colorées à l'hémalun-éosine. Les prélèvements de muqueuse septale et sinusale, conservés dans l'osmium, ont été examinés en microscopie électronique à transmission. Les résultats montrent que c'est au niveau de la muqueuse sinusale que les modifications et les altérations histologiques sont les plus importantes. L'épithélium sain est cylindrique, cilié et pseudo-stratifié (Tabouret, 2001). Après infestation, ce dernier présentait une hyperplasie marquée (constatée macroscopiquement à l'abattage) ainsi qu'une métaplasie (dédifférenciation puis redifférenciation en épithélium de type Malpighien) modérée. Ces observations ont été confirmées par le grand nombre de cellules épithéliales marquées par l'anticorps anti-KI67, marqueur de prolifération. Une forte abrasion du film muco-ciliaire a été observée. En outre, le nombre de cellules caliciformes est réduit chez les animaux infestés. La *lamina propria* présentait de nombreuses irrégularités et par endroit un affaissement. Au niveau du chorion, un oedème diffus a été observé. Une diapédèse trans-épithéliale de polynucléaires éosinophiles marquée a été constatée chez les animaux infestés. Les observations en microscopie électronique ont montré au niveau de l'épithélium de la muqueuse sinusale, une disjonction des cellules épithéliales, avec perte des jonctions serrées. La lame basale n'était plus observable et le nombre de cils réduit. Au niveau du septum, les cellules épithéliales étaient granuleuses, présentant des images suggérant une souffrance cellulaire importante (Tabouret, 2001).

b) Facteurs lésionnels

Comme la majorité des remaniements histologiques et des lésions ont été observés au niveau de la muqueuse sinusale, on peut faire l'hypothèse que les larves L3 sont les larves les plus pathogènes. En effet, la muqueuse sinusale est le lieu de localisation des L3. De plus ces observations peuvent traduire une relation entre la taille des lésions et la quantité de nutriments nécessaires au stade L3. L'étude en microscopie électronique semble montrer que les altérations de la muqueuse, notamment la rupture de la barrière épithéliale, soit le fait des protéases précédemment identifiées. Ces observations supportent le fait que les PES diffusent largement dans la muqueuse et ainsi entrent en contact avec les cellules immunitaires recrutées localement. Cependant, il est difficile d'attribuer la totalité de ces modifications et de ces altérations de la muqueuse à la seule présence des larves. Les modifications histologiques constatées peuvent aussi provenir de la libération de médiateurs pro-inflammatoires produits par les macrophages et les lymphocytes activés par les PES. Le NO est un médiateur pro-inflammatoire possédant à forte concentration un effet toxique pour les tissus environnants, ce qui pourrait expliquer partiellement les altérations constatées sur la muqueuse sinusale (Laskin *et al.*, 1994).

Le TNF α , dont le gène est induit par les PES, peut être lui aussi impliqué dans les altérations observées : en effet il augmente la perméabilité vasculaire, provoque de l'œdème et favorise l'infiltration cellulaire dans les tissus (Cavaillon, 1996).

Les lésions induites sur la muqueuse respiratoire notamment au niveau sinusal apparaissent comme être d'une part la conséquence de l'activité des protéases contenues dans les PES et d'autre part comme être la résultante de la réponse inflammatoire consécutive à l'infestation parasitaire.

5.2. Chez *Hypoderma lineatum*

a) Description des lésions

Boulard, (1975) a étudié les éléments lysés du tissu conjonctif suite à la migration de la larve L1 pendant 8 mois et la réaction inflammatoire causée par L1. L'examen histologique des tissus parasités montre une très forte réaction inflammatoire ainsi qu'une importante modification structurale. A partir de la larve on peut définir trois zones : une zone pré-larvaire en avant de la larve, une zone péri-larvaire autour de la larve et une zone post-larvaire à

l'arrière de la larve. Ces trois zones sont concentriques et correspondent aux trois étapes de désagrégation des structures tissulaires larvaires.

Dans la zone pré-larvaire, on est au premier stade d'une réaction inflammatoire. Il n'y a pas de lyse cellulaire ou tissulaire. On constate une vasodilatation importante et une forte infiltration leucocytaire. Ceci correspond à un phénomène vasculaire sanguin. La structure fibrillaire (élastine et collagène), la substance fondamentale et les fibroblastes ont les mêmes affinités tinctoriales que les tissus sains.

Dans la zone péri-larvaire on peut distinguer trois couches. La couche A est la plus externe : aucun élément n'est lysé mais les tissus œdémateux perdent leurs caractéristiques structurales fondamentales. Les fibres de collagène sont distendues et dissociées et ne sont plus disposées en faisceaux compacts. Les tissus sont envahis de monocytes, neutrophiles, éosinophiles.

La couche B subit une dégradation de toutes les structures fibreuses et une modification des affinités tinctoriales de la substance fondamentale. En périphérie, les fibres de collagène se distendent, se clivent, perdent de leur densité et finissent par se séparer en fibrilles. Les filaments sont orientés dans le sens de déplacement de progression de la larve. Les fibres élastiques sont également plus courtes, plus épaisses et se clivent pour devenir plus contournées. La structure des parois vasculaires se modifie aussi.

La couche C est la plus interne. C'est l'étape ultime de dégradation des éléments tissulaires précédents. La régression des fragments de collagène amène à une forme filamenteuse. C'est une matrice amorphe qui prend la place. On peut remarquer également une altération très marquée des fibres élastiques.

Dans la zone post-larvaire, on voit la même destruction cellulaire à part que le phénomène de cicatrisation a commencé. Il reste une matrice amorphe avec quelques macrophages et quelques cellules géantes. Là où il y a une prolifération de fibroblastes, il y a un processus de cicatrisation avec la formation de nouveaux vaisseaux entourés de collagène.

Pancera *et al.*, (1993) ont confirmé les observations ci-dessus. Ils ont constaté que les larves L1 migrantes sont la cause de lésions inflammatoires dans les tissus conjonctifs du médiastinum, de la plèvre viscérale et pariétale, du péritoine, du diaphragme et des poumons. Les lésions sont caractérisées par des foyers d'œdèmes gélatineux verdâtres et jaunâtres. Microscopiquement, les tissus œdématisés sont infiltrés par des éosinophiles. Les lésions sont reconnues pendant une période de plusieurs semaines qui correspond au rythme du cycle biologique de la larve.

b) Facteurs lésionnels

Ces destructurations progressives ne peuvent pas être dues aux appareils buccaux de la larve et par conséquent, ils résultent aussi de l'intervention d'enzymes contenues dans les PES larvaires. Ceci est surtout visible pour le collagène qui passe d'un état structuré et polymérisé à un état dégradé et amorphe suggérant même l'intervention de plusieurs enzymes. Notamment dans la couche B de la zone péri-larvaire, où les modifications des fibrilles de collagène tant en longueur qu'en diamètre et la désintégration totale dans la substance amorphe environnante sont probablement dues à l'action conjointe de collagénase et de peptidase.

Il a été remarqué aussi que la présence de la larve inhibait en partie la formation de fibrine dans ce foyer inflammatoire. Le réseau de fibrine sert de support aux fibroblastes venant sécréter les nouveaux éléments qui reconstitueront le tissu.

Le rôle détersif des enzymes larvaires est tel qu'il ne persiste, sur le passage de la larve, aucune trace de corps d'origine larvaire ou tissulaire susceptible de créer un foyer inflammatoire chronique. Le passage de la larve à travers les tissus de l'hôte favorise une régénération rapide des tissus sur un terrain libéré de tout débris tissulaire.

5.3. Chez *Lucilia cuprina*

a) Description des lésions

Sandeman *et al.*, (1987) ont observé sous un microscope électronique à balayage l'évolution des lésions cutanées d'un mouton soumis à une infestation larvaire de *Lucilia cuprina*. L'inflammation correspond à un gonflement de la peau principalement autour des follicules laineux qui deviennent plus profonds et plus larges. On note également un changement de la structure cutanée avec une perte graduelle de débris cutanés et une augmentation de la kératinisation des cellules épithéliales squameuses de la laine adjacentes à la peau.

Sur la surface cutanée propre, les dommages sont vus 8 heures après l'implantation larvaire. Jusqu'aux premières 24 heures, ces altérations concernent surtout la couche épidermique superficielle tandis que la membrane basale est intacte avec quelques interruptions. Après 24 heures, des surfaces importantes de cellules épidermiques sont

manquantes, la membrane basale est atteinte, on voit le derme. L'architecture normale de la peau est détruite.

A 48 heures post-infestation, l'épiderme et la membrane basale sont complètement détruits engendrant l'exposition du derme. Ce dernier subit alors des dégradations : on constate que des surfaces dermiques sont manquantes. De plus beaucoup de follicules laineux sont agrandis.

Après 72 heures, la larve a pénétré profondément dans le derme. On peut observer un gonflement très important du tissu dermique et la présence d'importantes cavités.

Des surfaces de fibres laineuses ont disparu 48 heures après la rupture de l'architecture normale de la peau. Au fort grossissement le réseau dermique de collagène est visible et on peut voir une rupture mécanique à quelques endroits.

b) Facteurs lésionnels

Sandeman *et al.*, (1987) observent que les larves L1 ne possèdent pas de crochets buccaux mais ont des rangées d'épines dans la cavité buccale qui abrasent les couches cellulaires les plus externes de la peau. Les larves L2 et L3 possèdent elles des crochets buccaux très importants qui permettent de dégrader la surface de la peau et des enzymes protéolytiques capables de dégrader les protéines cutanées.

Les dommages observés entre 8 heures et 24 heures sont causés par les larves L1. C'est ce stade qui est le plus représenté. Ainsi les lésions constatées sont dues aux rangées d'épines buccales des larves L1 mais aussi à l'action des protéases contenues dans les PES larvaires notamment la collagénase qui engendre les ruptures mécaniques observées.

Les dégâts cutanés plus importants subis par la suite sont l'œuvre des larves L2 et L3. Ces dernières possèdent de grosses mandibules qui permettent une rupture plus conséquente de l'intégrité cutanée et donc une meilleure pénétration des PES dans le derme notamment.

L'inflammation consécutive à la formation de l'exsudat dans la plaie doit également induire ces lésions mais il manque des références précises à ce sujet.

II.6. Bilan général

Les protéases sont les composés majoritaires des PES. Elles interviennent de façon prépondérante sur le développement larvaire. Elles permettent un apport constant en nutriments aux larves par le développement d'une réponse immunitaire principalement de type inflammatoire chez l'hôte parasité. Chez *Oestrus ovis*, les PES entraînent la sécrétion de NO qui est un médiateur de l'inflammation. Une deuxième source de protéines est également disponible pour les larves d'œstres : le mucus des cavités nasales. Chez *Lucilia cuprina*, ce sont les collagénases qui permettent la formation d'un exsudat qui constitue la source de protéines.

Ces protéases permettent de digérer les protéines nécessaires à la croissance larvaire. Dans chacune des trois myiases, l'albumine est dégradée ainsi que le collagène.

Elles facilitent l'établissement larvaire : chez *Oestrus ovis*, elles dégradent le mucus et protègent donc les larves d'une asphyxie voire d'une expulsion hors des cavités. En ce qui concerne *Lucilia cuprina*, la dégradation du collagène par la protéase LCTb permet aux larves d'accéder aux dermes.

Les protéases sont responsables de la migration larvaire. Ce rôle est assuré dans le cycle d'*Hypoderma lineatum* par l'HC qui dégrade le collagène et permet ainsi la migration de L1. Cette activité collagénolytique se retrouve également avec les protéases excrétées/sécrétées par les larves de *Lucilia cuprina*.

Enfin les protéases ont un rôle immunomodulateur. En effet, la réponse immunitaire permet aux larves de se nourrir mais représente également un danger auxquelles elles doivent faire face. Ainsi les protéases assurent un rôle de protection vis à vis du système immunitaire de l'hôte. Toutes les protéases des trois myiases considérées sont capables de cliver les IgG. On retrouve également dans toutes ces myiases une action sur les molécules membranaires des cellules immunitaires. De plus, les protéases d'*Hypoderma lineatum* sont capables de cliver la protéine C3 du complément et donc d'avoir un effet anti-inflammatoire. Elles entraînent aussi une baisse de la production d'IL-2. Les larves de *Lucilia cuprina* excrètent de l'ammoniac qui est lui aussi immunosuppresseur, ce qui est spécifique à cette myiase.

Le schéma de la figure 8 résume les différents rôles des PES et plus particulièrement ceux des protéases au sein du développement larvaire.

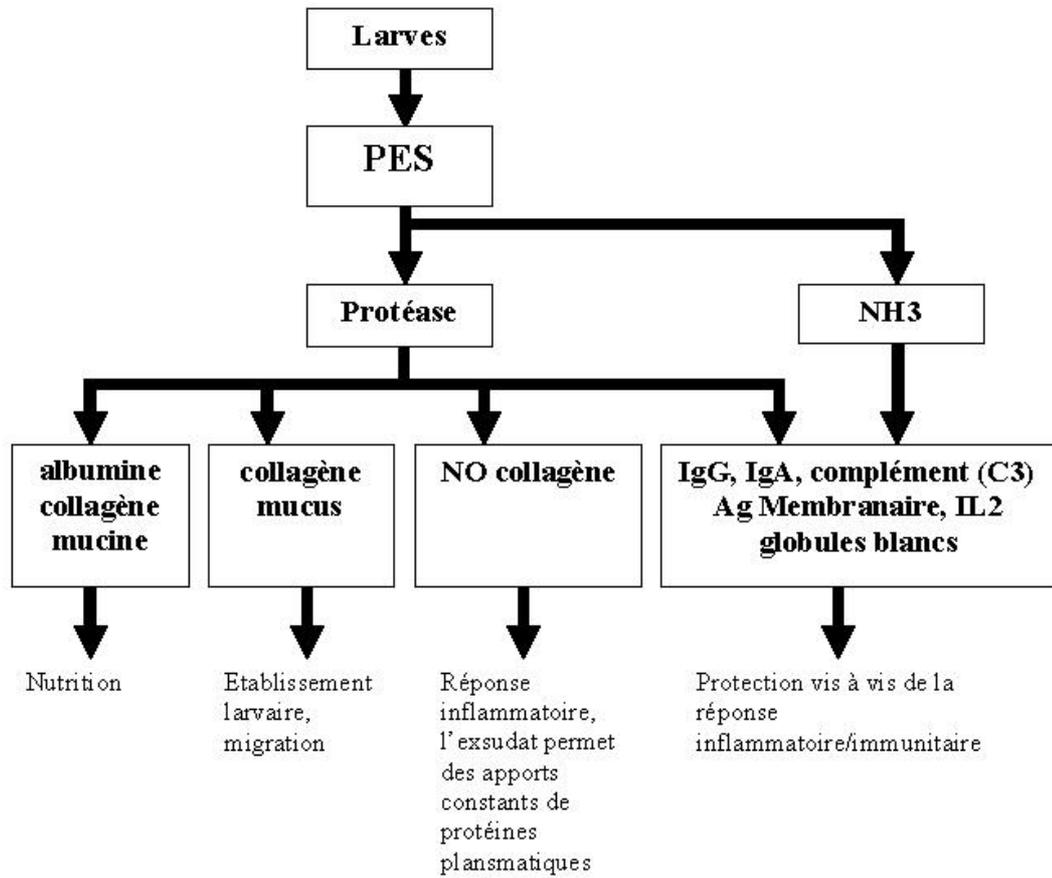


Figure 8 : Bilan : Rôles des PES dans le développement larvaire.

III. PES et perspectives vaccinales

La caractérisation des PES des différentes larves et leur implication majeure au sein du développement larvaire conduit à tester leur efficacité en tant que vaccins. Ces perspectives vaccinales sont basées sur le développement d'une immunité naturelle chez l'hôte infesté.

III.1. Développement d'une immunité naturelle

La vaccination contre les Diptères vecteurs de myiase peut être une alternative intéressante. *In vivo* et *in vitro*, plusieurs arguments indiquent qu'un contrôle immunologique des populations larvaires est envisageable.

a) Chez *Oestrus ovis*

Des études épidémiologiques ont montré que les intensités des infestations sont moins importantes chez les brebis que chez les agneaux dans les conditions naturelles (Yilma, 1992) : cela semble indiquer la présence d'un phénomène immunitaire de contrôle des populations larvaires qui s'installe avec les réinfestations.

Les travaux de Yilma et Dorchies (1993) montrent que le taux d'installation des L1 après inoculation expérimentale à des agneaux « neufs » est de 28% après infestation unique : cela suggère qu'il existe un mécanisme qui élimine une partie de la population larvaire implantée. De plus lorsque les infestations sont répétitives, le pourcentage d'installation chute à 10% en moyenne ce qui montre bien que les infestations répétées stimulent un mécanisme effecteur de l'immunité capable d'éliminer les L1.

Marchenko et Marchenko, (1989) ont démontré qu'un traitement immunosuppresseur favorisait l'installation des larves et leur survie, preuve supplémentaire qu'il existe bien une composante immunologique dans le contrôle des populations larvaires.

b) Chez *Hypoderma lineatum*

Le développement d'une immunité en réponse à l'infestation d'*Hypoderma lineatum* a été envisagée par le développement d'une résistance observée sur les bovins ayant subi des infestations préalables. Gingrich, (1980) a mis en évidence l'acquisition de cette résistance contre *Hypoderma lineatum*. Cette résistance est innée chez les jeunes bovins, puis elle diminue avec l'âge au profit d'une résistance acquise. Des travaux réalisés par Pruett et Kunz, (1996) ont montré que la résistance à *Hypoderma lineatum* était acquise chez les bovins après au moins trois infestations.

L'immunité acquise a été étudiée pour déterminer l'influence des deux types de réaction immunitaire sur la résistance des bovins. Gingrich, (1982) a comparé la réponse cellulaire et humorale sur des bovins non infestés et des bovins antérieurement infestés après une seule exposition expérimentale. Il a trouvé aucune corrélation entre le développement des anticorps humoraux et la résistance du bovin. En revanche, le bovin le plus résistant avait l'activité macrophagique la plus élevée. Les résultats montrent que la résistance acquise à l'hypodermose repose plus sur une immunité à médiation cellulaire que sur une immunité à médiation humorale.

Baron et Weintraub, (1987) ont poursuivi ces travaux. Ils ont exposé des bovins à trois infestations consécutives, dans le but d'étudier le rôle de la réponse à médiation cellulaire dans le développement de la résistance à *Hypoderma lineatum*. Ils ont observé une réduction significative de la population larvaire sur ces bovins qui ont d'autre part « produit » significativement moins de larves de varron par rapport aux animaux exposés pour la première fois. De plus, les bovins résistants réagissent mieux à l'action des mitogènes lors des réinfestations ce qui montre une capacité fonctionnelle accrue de leur système immunitaire. Ces résultats montrent que la résistance acquise à l'hypodermose repose sur une base cellulaire mettant en jeu la participation à la fois des cellules B et des cellules T.

Chabaudie *et al.*, (1991) ont également confirmé ces résultats. Ils ont montré que les anticorps anti-L1 d'*Hypoderma lineatum* d'origine humorale conféraient peu de protection aux bovins. Ainsi l'immunité humorale a un rôle très mineur à jouer dans l'acquisition de la résistance après les réinfestations à *Hypoderma lineatum* au contraire de l'immunité à médiation cellulaire.

De même Fischer *et al.*, (1991) ont montré qu'en infestant des bovins avec l'HA ou l'HA dénaturée par SDS, une réponse en lymphocyte spécifique de HA s'était développée.

Ainsi, les résistances acquises sur les bovins subissant plusieurs infestations laissent transparaître le développement d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire, pour faire face à l'infestation des larves.

c) Chez *Lucilia cuprina*

Comme pour *Hypoderma lineatum* et *Oestrus ovis*, les moutons infestés par les larves de *Lucilia cuprina* sont capables de développer une résistance. En effet, Sandeman *et al.*, (1985) ont montré que les moutons pouvaient devenir réfractaires à l'installation larvaire après des infestations répétées. Cette résistance est donc un phénomène inductible qui nécessite au minimum 4 infestations (Sandeman *et al.*, 1986). Ces travaux ont été confirmés par Eiseman *et al.*, (1990) qui ont obtenu des moutons résistants au bout de 7 à 8 infestations. En outre, ces moutons développent aussi une meilleure sensibilité aux larves et à leurs produits. Cette réponse résulte de l'apparition d'un exsudat séreux qui permet l'accès de facteurs d'inhibition au site d'infection à un moment précoce, lorsque L1 et L2 sont présentes et présumées vulnérables (Sandeman *et al.*, 1986).

Cette observation est en accord avec les travaux d'O'Donnell *et al.*, (1981), qui ont constaté *in vitro* qu'un mélange de sérum provenant de moutons immunisés réduisait significativement la survie des larves, ce qui souligne l'importance d'une immunité humorale dans l'acquisition d'une résistance à l'égard du parasite.

De plus, l'expérience réalisée par Sandeman *et al.*, (1992) étaye les informations sur la résistance. Les moutons infestés répétitivement à 2 semaines d'intervalle avec 500 L1 développent une résistance partielle aux injections après 5 infestations. Mais cette résistance ne dure pas plus de 3 infestations. Ils ont ainsi mis en évidence que la résistance à *Lucilia cuprina* peut se développer après des infestations répétées mais qu'elle est de courte durée et qu'elle nécessite une exposition larvaire fréquente. Dans une étude plus récente, Tellam et Bowles, (1997) ont observé qu'une très faible résistance acquise à *Lucilia cuprina* se développait chez le mouton après des infestations répétées de larves. Ce phénomène témoigne de la mise en place d'une réponse immunitaire mais n'est pas suffisant pour assurer la protection des moutons contre la myiase.

La réponse immunitaire des moutons contre les antigènes des larves fait intervenir des anticorps IgG. O'Donnell *et al.*, (1980) ont démontré leur présence dans les sérums de moutons infestés. Cette intervention des anticorps dans la réponse immunitaire des moutons est soutenue par les travaux réalisés par Eiseman *et al.*, (1990) qui ont montré que les anticorps jouaient un

rôle dans la résistance des moutons aux larves. De même Skelly et Howells, (1987) ont mis en évidence que des moutons infestés expérimentalement avec des produits larvaires produisaient des anticorps contre un large éventail de composants de L1, L2 et L3. Cette forte réponse humorale est induite par les PES des larves de *Lucilia cuprina* provenant surtout des glandes salivaires. Sandeman *et al.*, (1990) ont montré que les concentrations en anticorps dirigés contre des extraits larvaires solubles mesurés par la méthode ELISA, étaient significativement plus élevées dans les sérums de moutons infestés que dans les sérums de contrôle. Ces résultats sont compatibles avec la production par les moutons d'anticorps anti-larve spécifiques en réponse à l'infestation.

Bowles *et al.*, (1992) ont infecté des moutons avec 200 larves L1 puis réalisé 48 heures après l'implantation larvaire, une biopsie cutanée sur les plaies et sur les moutons de contrôle. Ils ont observé une réponse immunitaire cellulaire mettant en jeu notamment des neutrophiles (qui sont les cellules majoritaires à la surface de la peau). Dans le derme, il y a une augmentation significative des LT helper CD4+, des cellules $\gamma\delta$ -TCR+ et des LT19+ (CD4⁻, CD8⁻) sur les moutons infestés par rapport aux moutons de contrôle.

L'immunité développée par les moutons en réponse aux infestations des larves de *Lucilia cuprina* est à la fois une immunité à médiation humorale et une immunité à médiation cellulaire.

III.2. Les intérêts d'un vaccin

Ils sont multiples. A la différence des insecticides, la mise au point d'une stratégie vaccinale n'induit pas de résidus chimiques dans l'environnement. Elle peut aussi être considérée comme un moyen de contrôle à long terme et donc s'avérer plus économique, et diminuer les résistances aux insecticides. Le contrôle vaccinal peut se faire à deux niveaux : il peut permettre de contrôler l'installation des larves en diminuant les intensités d'infestation, mais aussi la croissance des larves. Dans le cas d'*Oestrus ovis*, le poids de la larve L3 qui débute la pupaison est déterminant pour la survie et l'activité du futur adulte. Cepeda-Palacios *et al.*, (2000) ont déterminé qu'il existait un poids critique (de 0,28 g obtenu pour une mouche de 8,6 mm de long) de la larve L3 expulsée pour lequel la viabilité de la mouche est compromise. En tenant compte de données sur 383 L3, ils ont estimé les effets possibles d'une diminution du poids des larves expulsées sur la taille de la population adulte. Une réduction importante de la taille de la population (38%) pourrait être obtenue en diminuant le poids larvaire de 40%.

III.3. Les tentatives de vaccination

3.1. Immunogénicité des PES larvaires

L'immunogénicité d'un antigène est son aptitude à entraîner une réponse immunitaire avec des anticorps spécifiques (Bach et Lesavre, 1991). Les vaccins utilisés dans la plupart des cas contenaient un ou des antigènes très immunogènes qu'il a fallu identifier.

a) Chez *Oestrus ovis*

De récents travaux ont été réalisés par Innocenti *et al.*, (1995) qui ont soumis les tissus des stades larvaires à une électrophorèse en conditions réductrices et non réductrices. Les polypeptides obtenus sont testés par immunoblotting avec du sérum de moutons infestés. Les protéines issues des glandes salivaires se sont révélées être les plus immunogènes et ont été identifiées par la suite comme des PES larvaires. On peut donc en conclure que les glandes salivaires sont un tissu sécréteur qui peut fournir des antigènes protéiques pour le système immunitaire de l'hôte.

Tabouret, (2001) a complété ces résultats en étudiant par Western Blot la réactivité des sérums d'agneaux immunisés infestés expérimentalement vis à vis des PES, des protéines digestives et salivaires. Dans les protéines des PES, seul un complexe protéique avoisinant 28 kDa a été spécifiquement et systématiquement reconnu par les anticorps sériques (IgG) quelque soit l'animal. Aucune protéine du tube digestif des larves n'a été reconnue. Par contre, les protéines salivaires l'ont été et particulièrement un groupe de 28 kDa. Les autres protéines salivaires ont été reconnues alternativement par quelques animaux. Ces deux expériences laissent penser que l'Ag de 28 kDa contenu dans les glandes salivaires est très immunogène et pourrait donc être employé dans un but vaccinal. Il reste cependant à l'identifier de façon précise pour le séquencer et déterminer sa fonction.

On a également constaté que les larves L2 et plus particulièrement les larves L3 sont les stades larvaires les plus immunogènes. Cette observation doit être corrélée à la capacité de ces stades à libérer sur la muqueuse des quantités importantes d'antigènes de PES. Ceci est confirmé par les travaux de Frugère *et al.*, (2000) qui ont montré par une cinétique d'apparition des anticorps des animaux vaccinés avec des PES de L3 d'*Oestrus ovis*, le développement d'une forte réponse en IgG par rapport aux animaux témoins, attestant ainsi de l'immunogénicité des PES de L3.

Kumar, (1993) a montré quant à lui, que les protéases étaient faiblement immunogènes. Donc ce ne sont pas *a priori* des antigènes de choix pour la vaccination.

On peut donc dire que pour la vaccination contre *Oestrus ovis*, l'antigène de 28 kDa serait le plus efficace. Mais il manque des références sur les antigènes contenus dans la membrane péritrophique des larves.

b) Chez *Hypoderma lineatum*

L'immunogénicité et l'antigénicité des PES des larves d'*Hypoderma lineatum* ont été étudiées par Pruett *et al.*, (1988). Elles ont été testées sur des protéines provenant des extraits bruts de L1 par Western-blotting en utilisant du sérum de bovins infestés ou vaccinés. Les résultats montrent que toutes les protéines de L1 sont antigéniques sur l'hôte bovin infesté. C'est l'HA et l'HC qui apparaissent comme les protéines larvaires les plus immunogènes. Dans le sérum et bien que HA et HC présentent de nombreuses similarités au niveau de leur composition en acides α aminés, il n'y a pas de réaction croisée entre ces deux protéases et donc pas d'épitope antigénique commun. Ces résultats constituent une exception aux travaux de Kumar, (1993) dans lesquels les protéases sont faiblement immunogènes.

Par conséquent, les vaccins développés pour lutter contre l'hypodermose bovine ont incorporé les protéases des PES et plus particulièrement l'HA.

c) Chez *Lucilia cuprina*

Skelly et Howells, (1987) ont constaté que les extraits de glandes salivaires de L3 avaient une activité immunogène très importante même en conditions dénaturantes par SDS-PAGE. Ce sont eux qui ont entraîné la réponse immunitaire la plus forte. Cependant les protéines salivaires n'ont pas été retrouvées dans les PES des larves.

Tellam *et al.*, (2000) ont mis en évidence que la P-95 était fortement immunogène. En effet, elle est reconnue par des sérums de moutons infestés naturellement ou artificiellement mais pas par des sérums de moutons non infestés.

Pour *Lucilia cuprina*, la protéine P-95 paraît être un bon candidat à la vaccination. En ce qui concerne les extraits des glandes salivaires, il faudrait d'autres données concernant leur identification et leur rôle pour évaluer leur intérêt en vaccination. Nous n'avons pas de données sur l'immunogénicité des protéases de L1 mais des vaccins contenant des sérine-protéases ont été testés.

3.2. Essais vaccinaux

a) Chez *Oestrus ovis*

Frugère *et al.*, (2000) ont immunisé des agneaux avec des PES de larves de troisième stade d'*Oestrus ovis*. Les agneaux immunisés ont ensuite été infestés expérimentalement par des larves de premier stade. Les résultats ont montré que le taux d'installation larvaire était très comparable entre le groupe d'agneaux immunisés (35%) et le groupe d'agneaux témoins non immunisés (39%). En revanche, le pourcentage de stades larvaires en développement était significativement plus important chez les témoins (13%) que chez les immunisés (6%). L'immunisation avec des PES de larve de troisième stade, bien que n'ayant pas protégé les agneaux de l'installation larvaire, a conduit à une inhibition partielle du développement larvaire.

b) Chez *Hypoderma lineatum*

La vaccination contre l'hypodermose bovine a été basée principalement sur l'utilisation de l'HA associée dans des combinaisons différentes aux autres hypodermes HB et HC.

L'hypoderme A a été choisie comme antigène candidat à la vaccination car elle induit à la fois une réponse cellulaire et humorale. Sur des veaux naïfs, l'immunisation avec cette protéine induit une mortalité de 98,5% des larves contre 88,5% chez les témoins (Pruett, 1999). Donc dans ce cas elle confère un haut degré de protection aux veaux.

Cependant les autres tentatives de vaccination n'ont pas apporté le même degré de protection. En effet, Chabaudie *et al.*, (1991) ont vacciné des groupes de veaux naïfs avec des injections sous-cutanées d'HA seule ou associée soit à l'adjuvant incomplet de Freund soit au phosphate d'alumine. Les résultats ne révèlent aucune différence significative entre le nombre de larves qui colonisent le dos des veaux vaccinés et des non vaccinés. L'immunisation des veaux naïfs avec l'HA associée ou non avec des adjuvants est un échec pour une protection contre une infestation naturelle.

De même, Baron et Colwell, (1991) ont immunisé des veaux avec un mélange d'hypodermes HA, HB et HC associées à l'adjuvant monophosphoryl lipide A qui est un immunomodulateur. Dans cette étude, la sensibilité des lymphocytes spécifiques des antigènes est augmentée significativement dans le groupe des veaux immunisés. Les titres en anticorps spécifiques anti-HA, HB et HC sont significativement augmentés chez les animaux vaccinés

par rapport aux animaux infestés servant de groupe de contrôle. Cette augmentation de la réponse immunitaire est corrélée avec le degré de protection observé sur les animaux. Le niveau de protection atteint est de 95% (sur 100 larves implantées, 5 ont achevé le cycle), stimulé par une immunisation avec HA, HB et HC. En revanche, lorsqu'on compare les veaux vaccinés et les veaux ayant reçu l'adjuvant seul, on constate qu'un nombre similaire de larves arrive au stade pupaison suggérant que l'effet immunomodulateur joue un rôle central dans la sensibilité lymphocytaire et donc que l'HA purifiée n'est pas efficace comme antigène vaccinal.

c) Chez *Lucilia cuprina*

Trois approches vaccinales ont été entreprises :

- La vaccination avec des PES des larves a été envisagée. Tellam *et al.*, (1994) ont vacciné des moutons avec 2 sérine-protéases purifiées : LCT25b et LCT25a isolées des PES de L1. L'immunisation a produit une forte réponse en anticorps avec LCT25b et une plus faible avec LTC25a. Cependant, le sérum des moutons vaccinés avec l'une ou l'autre protéase n'affecte pas la croissance des larves L1, la réponse immunitaire ovine n'est donc pas suffisante. Ces résultats sont confirmés *in vivo* où la croissance larvaire sur le dos des moutons vaccinés indique aussi un défaut d'induction au niveau d'une réponse immunitaire qui préviendrait l'établissement larvaire. Ces résultats montrent que les sérine-protéases des PES de *Lucilia cuprina* ne sont pas les antigènes désignés pour la vaccination des moutons contre *Lucilia cuprina*.
- Un essai de vaccination a été réalisé avec des antigènes reconnus par des anticorps produits par les cellules B dans les nœuds lymphatiques de moutons préalablement infestés. Bowles *et al.*, (1996) ont conçu un vaccin avec 4 antigènes de L1 reconnus par les anticorps du nœud lymphatique associés à l'adjuvant rovIL-1 β . Cela a engendré la présence de cellule B CD45+ c'est à dire la production d'anticorps locaux sur le site de l'infestation. L'agrégation cellulaire visible dans l'épiderme sur le site correspond aux cellules T CD4+, aux cellules T $\gamma\delta$ + et aux cellules de Langerhans présentatrices d'antigène. Cet ensemble constitue une protection locale pour prévenir la formation de la plaie. L'essai en antigène caché est fonction de la plaie qui permet la fuite du sérum mais aussi, de la quantité d'anticorps exposée aux larves pour entraîner un retard de

croissance et une mort larvaire. Ici le vaccin a pour but d'empêcher la formation de la plaie avec une réaction immunitaire cellulaire (cellules T $\gamma\delta$ +) et une réaction humorale. Les résultats ont montré une réduction du poids des larves de 85% sur les moutons vaccinés par rapport aux moutons de contrôle.

- Des essais d'immunisation ont été développés avec des antigènes cachés provenant de la matrice péritrophique tels que la protéine P-95. East *et al.*, (1993) ont immunisé des moutons avec des extraits de la membrane péritrophique. L'immunisation a eu pour conséquence le développement d'une réponse immunitaire qui a engendré significativement un poids moyen chez les larves divisé par deux par rapport aux larves de contrôle en croissance. Ces antigènes ne peuvent être solubilisés que par des agents dénaturants de fort potentiel tels que l'urée 4M. Or, comme la réponse immunitaire a quand même lieu, cela signifie qu'ils ont conservé une intégrité structurale. Ceci est très intéressant dans l'optique de fabriquer un vaccin, car les antigènes seraient capables de conserver leur activité après des manipulations biochimiques visant à les purifier et à les caractériser. De même, Tellam et Eisemann, (1998) ont vacciné des moutons avec des antigènes issus de la membrane péritrophique au stade L1. Cette vaccination a induit une forte réponse immunitaire humorale qui inhibe fortement la croissance larvaire, et dans quelques cas, diminue le nombre de larves présentes donc induit une mortalité larvaire. Ils ont démontré que l'inhibition de la croissance larvaire était due aux anticorps avec un mécanisme d'action supposé au niveau de la membrane péritrophique. Les anticorps se fixeraient sur les protéines de cette membrane ou sur les oligosaccharides eux-mêmes et obstrueraient ainsi les pores membranaires, empêchant les nutriments d'arriver au niveau des cellules épithéliales et aux protéases digestives d'agir sur les nutriments pour les dégrader. C'est un effet anti-nutritionnel qui provoquerait ainsi le retard de croissance constaté. Enfin Casu *et al.*, (1997) et Tellam *et al.*, (2000) ont eux aussi vacciné des moutons avec, comme antigène, la P-95. La vaccination a induit une diminution de la croissance larvaire. Les anticorps ingérés diminuent la perméabilité de la matrice péritrophique, il y a donc un manque de nourriture pour la larve.

Les résultats les plus encourageants ont été obtenus avec les antigènes cachés appartenant à la membrane péritrophique et avec ceux obtenus par les anticorps provenant du nœud

lymphatique de moutons infestés. Les sérine-protéases ne semblent pas présenter un intérêt majeur pour la vaccination chez *Lucilia cuprina*.

III.4. Discussion sur les essais

4.1. Choix de l'Ag vaccinal

a) Echec de la vaccination avec les protéases

L'échec relatif de l'immunisation des moutons par des PES de L3 d'*Oestrus ovis* peut s'expliquer par le choix de l'antigène vaccinal. Les antigènes utilisés ont été les PES de L3 et non les PES de L1 pour l'immunisation des moutons. Cependant, des résultats préliminaires ont montré que les effets protéolytiques et les profils en SDS-PAGE des PES de L1 et des PES de L3 sont très proches (Tabouret, 2001). Il faut également tenir compte du fait que les PES sont un mélange protéique complexe présentant à la fois des protéases et des protéines salivaires. En ce qui concerne les protéases, plusieurs facteurs peuvent expliquer cet échec relatif. Tout d'abord les PES des larves d'*Oestrus ovis* ne se composent pas d'une unique trypsine, mais au moins d'une dizaine, ce qui rend leur inhibition conjointe et simultanée par les immunoglobulines plus difficile. Par ailleurs, on a détecté aussi une activité chymotrypsique.

Les protéases ont été identifiées par Kumar, (1993) comme étant peu immunogènes. En effet, il existe une forte homologie structurale entre le site actif de la protéase du parasite et son équivalent chez l'hôte.

Enfin il faut des concentrations en anticorps bloquant l'activité de telle protéase très élevées pour induire la mort de l'animal considéré. Par exemple, pour tuer la mouche *Haematobia irritans exigua*, il faudrait 7,5 mg d'anticorps anti-trypsine par ml de sérum (East *et al.*, 1995), ce qui représente un tiers de la quantité d'immunoglobulines contenues dans un ml de sérum (23.3 mg/mL) (Beh *et al.*, 1974). Ce sont des niveaux très rarement atteints en vaccination. Cependant, les larves d'*Oestrus ovis* sont exposées à l'immunité locale et donc à des quantités d'anticorps importantes. Les IgG sont très nombreuses dans le tractus respiratoire ainsi que les IgA sécrétoires protégées de la protéolyse par la pièce sécrétoire.

On peut donc en déduire que les protéases ne constituent pas de bons antigènes capables de développer une stratégie vaccinale contre *Oestrus ovis*.

Les hypothèses de l'échec de l'immunisation des moutons avec la protéase LCT25b rejoignent celles évoquées pour *Oestrus ovis*. Soit l'activité protéolytique de ces protéases n'est pas affectée par la réponse immunitaire donc leur rôle physiologique est conservé et la croissance larvaire continue, soit les quantités en anticorps sont insuffisantes pour inhiber les concentrations élevées de LCT25b dans les PES, d'autant plus que les substances protéolytiques dégradent les anticorps. Néanmoins, dans le cas de l'HA, la production de protéines recombinantes avec une activité enzymatique moindre dans le but de diminuer l'action immunomodulatrice pourrait être une évolution intéressante dans la production de vaccins contre l'hypodermose.

b) Autres antigènes disponibles

D'autres antigènes ont été utilisés ou envisagés comme candidat-vaccin. Les protéines des glandes salivaires d'*Oestrus ovis* qui sont des immunogènes majeurs (Innocenti *et al.*, 1995) et qui entrent dans la constitution des PES comme nous l'avons vu ci-dessus, peuvent servir à la constitution d'un vaccin. Notamment le complexe de 28 kDa peut être purifié et isolé mais il reste cependant à séquencer les protéines de ce complexe et à définir leur fonction pour envisager une telle utilisation.

Une autre stratégie vise à identifier des protéines membranaires des cellules épithéliales du tube digestif du parasite, puis à immuniser les hôtes contre ces protéines : c'est la méthode des antigènes cachés. C'est cette approche qui a permis de mettre en place un vaccin contre une protéine de la tique *Boophilus microplus* (Willadsen, 1989).

Cependant, pour les myiases, ces protéines sont peu accessibles du fait de la présence de la membrane péritrophique qui sépare le contenu du tube digestif des cellules épithéliales digestives. Cette dernière est poreuse et ne laisse passer que des molécules de taille réduite. Chez les larves de *Lucilia cuprina*, Eisemann *et al.*, (1993) ont estimé que des molécules inférieures à 110 kDa pouvaient franchir la membrane péritrophique. Ainsi, la perméabilité de cette membrane est un obstacle au passage des anticorps (150 kDa) et rend difficile l'approche des antigènes cachés. Mais la dégradation des immunoglobulines par les PES génère des fragments (Fab')₂, de taille suffisamment petite pour passer les pores de la membrane péritrophique. Cette approche a été envisagée dans le cas des larves de *Lucilia cuprina* qui ingèrent les IgG de l'exsudat et les dégradent (Sandeman *et al.*, 1995). Cependant, la quantité d'anticorps fonctionnels reste trop faible pour bloquer l'activité des protéases membranaires des cellules épithéliales du tube digestif (Eisemann *et al.*, 1993). L'identification d'une autre

cible protéique chez les larves pourrait permettre leur neutralisation ou bien engendrer des retards de croissance, sous réserve que les fragments (Fab)² aient conservé leur activité. Il faut également que l'antigène cible ne soit pas présent dans l'hémolymphe, ou accessible uniquement par cette dernière car la quantité d'anticorps fonctionnels en son sein est très faible (Eisemann *et al.*, 1993).

On peut aussi utiliser une méthode visant à bloquer les pores de la membrane péritrophique des larves. Des anticorps anti-péritrophines, protéines constituant de la matrice péritrophique, induisent chez les larves de *Lucilia cuprina* une grande diminution de taille et du poids (East *et al.*, 1993) comme nous l'avons vu précédemment. Les anticorps se fixent à la surface de la membrane au sein de l'espace endopéritrophique formant une monocouche de protéines digérées qui se gélifient à la surface de la membrane en réponse à la fixation des anticorps (Casu *et al.*, 1997). Les pores membranaires sont obstrués, l'assimilation des nutriments n'est plus possible. Cette méthode a permis de diminuer de façon très significative la taille et le poids des larves de *Lucilia cuprina* nourries sur un substrat contenant des anticorps anti-péritrophines (P95 ou P44).

De même, on pourrait utiliser les protéines de la membrane péritrophique du tube digestif en vue de développer un vaccin contre les larves d'*Oestrus ovis* comme pour *Lucilia cuprina*. Ces antigènes « cachés » ne sont pas en contact avec le système immunitaire de l'hôte dans des conditions naturelles. Une immunisation par ces protéines pourrait entraîner la production d'anticorps très efficaces contre les parasites (Tellam et Bowles, 1997). L'immunisation de moutons par des broyats de tube digestif de L2 de *Lucilia cuprina* a permis d'obtenir une réduction significative de la croissance larvaire (Johnston *et al.*, 1992).

Une autre alternative intéressante serait de combiner les effets de plusieurs antigènes tels que les péritrophines 95 et 55. Tellam *et al.*, (2003) ont montré que la P-55 avait un potentiel immunogène qui pouvait être utilisé pour protéger les moutons des myiases. En l'associant à un autre antigène incorporé à la membrane péritrophique dans un même vaccin, on peut augmenter l'activité inhibitrice du sérum et donc la mortalité larvaire. Tellam *et al.*, (2001) ont montré que des anticorps anti-lectine ou des anticorps anti-protéine de la membrane péritrophique accélèrent la mortalité larvaire quand l'inhibition de la croissance larvaire était supérieure à 70-80%.

4.2. Voie d'administration

Dans le cas d'*Oestrus ovis* et de *Lucilia cuprina*, étant donné que les larves se développent au contact des muqueuses nasales et sinusales, il serait judicieux de choisir une immunisation par voie intra-nasale en utilisant un adjuvant spécifique de l'immunité des muqueuses. Bowles *et al.*, (1987) ont démontré que l'immunisation intra-nasale des moutons à l'aide d'une préparation d'antigènes de PES de L2 de *Lucilia cuprina* a conduit à une réduction significative du nombre de larves après infestation expérimentale, alors que la voie intradermique d'immunisation ne protégeait pas les animaux. Les immunisations par voie nasale sont reconnues pour être très efficaces dans l'induction d'anticorps systémiques et muqueux (Hvalbye *et al.*, 1999) par l'intermédiaire du système lymphoïde nasopharyngé.

Colditz *et al.*, (2002) ont mené une étude pour augmenter la concentration cutanée des anticorps dirigés contre les antigènes provenant de la membrane péritrophique à partir d'immunisation intradermique. En effet, l'efficacité des vaccins qui emploient ces antigènes peut être limitée par la quantité d'anticorps disponible dans la peau pour l'ingestion des larves. Les antigènes recombinants issus de la membrane péritrophique utilisés sont : l'antigène P44, l'antigène P48 et l'antigène P95. Les résultats obtenus ont montré que la concentration des anticorps spécifiques était significativement plus élevée dans les transsudats cutanés des sites immunisés localement, qu'au niveau des sites de contrôle adjacents. L'immunisation cutanée peut donc assister le contrôle immunologique des larves.

4.3. Rôle des adjuvants

a) Les principaux adjuvants disponibles

L'adjuvant complet de Freund est une émulsion d'eau dans l'huile contenant des mycobactéries tuées dans la phase huileuse.

L'adjuvant incomplet de Freund est une émulsion d'eau dans l'huile sans mycobactéries.

L'amphigen peut augmenter la réponse à médiation cellulaire mais diminue fortement la concentration en anticorps et l'hypersensibilité retard.

L'alhydrogel est un gel d'hydroxide d'aluminium qui adsorbe les antigènes protéiques. Par rapport aux autres adjuvants, il est déficient sur la stimulation immunitaire à médiation cellulaire mais efficace pour augmenter la synthèse d'IgE, notamment chez les lapins.

Le monophosphoryl lipide A a été utilisé par Baron et Colwell, (1991) associé aux hypodermes purifiées A, B et C pour immuniser des veaux contre les infestations dues à *Hypoderma lineatum*. L'adjuvant est isolé des cellules de *Salmonella minnesota* et a d'excellentes propriétés immunomodulatrices sans effet toxique trop important. Il améliore la résistance aux infections microbiennes et parasitaires à travers son influence sur l'activité des macrophages (Ulrich *et al.*, 1988). Cette étude a montré que le monophosphoryl lipide A augmente la sensibilité des lymphocytes spécifiques des antigènes sur les animaux immunisés.

L'adjuvant rovIL-1 β (recombinant ovine IL-1 β) a été utilisé par Bowles *et al.*, (1996) avec des antigènes de L1 de *Lucilia cuprina*. Cet adjuvant stimule la réaction immunitaire locale incluant l'hypersensibilité retard (Lofthouse *et al.*, 1995). Dans cette étude, il a modulé la réaction immunitaire cellulaire. Il intervient également dans l'activation de l'IL-2 et de ses récepteurs et donc dans l'activation des cellules T et l'initiation de la réponse immunitaire.

b) Discussion sur les résultats obtenus

L'adjuvant complet de Freund est le plus efficace pour stimuler les réponses immunitaires cellulaires et humorales comme le montre l'étude faite par Pruett et Stromberg, (1995) dans laquelle l'hypoderme A est administrée sur des troupeaux de bovins naïfs associée à l'adjuvant complet de Freund. Il s'ensuit la mise en place d'une réponse immunitaire protectrice caractérisée par une augmentation de la mortalité larvaire *in vivo*. Cependant, cet adjuvant n'est pas autorisé en médecine vétérinaire car il entraîne des réactions locales au site d'injection notamment une inflammation chronique voire une abcédation stérile.

L'amphigen et l'alhydrogel sont ensuite testés comme adjuvants. Le meilleur résultat résulte de l'association des 2 qui permet d'avoir le niveau le plus élevé en anticorps dans la circulation périphérique et une meilleure intensité de la réponse de type retard avec particulièrement une bonne infiltration neutrophilique. Cependant les réactions humorales et cellulaires induites ne sont pas comparables avec celles induites avec un vaccin hypoderme A-adjuvant complet de Freund.

De même, les adjuvants Quil A, Dextran-Sulfate associés seul à un mélange d'antigènes de L1 de *Lucilia cuprina* ne protègent pas les animaux d'une infestation contrairement à l'association avec l'adjuvant complet de Freund (East *et al.*, 1992).

Chabaudie *et al.*, (1991) ont montré également que le phosphate d'alumine était inefficace comme adjuvant : administré à des veaux naïfs associé à l'HA, il n'a induit aucune protection contre une infestation naturelle d'hypodermose. L'HA associée à l'adjuvant

incomplet de Freund a induit un niveau de protection de 22.6% par rapport à un niveau de contrôle. C'est tout de même moins qu'avec l'HA injectée seule : le niveau de protection est alors de 28%. Dans ces travaux, les adjuvants cités ci-dessus semblent se révéler inefficaces.

Pour tous ces adjuvants, excepté l'adjuvant complet de Freund interdit, leur efficacité pour la vaccination contre les myiases semble très faible. Dans le cas d'une vaccination contre *Oestrus ovis*, le choix d'un adjuvant capable de stimuler l'immunité des muqueuses pourrait considérablement améliorer le rendement vaccinal. Il serait peut être intéressant de mettre à l'épreuve l'adjuvant rovIL-1 β qui est capable de stimuler une réaction immunitaire locale.

4.4. Production de protéines recombinantes

D'une manière générale, pour mettre au point un vaccin il faut identifier et purifier les antigènes larvaires spécifiques et efficaces pour produire des protéines recombinantes correspondantes. Une stratégie de contrôle immunologique anti-larvaire efficace devra exercer ses effets majeurs sur L1. Deux études ont été menées afin de produire des protéines recombinantes d'antigènes utilisés pour la vaccination.

a) Production de protéines recombinantes de la P-95.

Tellam *et al.*, (2001) ont produit à partir de la P-95 isolée de la matrice péritrophique deux protéines recombinantes : l'une dans une bactérie, *Escherichia Coli*, et l'autre dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus. Les protéines recombinantes obtenues sont nommées ecP-95 pour celle produite dans la bactérie *E.Coli* et bvP-95 pour celle produite dans la cellule infectée par le baculovirus. Ils ont observé que la ecP-95 n'avait pas une bonne configuration spatiale. La bvP-95 a une configuration spatiale identique à la P-95 naturelle mais les oligosaccharides qui lui sont attachés diffèrent de ceux de la P-95 naturelle. Ceci entraîne une différence structurale entre les deux protéines. La bvP-95 semble plus lourde donc probablement hyperglycosylée.

Pour évaluer l'impact de cette différence structurale, ils ont vacciné des moutons avec la protéine recombinée. Les résultats ont montré une faible activité sur l'inhibition de la croissance larvaire en présence de la bvP-95 tandis que cette activité est beaucoup plus forte avec la P-95 naturelle. On peut donc conclure que les anticorps dirigés contre la P-95 dans les conditions de vaccination qui inhibent la croissance larvaire chez le mouton, sont dirigés à la fois contre le polypeptide déplié dans la bonne configuration et les oligosaccharides attachés à

la P-95. Donc la structure du polypeptide ainsi que les oligosaccharides ajoutés lors des processus de maturation des protéines sont essentiels pour l'induction d'une activité inhibitrice de la croissance larvaire.

Ainsi, on peut dire que la production d'une protéine recombinante de la P-95 passe par la reproduction des sites glycosiques de la protéine.

b) Production d'une HA recombinée

Khanadji *et al.*, (2003) ont produit dans des cellules de *Drosophila melanogaster* une HA recombinante non glycosylée. Cette dernière a des caractéristiques biochimiques et biologiques similaires à l'HA native. L'activité de l'HA recombinante sur l'inhibition de la prolifération lymphocytaire et le clivage des antigènes de membrane a été testée avec succès. Il apparaît que dans ce cas la glycosylation n'est pas importante pour l'activité de la protéase HA et pour ses capacités immunogéniques. C'est donc une base pour avoir une protéine mutée avec une meilleure immunogénicité et une activité enzymatique plus faible dans le but notamment de bloquer l'action immunomodulatrice de HA.

Conclusion

Ce travail nous a permis de constater que les produits d'excrétion/sécrétion des larves étaient majoritairement composés d'enzymes et plus particulièrement de sérine-protéases d'origine digestive. Leurs activités enzymatiques se sont révélées similaires d'une espèce larvaire à l'autre.

Ces protéases sont essentielles au développement larvaire notamment de part leur rôle au sein de la nutrition et de l'établissement larvaire, mais aussi par leur activité immunomodulatrice qui tient souvent le système immunitaire de l'hôte en échec. De plus, par l'intermédiaire de ces protéases, les larves parviennent à détourner la réponse inflammatoire dans leur sens, dans le but d'obtenir une source en nutriments continue pendant toute la durée du développement larvaire.

Cependant, les tentatives de vaccination dans lesquelles elles ont participé en tant qu'antigène cible pour le système immunitaire de l'hôte se sont soldées par un échec. Elles n'apparaissent donc pas comme étant des antigènes de référence pour la vaccination.

En ce qui concerne *Oestrus ovis*, la poursuite des expériences sur l'identification de l'antigène de 28 kDa très immunogène est nécessaire pour envisager un vaccin. De même, il serait souhaitable d'étudier les protéines structurales de la membrane péritrophique de l'intestin, particulièrement les péritrophines, qui donnent des résultats encourageants dans les essais vaccinaux contre les larves de *Lucilia cuprina*. La technique visant à obtenir des antigènes en vue de l'élaboration d'un vaccin sélectionné par des anticorps prélevés dans des nœuds lymphatiques de bovins infestés, mérite également d'autres investigations car les résultats sont positifs.

La lutte contre ces myiases ne pourra certainement pas se passer des insecticides dans l'immédiat. Leur utilisation doit donc se faire de façon raisonnée pour limiter les phénomènes de résistance. D'autres pistes font l'objet d'étude : O'Meara *et al.*, (1992) ont montré qu'une sélection génétique basée sur la résistance aux infestations larvaires de *Lucilia cuprina* étaient envisageables à travers la réponse inflammatoire.

Bibliographie

1. ALZIEU, J.P., CHIARISOLI, O.
Actualités sur la clinique et la thérapeutique de l'œstrose ovine.
Point Vét., 1990, **22**(129) : 173-183.
2. ALZIEU, J.P., DORCHIES, PH., DONAT, F., CHIARISOLI, O.
Données nouvelles sur l'épidémiologie de l'œstrose ovine et sa prévention par le closantel.
Point Vét., 1994, **26** (162) : 363-369.
3. ARUNDEL, J.H., SUTHERLAND, A.K.
Blowflies of sheep.
In : *Animal Health in Australia*, vol 10, *Ectoparasitic Diseases of Sheep, Cattle, Goats and Horses* (Edited by ARUNDEL, J.H., SUTHERLAND, A.K.), 1988, pp. 35-60. Australian Government Publishing Service, Canberra.
4. BACH, J.F., LESAVRE, P.
Immunologie.
Collection de la biologie à la clinique, Médecine-Sciences, Flammarion, 1991.
5. BARON, R.W., WEINTRAUB, J.
Lymphocyte responsiveness in cattle previously infested and uninfested with *Hypoderma lineatum* (de Vill.) and *H. Bovis* (L.) (Diptera : Oestridae).
Vet. Parasitol., 1987, **24** : 285-296.
6. BARON, R.W.
Cleavage of purified bovine complement component C3 in larvae of *Hypoderma lineatum* (Diptera : Oestridae) hypodermins.
J. Med. Entomol., 1990, **27** (5) : 899-904.
7. BARON, R.W., COLWELL, D.D.
Enhanced resistance to cattle grub infestation (*Hypoderma lineatum* de Vill.) in calves immunized with purified hypodermin A, B and C plus monophosphoryl lipid A (MLP).
Vet. Parasitol., 1991, **38** : 185-197.
8. BEH, K., WATSON, D., LASCELLES, A.
Concentrations of immunoglobulins and albumin in lymph collected from various regions of the body of the sheep.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1974, **52** : 81-86.
9. BENAKHLA, A., BOULARD, C., SEDRAOUI, S., OUSSAID, F.
L'hypodermose bovine : approche épidémiologique et caractérisation du cycle biologique en vue de l'établissement d'un plan de prophylaxie dans le nord est algérien.
Rev. Méd. Vét., 1993, **144**, 693-700.
10. BOULARD, C.
Anatomie et histologie du tube digestif de la larve d' *Hypoderma bovis* (Diptère Oestriforme)
Annls. Soc. Ent. Fr. (N.S.), 1969, **5(2)**: 371-387.

11. BOULARD, C., WEINTRAUB, J.
Immunological responses of rabbits to *Hypoderma*.
Int. J. Parasitol., 1973, **3** : 379-386.
12. BOULARD, C.
Modifications histologiques de la sous-muqueuse oesophagienne de bovins parasités par *Hypoderma lineatum* (de. Vill.) (Diptera-Oestridae).
Ann. Rech. Vét., 1975, **6** : 131-142.
13. BOULARD, C., GARRONE, R.
Characterization of a collagenolytic enzyme from larvae of *Hypoderma lineatum* (insecta: diptera, oestriiform).
Comp. Biochem. Physiol., 1978, **59B**: 251-255.
14. BOULARD, C., BENCHARIF, F.
Changes in the haemolytic activity of bovine serum complement by *Hypoderma lineatum* (insect oestridae) larval proteinases in naive immune cattle.
Parasite Immunol., 1984, **6**(5): 459-467.
15. BOULARD, C.
Degradation of bovine C3 by serine proteases from parasites *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae).
Vet. Immunol. Immunopathol., 1989, **20**: 387-398.
16. BOUREE, P., RESENDE, P.
Rôle pathogène des mouches.
Rev. Fr. Lab., décembre 2001, **338** : 65-71.
17. BOWLES, V.M., CARNEGIE, P.R. SANDEMAN, R.M.
Immunization of sheep against infection with larvae of the blowfly *Lucilia cuprina*.
Int. J. Parasitol., 1987, **17**: 753-758.
18. BOWLES, V.M., CARNEGIE, P.R., SANDEMAN, R.M.
Characterisation of proteolytic and collagenolytic enzymes from the larvae *Lucilia cuprina*, the sheep blowfly.
Aust. J. Biol. Res. , 1988, **41**: 269-278.
19. BOWLES, V.M., FEEHAN, J.P., SANDEMAN, R.M.
Sheep plasma protease inhibitors influencing protease activity and growth of *Lucilia cuprina* a larvae *in vitro*.
Int. J. Parasitol., 1990, **20**: 169-174.
20. BOWLES, V.M., GREY, S.T., BRANDON, M.R.
Cellular immune responses in the skin of sheep infected with larvae of *Lucilia cuprina*, the sheep blowfly.
Vet. Parasitol., 1992, **44**: 151-162.

21. BOWLES, V.M., MEEUSEN, E.N.T., CHANDLER, K., VERHAGEN, A., NASH, A.D., BRANDON, M.R.
The immune response of sheep infected with larvae of the sheep blowfly *Lucilia cuprina* monitored via efferent lymph.
Vet. Immunol. Immunopathol., 1994, **40** : 341-352.
22. BOWLES, V.M., MEEUSEN, E.N.T., YOUNG, A.R., ANDREWS, A.E., NASH, A.D., BRANDON, M.R.
Vaccination of sheep gainst larvae of the sheep blowfly (*Lucilia cuprina*).
Vaccine, 1996, **14**: 1347-1352.
23. CAVAILLON, J.M.
Les cytokines.
Masson, Paris, 1996, 589 pp.
- 24 . CASU, R.E., PEARSON, R.D., JARMEY, J.M., CADOGAN, L.C., RIDING, G.A., TELLAM, R.M..
Excretory/secretory chymotrypsin from *Lucilia cuprina*: purification, enzymatic specificity and amino acid sequence deduced from mRNA.
Insect Mol. Biol., 1994, **3(4)**: 201-211.
25. CASU, R.E., JARMEY, J.M., ELVIN, C.M., EISEMAN, C.H.
Isolation of a trypsin-like serine protease gene family from the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*.
Insect. Mol. Biol., 1994, **3(3)**: 159-170.
26. CASU, R.E., EISEMANN, C.H., VUOCOLO, T., TELLAM, R.L.
The major excretory/secretory protease from *Lucilia cuprina* larvae is also a gut digestive protease.
Int. J. Parasitol., 1996, **26**: 623-628.
27. CASU, R., EISEMANN, C., PEARSON, R., *et al.*
Antibody-mediated inhibition of the growth of larvae from an insect causing cutaneous myiasis in a mammalian host.
Proc. Natl. Acad. Sci., 1997, **94**: 8939-8944.
28. CEPELADA-PALACIOS, R., AVILA, A., RAMIREZ-ORDUNA, R., DORCHIES, P.
Estimation of the growth patterns of *Oestrus ovis* L. Larvae hosted by goats in Baja California Sur, Mexico.
Vet. Parasitol., 1999, **86** : 119-126.
29. CEPELADA-PALACIOS, R., FRUGERE, S., DORCHIES, P.
Expected effects of reducing *Oestrus ovis* L. mature larval weight on adult ppopulations.
Vet. Parasitol., 2000, **90** : 239-246.
30. CHABAUDIE, N., BOULARD, C.
Effect of hypodermin A, an enzyme secreted by *Hypoderma lineatum* (Insect Oestridae), on the bovine immune system.
Vet. Immunol. Immunopathol., 1992, **31**: 167-177.

31. CHABAUDIE, N., VILLEJOURT, C., BOULARD, C.
The response of cattle vaccinated with hypodermin A to a natural infestation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum*.
Int. J. Parasitol., 1991, **21**: 859-862.
32. CHABAUDIE, N., BOULARD, C.
In vitro and ex vivo responses of bovine lymphocytes to hypodermin C, an enzyme secreted by *Hypoderma lineatum* (insect oestridae).
Vet. Immunol. Immunopathol., 1993, **36** (2) : 153-162.
33. CLARCK, I.A., ROCKETT, K.A.
Nitric oxide and parasitic disease.
Adv. in Parasitol., 1996, **37** : 1-55.
34. COLDITZ, I.G., WATSON, D.L., EISEMANN, C.H., TELLAM, R.L.
Production of antibodies to recombinant antigens from *Lucilia cuprina* following cutaneous immunisation of sheep.
Vet. Parasitol., 2002, **104**: 345-350.
35. COLWELL, D., LEGGETT, F.
Uptake of bovine IgG by first instars of the common cattle grub, *Hypoderma lineatum*
Int. J. Parasitol., 2004, **34** : 219-223.
36. DORCHIES, PH., ALZIEU, J.P.
L'Oestrose ovine : revue.
Rev. Méd. Vét., 1997, **148** (7) : 565-574.
37. DURANTON, C.
Comparaison de l'infestation par *Oestrus ovis* (Linné 1761) chez la chèvre et le mouton.
Thèse de l'université Paul Sabatier. Toulouse III, 208pp.
38. EAST, I.J., EISEMANN, C.H.
Vaccination against *Lucilia cuprina* : the causative agent of sheep blowfly strike.
Immunol. Cell Biol., 1993, **71**: 453-462.
39. EAST, I.J., FITZGERALD, C.J., PEARSON, R.D. *et al.*
Lucilia cuprina: inhibition of larval growth induced by immunization of host sheep with extracts of larval peritrophic membrane.
Int. J. Parasitol., 1993, **23**(2) : 221-229.
40. EISEMANN, C.H., JOHNSTON, L.A.Y., BROADMEADOW, M., O'SULLIVAN, B.M., DONALDSON, R.A., PEARSON, R.D., VUOCOLO, T., KERR, J.D.
Acquired resistance of the sheep to larvae of *Lucilia cuprina*, assessed in vivo and in vitro.
Int. J. Parasitol., 1990, **20**: 299-305.
41. EISEMANN, C.H., PEARSON, R., DONALDSON, R., CADOGAN, L., VUOCOLO, T.
Uptake and fate of specific antibody in feeding larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*.
Med. Vet. Entomol., 1993, **7** : 177-185.

42. EISEMANN, C.H., BINNINGTON, K.C.
The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasite arthropods.
Int. J. Parasitol., 1994, **24** : 15-26.
43. ELVIN, C.M., VUOCOLO, T., SMITH, W.J., EISEMANN, C.H., RIDDLES, P.W.
An estimate of the number of serin protease genes expressed in sheep blowfly larvae (*Lucilia cuprina*).
Insect. Mol. Biol., 1994, **3(2)**: 105-115.
44. FISCHER, W.F., PRUETT, J.H., HOWARD, V.M., SCHOLL, P.J.
Antigen-specific lymphocyte proliferative responses in vaccinated and *Hypoderma lineatum*-infested calves.
Vet. Parasitol., 1991, **40** : 135-145.
45. FRUGERE, S., COTA LEON, A., PREVOT, F.
Immunisation of lambs with excretory secretory products of *Oestrus ovis* third instar larvae and subsequent experimental challenge.
Vet. Res., 2000, **31** : 527-535.
46. GINGRICH, R.E.
Differentiation of resistance in cattle to larval *Hypoderma lineatum*.
Vet. Parasitol., 1980, **7** : 243-254.
47. GINGRICH, R.E.
Acquired resistance to *Hypoderma lineatum* : comparative immune response of resistant and susceptible cattle.
Vet. Parasitol., 1982, **9** : 233-242.
48. GUERRINI, V.H.
Ammonia toxicity and alkalosis in sheep infested by *Lucilia cuprinae* larvae.
Int. J. Parasitol., 1988, **18**: 79-81.
49. GUERRINI, V.H.
Excretion of ammonia by *Lucilia cuprina* larvae suppresses immunity in sheep.
Vet. Immunol. Immunopathol., 1997, **56**: 311-317.
50. GUERRINI, V.H., MURPHY, G.M. and Broadmeadow, M., 1988. The role of pH in the infestation of sheep by *Lucilia cuprinae* larvae.
Int. J. Parasitol., **18**: 407-409.
51. GUERRINI, V.H., BELL, MURPHY, G.M., 1988. *Lucilia cuprina* induced hyperammonaemia and alkalosis associated pathology in sheep.
J.S. Afr. Vet. Assoc., 1988, **59(2)**: 73-6.
52. HVALBYE, B.K.R., AABERGE, I.S., LOVIK, M., HANEBERG, B.
Intranasal immunization with heat-inactivated *Streptococcus pneumoniae* protects mice against systemic pneumococcal infection.
Inf. Immun., 1999, **40** : 4320-4325.

53. INNOCENTI, L., MASETTI, M., MUACCHIONI, G., GIORGI, F.
Larval salivary gland proteins of the sheep nasal bot fly, (*Oestrus ovis* L.), are major immunogens in infested sheep.
Vet. Parasitol., 1995, **60**: 273-282.
54. JOHNSTON, L., EISEMANN, C.H., DONALDSON, R.A., PEARSON, R.D., VUOCOLO, T.
Retarded growth of *Lucilia cuprina* larvae on sheep and their sera following production of an immune response.
Int. J. Parasitol., 1992, **22** : 187-193.
55. KERLIN, R.L., EAST, I.J.
Potent immunosuppression by secretory/excretory products of larvae the sheep blowfly *Lucilia cuprina*.
Parasite Immunol., 1992, **14** (6): 595-604.
56. KHAZNADJI, E., BOULARD, C., MOIRE, N.
Expression of fonctionnal hypodermin A, a serine protease from *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae), in Schneider 2 cells.
Exp. Parasitol., 2003, **104**: 33-39.
57. KUMAR, S.
Selective modification and immune evasion: a hypothesis.
Immunol. Cell Biol., 1993, **71**: 141-143.
58. LASKIN, J.D., HECK, D.E., LASKIN, D.L.
Multifonctional role of nitric oxide in inflammation.
Trends Endocrin. Metabolism, 1994, **5**: 377-382.
59. LECROISEY, A., BOULARD, C., KEIL, B.
Chemical and enzymatic characterization of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*.
Eur. J. Biochem., 1979, **101**: 385-393.
60. LECROISEY, A., TONG, N.T., KEIL, B.
Hypodermin B, a trypsin-related eenzyme from the insect *Hypoderma lineatum*. Comparison with Hypodermin A and Hypoderma collagenase, two serine proteinases from the same source.
Eur. J. Biochem., 1983, **134** : 261-267.
61. LECROISEY, A., KEIL, B.
Specificity of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*.
Eur. J. Biochem., 1985, **152**: 123-130.
62. LECROISEY, A., GILLES, A.M., DE WOLF, A., KEIL, B.
Complete amino acid sequence of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*.
J. Biol. Chem., 1987, **262**: 7546-7551.

63. LEHANE, M.J.
Peritrophic matrix structure and fonction.
Ann. Rev. Entomol., 1997, **42**: 525-550.
64. LENNOX F.G.
Studies of the physiology and toxicology of blowflies.
Pamphlet 109, Council for Scientific and Industrial Research, pp.1-64, 1941.
65. LOFTHOUSE, S.A., ANDREWS, A.E., NASH, A.D., BOWLES, V.M.
Humoral and cellular responses induced by intradermally administred cytokine and conventionnal adjuvants.
Immun. Cell. Biol., 1995, **13** : 1131-1137.
66. MARCHENKO, V.A., MARCHENKO, V.P.
Survival of the larvae of the sheep botfly *Oestrus ovis* Linné depending on the function of the immune system of the host' body.
Parazitologiya, 1989, **23** : 129-133.
67. McKERROW, J.H.
Parasite proteases.
Exp. Parasitol., 1989, **68**: 111-115.
68. MOIRE, N., NICOLAS-GAULARD, I., LE VERN, Y., BOULARD, C.
Enzymatic effect of hypodermine A, a parasite protease, on bovine lymphocyte membrane antigens.
Parasite Immunol., 1997, **19**: 21-27.
69. NELSON, W.A., WEINTRAUB, J.
Hypoderma lineatum (de Vill.) (Diptera : Oestridae): invasion of the bovine skin by newly hatched larvae.
J. Parasitol., 1972, **58** : 614-624.
70. NICOLAS-GAULARD, I., MOIRE, N., BOULARD, C.
Effect of the parasite enzyme, hypodermin A, on bovine lymphocyte proliferation and interleukin-2 production via the prostaglandin pathway.
Immunol., 1995, **85** (1) : 160-165.
71. O'DONNELL, I.J., GREEN, P.E., CONNELL, J.A., HOPKINS, P.S.
Immunoglobulin G antibodies to the antigens of *Lucilia cuprina* in the sera of fly-struck sheep.
Aust. J. Biol. Sci., 1980, **33**: 27-34.
72. O'DONNELL, I.J., GREEN, P.E., CONNELL, J.A., HOPKINS, P.S.
Immunization of sheep with larval antigens of *Lucilia cuprina*.
Aust. J. Biol. Sci., 1981, **34**: 411-417.
73. O'MEARA, T.J., RAADSMA, H.W., SAVILLE, D.G., SANDEMAN, R.M.
Variation in skin inflammatory responses between sheep bred for resistance or susceptibility to fleece rot and blowfly strike .
Res. Vet. Sci., 1992, **52**: 205-210.

74. O'MEARA, T.J., NESA, M., SEATON, D.S., SANDEMAN, R.M.
In press. A comparison of inflammatory exsudates released from myiasis wounds on sheep bred for resistance or susceptibility to *Lucilia cuprina*.
Parasite Immunol.
75. OTRANTO, D.
The immunology of myiasis: parasite survival and host defense strategies.
TRENDS in Parasitol., 2001, **17**: 176-182.
76. OTRANTO, D., STEVENS, J.R.
Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae.
Int. J. Parasitol., 2002, **32**: 1345-1360.
77. PANCIERA, R.J., EWING, S.A., JONHSON, B.J., WHITENACK, D.L.
Eosinophilic mediastinitis, myositis, pleuritis, and pneumonia of cattle associated with migration of first-instar larvae of *Hypoderma lineatum*.
J. Vet. Diagn. Invest., 1993, **5**(2) : 226-231.
78. PAPAVERO, N.
The world Oestridae-(Diptera). Mammals and continental drifts.
Series Entomologica, 1977, **14**: 240 pp.
79. PRUETT, J.H., TEMEYER, K.B., BURKETT, B.K.
Antigenicity and immunogenicity of *Hypoderma lineatum* soluble proteins in the bovine host.
Vet. Parasitol., 1988, **29**: 53-63.
80. PRUETT, J.H.
Proteolytic cleavage of bovine IgG by hypodermine A, a serine protease of *Hypoderma lineatum*.
J. Parasitol., 1993, **79**: 829-833.
81. PRUETT, J.H., STROMBERG, P.
Effects of adjuvants on bovine humoral and cellular responses to hypodermin A.
Vet. Parasitol., 1995, **58** : 143-153.
82. PRUETT, J.H., KUNZ, S.E.
Development of resistance to *Hypoderma lineatum* (Diptera : Oestridae) within a cattle herd.
J. Med. Entomol., 1996, **33** : 49-52.
83. PRUETT, J.H.
Immunological control of arthropod ectoparasites. A review.
Int. J. Parasitol., 1999, **29** : 25-32.
84. QUEENSLAND GOVERNMENT. (Page consultée le 14 septembre 2004). Site du « department of primary industries and fisheries, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.dpi.qld.gov.au/sheep/10041.html>
85. RODHAIN, F., PEREZ, C.
Précis d'Entomologie médicale et vétérinaire.
Maloine Ed., Paris. 457 pp.

86. SANDEMAN, R.M., DOWSE, C.A., CARNEGIE, P.R.
Initial characterisation of the sheep immune response to infections of *Lucilia cuprina*.
Int. J. Parasitol., 1985, **15**: 181-185.
87. SANDEMAN, R.M., BOWLES, V.M., STACEY, I.N., CARNEGIE, P.R.
Acquired resistance in sheep to infection with larvae of the blowfly, *Lucilia cuprina*.
Int. J. Parasitol., 1986, **16**: 69-75.
88. SANDEMAN, R.M., COLLINS, B.J., CARNEGIE, P.R.,
A scanning electron microscope study of *L. Cuprina* larvae and the development of blowfly strike in sheep.
Int. J. Parasitol., 1987, **17**: 759-765.
89. SANDEMAN, R.M., FEEHAN, J.P., CHANDLER, R.A. BOWLES, V.M.
Tryptic and chymotryptic proteases released by larvae of the blowfly, *Lucilia cuprina*.
Int. J. Parasitol., 1990, **20**: 1019-1023.
90. SANDEMAN, R.M., CHANDLER, R.A., COLLINS, B.J., O'MEARA, T.J.
Hypersensitivity responses and repeated infections with *Lucilia cuprina*, the sheep blowfly.
Int. J. Parasitol., 1992, **22**: 1175-1177.
91. SANDEMAN, R.M., CHANDLER, R.A., TURNER, N., SEATON, D.S.
Antibody degradation in wound exudates from blowfly infections on sheep.
Int. J. Parasitol., 1995, **25**: 621-628.
92. SEATON, D.S., O'MEARA, T.J., CHANDLER, R.A., SANDEMAN, R.M.
The sheep antibody response to repeated infection with *Lucilia cuprina*.
Int. J. Parasitol., 1992, **22** : 1169-1174.
93. SKELLY, P.J., HOWELS, A.J.
The humoral response of sheep to antigens from larvae of the sheep blowfly (*Lucilia cuprina*).
Int. J. Parasitol., 1987, **17**: 1081-1087.
94. TABOURET, G.
Activités immunomodulatrices des produits d'excrétion/sécrétion d'un Diptère myiasigène du mouton et de la chèvre: *Oestrus ovis* (Linné 1761).
Diplôme d'Etudes Approfondies de Parasitologie, 1998, Université Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc.
95. TABOURET, G.
Oestrus ovis (linné 1761) [Diptera : oestridae] chez les ovins : application à la caractérisation des tumeurs mammaires.
Th. D. : Parasitologie : Toulouse 3 : 2001.
96. TABOURET, G., PREVOT, F., BERGEAUD, J.P., DORCHIES Ph., JACQUIET, P.
Oestrus ovis (Diptera: Oestridae): sheep humoral immune response to purified excreted/secreted salivary gland 28 kDa antigen complex from second and third instar larvae.
Vet. Parasitol., 2001, **101**: 53-66.

97. TABOURET, G., BRETT-BENNIS, L., DORCHIES, P., JACQUIET, P.
Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae.
Vet. Parasitol., 2003, **114**: 305-314.
98. TELLAM, R.L., EISEMANN, C.H., PEARSON, R.D.
Vaccination of sheep with purified serine proteases from the secretory and excretory material of *Lucilia cuprina* larvae.
Int. J. Parasitol., 1994, **24**: 757-764.
99. TELLAM, R.L., BOWLES, V.M.
Control of blowfly strike in sheep : current strategies and future prospects.
Int. J. Parasitol., 1997, **27** : 261-273.
100. TELLAM, R.L., EISEMANN, C.H., 1998.
Inhibition of growth of *Lucilia cuprina* larvae using serum from sheep vaccinated with first-instar larval antigen.
Int. J. Parasitol., 1998, **28**: 439-450.
101. TELLAM, R.L., WIJFFELS, G., WILLADSEN, P.
Peritrophix matrix proteins.
Insect Biochem. Molec. Biol., 1999, **29** : 87-101.
102. TELLAM, R.L., EISEMANN, C., CASU, R., PEARSON, R.
The intrinsic peritrophic matrix protein peritrophin-95 from larvae of *Lucilia cuprina* is synthesised in the cardia and regurgitated or excreted as a highly immunogenic protein.
Insect. Biochem. Mol., 2000, **30**: 9-17
103. TELLAM, R.L., EISEMANN, C.H., VUOCOLO, T., CASU, R., JARMEY, J., BOWLES, V., PEARSON, R.
Role of oligosaccharides in the immune response of sheep vaccinated with *Lucilia cuprina* larval glycoprotein, peritrophin-95.
Int. J. Parasitol., 2001, **31**: 798-809.
104. TELLAM, R.L., VUOCOLO, T., EISEMANN, C. et al.
Identification of an immuno-protective mucin-like protein, peritrophin-55, from the peritrophic matrix of *Lucilia cuprina* larvae.
Insect Biochem. Mol. Biol., 2003, **33** : 239-252.
105. TONG, N.T., IMHOFF, J.M., LECROISEY, A., KEIL, B.
Hypodermin A, a trypsin-like neutral proteinase from the insect *Hypoderma lineatum*.
Biochim. Biophys. Acta, 1981, **658**: 209-219.
106. ULRICH, J.T., MASIHI, K.N., LANGE, W.
Mechanisms of nonspecific resistance to microbial infections induced by trehalose dimycolate (TDM) and monophosphoryl lipid A (MLP).
Adv. Biosci., 1988, **68** : 167-178.

107. VISEK W.J.
Ammonia: its effects on biological systems, metabolic hormones and reproduction.
J. Dairy Sci., **67**: 481-498.
108. WILLADSEN, P.
Novel vaccines for ectoparasites.
Vet. Parasitol., 1997, **71** : 209-222.
109. YILMA, J.M.
Contribution à l'étude de l'épidémiologie, du diagnostic immunologique et de la physiopathologie de l'œstrose ovine.
Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. 1992. 218P.
110. YILMA, J.M., DORCHIES, PH.
Essais d'infestations expérimentales de l'agneau par des larves 1 d'*Oestrus ovis*.
Bull. Soc. Franç. Parasitol., 1993, **11** : 43-47.
111. YOUNG, A. R., MEEUSEN, E.N.T., BOWLES V.M.
Characterization of ES products involved in wound initiation by *Lucilia cuprina* larvae.
Int. J. Parasitol., 1996, **26**: 245-252.
112. ZUMPT, F.
Myiasis in man and animals in the old world.
Butterworth ed. London, 1965, **267pp**.