



ANNEE 2021 THESE : 2021 – TOU 3 – 4054

UTILISATION DE LA MICROSCOPIE CONFOCALE ET A FEUILLE DE LUMIERE EN 3D DANS L'ETUDE DE L'ANATOMIE DE LA MOUCHE D'ETABLE, STOMOXYSS CALCITRANS

THESE
pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

LEROY Margaux

Née le 02/05/1995 à MONT-SAINT-AIGNAN (76)

Directrice de thèse : Mme Emilie BOUHSIRA

JURY

PRESIDENT :
M. Alexis VALENTIN

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Emilie BOUHSIRA
Mme Isabelle RAYMOND-LETRON

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

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

**PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

**PROFESSEURS 1^{ère}
CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE
--

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales
réglementées*

Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DEBREUQUE Maud**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Félipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*

Remerciements

A mon jury de thèse :

Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN,

*Professeur des Universités,
Zoologie et Parasitologie, Université Paul-Sabatier de Toulouse,
Service de Parasitologie et de Mycologie, Institut Fédératif de Biologie, CHU de
Toulouse,*

Pour avoir lu ma thèse et m'avoir fait l'honneur de présider ce jour mon jury de thèse.
Mes hommages respectueux.

Madame le Docteur Émilie BOUHSIRA,

*Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Parasitologie et Maladies Parasitaires,*

Pour m'avoir permis de faire partie de ce beau projet, et m'avoir encadrée tout du long de ce dernier. Pour vos conseils, votre écoute et votre implication, en plus de la confiance que vous m'avez accordée, veuillez recevoir mes remerciements les plus sincères.

Madame le Professeur Isabelle RAYMOND-LETRON,

*Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Histologie, Anatomie Pathologique,*

Pour avoir lu ma thèse et accepté le rôle d'assesseur, ainsi que votre intérêt porté à mon travail.

Sincères remerciements.

Madame le Docteur Corinne BARREAU,

Docteur au sein de l'unité de recherche du laboratoire STROMALab

Sans vous, et vos précieux conseils sur la transparisation des stomoxes, la thèse n'aurait pas été ce qu'elle est aujourd'hui. Pour votre temps et votre implication, je tiens à vous remercier sincèrement.

Madame Laetitia PIERUCCIONI,

*Ingénieur d'études au Centre d'Expertise et de Ressources Technologiques –
Unité RESTORE chez CNRS
Centre national de la recherche scientifique*

Je ne pense pas que cette thèse aurait vu le jour si vous n'aviez pas été là. Pour vos conseils, votre temps et votre gentillesse, je tiens à vous présenter mes remerciements les plus sincères.

Aux personnes sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour :

Madame le Docteur Hélène DANIELS,

Un grand merci pour votre implication dans cette thèse, et pour avoir pris du temps de nous prêter du matériel quand nous avons besoin. Sans cette main tendue, je ne pense pas que cette thèse aurait été celle qu'elle est aujourd'hui.

Monsieur Simon LACHAMBRE,

Pour votre implication dans mon manuscrit, et d'avoir pris le temps de m'aider à m'informer sur toute ma partie bibliographie, un immense merci.

Monsieur le Docteur Pierre-Louis HUYART,

Pour m'avoir guidé à commencer cette thèse, pour tous les conseils, que ce soit dans la bibliographie ou dans la rédaction, pour m'avoir aiguillé sur les images et la reconnaissance de certains organes, et enfin pour ta sympathie, mes sincères remerciements.

Monsieur Shukri SHARIF,

Pour votre disponibilité afin de me procurer des spécimens de mouches, ou encore à mes répondre à mes questions, un grand merci.

**Monsieur Jean-Michel LAGARDE, Madame Pascale BERNES-LASSERRE,
Madame Victoria RAMÉ, Monsieur Renaud MORIN,**

De l'entreprise d'Imactiv 3D

Un grand merci pour votre accueil si chaleureux, votre gentillesse et surtout pour le temps que vous avez passé à être disponibles pour les acquisitions, les animations et tous vos bons conseils. Merci infiniment.

Table des matières

I – INTRODUCTION	19
A - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE DU STOMOXE	19
1 - Importance économique	19
2 - Importance médicale	19
a - Rôle pathogène direct	19
b - Rôle pathogène indirect	20
B - LA MICROSCOPIE A FLUORESCENCE	21
1 - Principes et caractéristiques de l'émission par photoluminescence	22
a - Processus de photoluminescence	22
b - Caractéristique des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence d'une molécule	22
2 - Fluorescence primaire et secondaire	24
a - Choix d'une sonde fluorescente	25
b - Problèmes rencontrés lors de l'excitation d'une molécule	28
3 - Microscopes à fluorescence, principes, avantages et inconvénients	29
a - La microscopie confocale	29
b - La microscopie de fluorescence par excitation à deux photons	33
c - La microscopie à feuille de lumière	35
4 - La microscopie dans l'entomologie	37
C - PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON EN VUE D'UNE IMAGERIE 3D	38
1 - Bases physiques de la lumière	38
2 - Problème de transparence appliquée à la biologie et l'imagerie 3D	38
3 - Le blanchiment ou 'bleaching'	39
4 - La transparisation	39
5 - Protocoles de transparisation	39
D - OBJECTIFS ET PRÉSENTATION DU TRAVAIL	41
II - MATERIEL ET METHODE	43
A - ORIGINE DES STOMOXES D'ÉLEVAGE	43
B - PRÉPARATION DES STOMOXES	44
1 - Solvants et protocoles utilisés	44
2 - Microscopie confocale	46
3 - Choix de la durée des bains de blanchiment	46
4 - Observation des mouches après transparisation au microscope confocal	47
5 - Microscopie à feuilles de lumière	49
III - RESULTATS	51
A - MORPHOLOGIE EXTERNE DE L'IMAGO	51
1 - La tête	51
2 - Les yeux	51
3 - Les antennes	53
4 - Les pièces buccales	55
5 - Le thorax	58
6 - Les ailes	60
7 - Articulation des ailes avec le thorax	62
8 - Les pattes	63
9 - L'abdomen	67
B - MORPHOLOGIE INTERNE DE L'IMAGO	71
1 - Les muscles du vol	71
2 - L'appareil reproducteur femelle	75
3 - Le système nerveux central	77
4 - Le système digestif	78
5 - Le système respiratoire	92
IV – DISCUSSION	97
V – CONCLUSION	99

BIBLIOGRAPHIE..... 101

Table des illustrations

Illustration 1 - Illustration du confinement intrinsèque de la fluorescence par excitation à deux photons.....	34
Illustration 2 - Cage d'élevage de stomoxes adultes.....	43
Illustration 3 - Nourrisseur artificiel à membrane.....	44
Illustration 4 - Acquisition au microscope confocal des stomoxes non gorgés en fonction de la durée d'incubation du blanchiment.....	47
Illustration 5 - Acquisition au microscope confocal des stomoxes gorgés en fonction de la durée d'incubation du blanchiment.....	48
Illustration 6 - Acquisition du stomoxe J12 au microscope confocal en vue dorso-ventrale et ventro-dorsale.....	49
Illustration 7 - Coupe d'un œil composé de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J15, gorgé) transversale au microscope à feuille de lumière.....	52
Illustration 8 - Yeux de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue dorso-ventrale au microscope confocal	53
Illustration 9 - Yeux de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue ventro-dorsale au microscope confocal	53
Illustration 10 - Antennes segmentaires de <i>Stomoxys Calcitrans</i> en vue ventro-dorsale au microscope confocal.....	54
Illustration 11 - Représentation 3D des antennes de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue de face au microscope confocal.....	54
Illustration 12 - Représentation 3D des antennes de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue dorso-ventrale au microscope confocal.....	55
Illustration 13 - Coupe transversale des pièces buccales de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J12, non gorgé) au microscope à feuille de lumière.....	57
Illustration 14 - Pièces buccales de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue ventro-dorsale au microscope confocal.....	57
Illustration 15 - Thorax de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue dorso-ventrale au microscope confocal.....	59
Illustration 16 - <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue ventro-dorsale au microscope confocal.....	59
Illustration 17 - Aile mésothoracique droite de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue dorso-ventrale au microscope confocal.....	60
Illustration 18 - Aile mésothoracique droite de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue dorso-ventrale au microscope confocal.....	61
Illustration 19 - Zone d'insertion de l'aile de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue dorso-ventrale au microscope confocal.....	61
Illustration 20 - Zone d'insertion de l'aile de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue dorso-ventrale au microscope confocal.....	63
Illustration 21 - Patte P1 droite de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue dorso-ventrale au microscope confocal.....	64

Illustration 22 - Extrémité de patte de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue ventro-dorsale au microscope confocal	65
Illustration 23 - Reconstitution 3D de l'extrémité de la patte de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue ventrale au microscope confocal.....	65
Illustration 24 - Reconstitution 3D de l'extrémité de la patte de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue dorsale au microscope confocal	66
Illustration 25 - Reconstitution 3D de l'extrémité de la patte de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue latérale au microscope confocal.....	66
Illustration 26 - Abdomen de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J15) en vue dorso-ventrale au microscope confocal.....	67
Illustration 27 – Observation de l'abdomen de <i>Stomoxys calcitrans</i> gorgé au microscope confocal en vue latérale	68
Illustration 28 - Appareil génital femelle de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue ventro-dorsale	69
Illustration 29 - Appareil génital mâle de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue ventro-dorsale	69
Illustration 30 – Représentation 3D du thorax de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue dorso ventrale au microscope confocal	73
Illustration 31 – Arrêt sur image d'une vidéo d'une représentation 3D du thorax de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue de trois-quart au microscope confocal.....	74
Illustration 32 – Coupes sagittales du thorax de <i>Stomoxys calcitrans</i> allant du plus ventral au plus dorsal au microscope confocal	74
Illustration 33 – Acquisition de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J8, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence des différents types de muscles thoraciques	75
Illustration 34 - Coupe sagittale de l'abdomen de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J12, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence d'un ovaire	76
Illustration 35 - Coupe sagittale de la tête de <i>Stomoxys calcitrans</i> , (J15, gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence du cerveau.....	78
Illustration 36 – Acquisitions de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J15, gorgé) au microscope à feuilles de lumière avec mise en évidence des glandes salivaires	79
Illustration 37 - Coupe sagittale de l'abdomen de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J15, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence des glandes salivaires	80
Illustration 38 - Coupe transversale des pièces buccales de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J12, non gorgé) au microscope à feuille de lumière	82
Illustration 39 - Coupe sagittale de la tête de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J8, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence du pharynx.....	82
Illustration 40 - Coupe sagittale de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J15, gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence de l'œsophage	83
Illustration 41 - Coupe sagittale au microscope à feuille de lumière de la tête et du thorax de <i>Stomoxys calcitrans</i>	83
Illustration 42 - Coupes sagittales de l'abdomen de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J8, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence de l'intestin moyen.....	85

Illustration 43 - Coupes sagittales de l'abdomen de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J15, gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence de l'intestin moyen.....	87
Illustration 44 - Intestin moyen de <i>Stomoxys calcitrans</i> gorgé au microscope confocal.....	88
Illustration 45 - Coupe sagittale de l'abdomen de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J15, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence de l'intestin postérieur.....	89
Illustration 46 - Coupe sagittale de l'abdomen de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J15, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence de l'anous	90
Illustration 47 - Coupe sagittale de l'abdomen de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J8, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence des tubes de Malpighi.....	91
Illustration 48 - Coupe sagittale de l'abdomen de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J15, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence des tubes de Malpighi.....	92
Illustration 49 - Abdomen de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue ventro-dorsale au microscope confocal.....	93
Illustration 50 - représentation 3D du thorax de <i>Stomoxys calcitrans</i> , en vue ventro-dorsale au microscope confocal, avec son système trachéal	94
Illustration 51 - Coupe sagittale de l'abdomen de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J12, non gorgé) au microscope à feuille de lumière et mise en évidence de son système respiratoire	95
Illustration 52 - Coupe médiane de l'abdomen de <i>Stomoxys calcitrans</i> (J12, non gorgé) au microscope à feuille de lumière et mise en évidence de son système respiratoire	95

Table des figures

Figure 1 - Diagramme de Jablonski	22
Figure 2 - Loi de Stokes M	23
Figure 3 - Comparaison de spectres d'émission et d'excitation.....	24
Figure 4 - Autofluorescence de l'arbre d'Arbousier	24
Figure 5 - Fibroblastes d'embryon de souris, avec ADN en bleu, filaments d'actine en rouge	25
Figure 6 - Schéma de l'immunofluorescence directe et indirecte.....	27
Figure 7 - Photo prise au microscope à fluorescence avec la technique de FISH	27
Figure 8 - Schéma du microscope confocal	29
Figure 9 - Images en fonctions de l'ouverture/fermeture du pinhole.....	30
Figure 10 - Tableau regroupant différentes sources de laser en fonction de leurs raies d'excitation et de leurs puissances.....	31
Figure 11 - Schéma d'un spectromètre optique	32
Figure 12 - Principe de la microscopie biphotonique.....	33
Figure 13 - Différence entre laser continu et laser pulsé.....	34
Figure 14 - Principe de la microscopie à feuille de lumière.....	36
Figure 15 - Différence d'illumination en microscopies confocale, biphotonique et à feuille de lumière	37
Figure 16 - Cerveau de souris transparaïsé par la technique Clarity.....	40
Figure 17 - Structure d'un œil composé	52
Figure 18 - Détail des pièces buccales de <i>Stomoxys calcitrans</i> et proboscis en coupe transversale	56
Figure 19 - Insertion de l'aile avec le thorax d'un insecte.....	62
Figure 20 - Oviscapte de <i>Stomoxys calcitrans</i>	70
Figure 21 - Morphologie généralisée des muscles de la puissance indirecte chez les mouches, basée principalement sur la description de <i>D. repleta</i>	72
Figure 22 - Muscles directionnels du thorax	72
Figure 23 - Ovaire de <i>Stomoxys calcitrans</i>	76
Figure 24 - Cerveau d'insecte.....	77
Figure 25 – Position anatomique des glandes salivaires de <i>Stomoxys calcitrans</i>	79
Figure 26 - Anatomie de l'intestin moyen de <i>Stomoxys calcitrans</i>	81
Figure 27 - Système digestif de <i>Stomoxys calcitrans</i>	81
Figure 28 - Régions de l'intestin moyen de <i>Stomoxys calcitrans</i>	84

Figure 29 - Représentation schématique du jabot et de l'intestin moyen au cours de la digestion.....	87
Figure 30 - Rectum et papilles rectales de <i>Stomoxys calcitrans</i>	89
Figure 31 - Tubes de Malpighi de <i>Stomoxys calcitrans</i>	91
Figure 33 - Organisation du système trachéen d'un diptère	94

I – Introduction

Les stomoxes sont des insectes hématophages, parasites des animaux de rente et des chevaux principalement. Appartenant au groupe des diptères, le genre des stomoxes compte 18 espèces dont, *Stomoxys calcitrans*, unique espèce cosmopolite. Les 17 autres se répartissent en Asie et en Afrique (Baldacchino et al. 2013).

Les stomoxes adultes mâles et femelles sont hématophages et sont considérés comme des parasites majeurs en élevage bovin laitier et allaitant. Ils sont à l'origine de pertes économiques notables, et sont également vecteurs de nombreux agents pathogènes, comme nous allons le développer plus loin.

A - Synthèse bibliographique du stomoxe

1 - Importance économique

La spoliation sanguine et le stress engendré par les piqûres douloureuses des stomoxes, en lien avec leur appareil piqueur rigide et sclérifié, sont responsables d'une perte de poids et d'une baisse de production lactée conséquentes. Chez les bovins à viandes, on observe des différences de gains moyens quotidiens (G.M.Q.) allant de 20g à 600g (Campbell et al. 1977 ; Berry et Campbell, 1983). Pour les bovins laitiers, une baisse de production de 0,7% par stomoxe et par mois a été montrée (Bruce et Decker, 1958). Ces nuisances directes peuvent avoir un impact économique considérable sur le rendement des filières bovines : au Brésil, les pertes liées à la présence de stomoxes en élevage sont estimées à 0.34 millions de dollars par an, et à 6.79 millions de dollars au Mexique (Grisi et al. 2014 ; Rodríguez-Vivas et al. 2017). Aux États-Unis, elles peuvent s'élever jusqu'à 400 millions de dollars pour la filière viande et plus d'un milliard pour la filière lait (Taylor et al. 2012 ; Taylor et Berkebile 2006).

2 - Importance médicale

a - Rôle pathogène direct

Les stomoxes harcèlent les animaux lors de leur repas de sang. Ce comportement et les piqûres douloureuses répétées sont à l'origine de stress, de lésions multiples et de douleurs, en particulier au niveau des membres, zones préférentielles de piqûres. Les animaux attaqués tentent de s'en protéger, en se regroupant, par des mouvements de tête, des battements de queue, des trémulations du muscle peaucier ... Ces mouvements de défense constituent une perte d'énergie notable, et sont à l'origine d'une diminution du temps de pâturage. Aussi, le stress

engendré par les piqûres des stomoxes sont responsables de perturbations physiologiques, comme l'augmentation du rythme cardiaque ou de la fréquence respiratoire (Schwinghammer et al. 1987).

b - Rôle pathogène indirect

Pour la plupart de ces agents, les stomoxes assurent une transmission dite « mécanique » et immédiate, sans réplication ou modification de l'agent pathogène transmis. Les pièces buccales semblent fonctionner comme une « seringue souillée », assurant la transmission entre un hôte infecté, et un hôte sensible. Les mouvements de défense de l'hôte interrompent généralement le repas sanguin des stomoxes, qui afin de terminer leur repas, attaquent un hôte à proximité, favorisant ainsi une potentielle transmission. Il semblerait également que les stomoxes puissent assurer une transmission plus retardée d'un agent pathogène, en conservant du sang porteur d'un pathogène dans leur jabot, régurgité lors d'un repas ultérieur (Baldacchino et al. 2013). Cette transmission retardée pourrait assurer une transmission d'agents pathogènes entre troupeaux.

Les stomoxes sont ainsi des vecteurs d'intérêt vétérinaire notable. Parmi les agents pathogènes transmis, on peut citer la bactérie *Anaplasma marginale*, le charbon bactérien, le protozoaire *Besnoitia besnoiti*, ou encore *Trypanosoma vivax*, et également le virus de la dermatose nodulaire contagieuse bovine, ou le virus Neethling (Rapport de l'ANSES, 2017).

Au cours de différents travaux, il a été confirmé que les stomoxes jouent le rôle de vecteurs mécaniques de différents agents pathogènes comme le protozoaire *Besnoitia besnoiti*. Après infection expérimentale, les mouches restent porteuses du protozoaire pendant 24h, la majorité de l'agent pathogène étant éliminée dans les 12 premières heures post-infection et persiste jusqu'à 96h (Sharif, 2018). Plus récemment, il a été montré qu'après infection expérimentale de *S. calcitrans* par le virus de la dermatose nodulaire contagieuse bovine (ou DNCB), une régurgitation par la salive et une élimination dans les fèces était possible, et la présence de particules virales infectieuses a été détectée jusqu'à 48h après le repas de sang. Le virus, lui, est présent pendant au moins trois jours chez les mouches (Paslaru et al. 2021). Ainsi, il semble que quelle que soit la nature de l'agent infectieux, les stomoxes restent porteurs pendant une durée minimale de 24h post-infection. Cependant, les modalités précises du portage et de la transmission mécanique ne sont pas entièrement connues et certains paramètres

nécessitent d'être confirmés (rôle du jabot dans le stockage d'un agent pathogène, permettant, après régurgitation, une transmission retardée, rôle des glandes salivaires, caractère infectieux de l'agent pathogène transmis ...). Ainsi, il est fondamental de préciser les structures anatomiques impliquées dans le stockage de l'agent pathogène et de sa cinétique chez le stomoxe afin de mieux maîtriser les modalités de vectorisation mécanique, encore méconnue. Nous envisageons dans ce travail de thèse l'utilisation de la microscopie à fluorescence dans l'étude de l'anatomie des stomoxes.

Le paragraphe suivant est ainsi consacré à la description de la microscopie à fluorescence et à ses champs d'application.

B - La microscopie à fluorescence

Développée au début du XXe siècle, la microscopie à fluorescence a connu une véritable avancée depuis une trentaine d'année avec l'arrivée et la performance des ordinateurs, de nouvelles technologies de détection et de sondes fluorescentes. Elle devient finalement un outil indispensable à la recherche biologique et médicale pour la localisation *in situ* de structures intracellulaires, de leur suivi spatiotemporel et de la détection de leurs interactions. En effet, la microscopie optique en fond clair permet d'observer de nombreux types d'échantillons, mais présente aussi de nombreux inconvénients comme l'observation de structures quasi invisibles et dont la coloration manque de spécificité (cellulose, bactéries ...). La fluorescence offre une grande gamme d'outils permettant de marquer spécifiquement un élément, un organe ou une protéine, avec un fort contraste puisque l'objet s'illumine sur un fond noir, et facilite donc la détection des structures d'intérêts. Cependant, la résolution de la microscopie à fluorescence conventionnelle se dégrade fortement pour des échantillons épais (à partir de 10 micromètres) et/ou diffusants, et c'est pour s'affranchir de cette limite qu'ont été développées plusieurs techniques d'acquisition par sectionnement optique, afin d'analyser des échantillons volumiques : la microscopie confocale à balayage laser, l'excitation biphotonique et la microscopie à fluorescence à feuille de lumière.

1 - Principes et caractéristiques de l'émission par photoluminescence

a - Processus de photoluminescence

Par définition, la photoluminescence est le phénomène qui se traduit par l'émission de photons par une molécule qui a été irradiée par un faisceau lumineux. Elle englobe deux processus : la fluorescence et la phosphorescence (Figure n°1). La molécule capable d'émettre de la lumière de fluorescence, appelée fluorochrome, se trouve dans un état excité par suite de l'absorption d'un photon. Elle retourne ensuite au plus bas niveau d'énergie de l'état excité par « relaxation vibrationnelle ». Puis, la molécule revient dans un état fondamental en émettant des photons, c'est ce qu'on appelle la fluorescence. Dans le cas de la phosphorescence, principe que nous ne détaillerons pas ici, la transition s'effectue entre deux états d'énergie de multiplicité de spin différente.

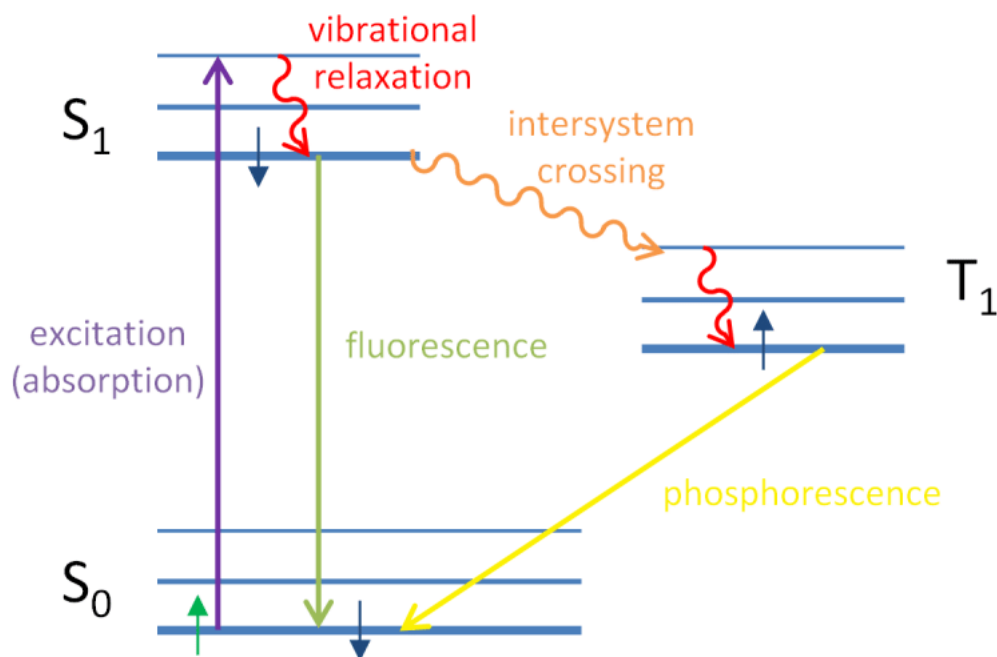


Figure 1 - Diagramme de Jablonski (d'après Eck, 2014)

b - Caractéristique des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence d'une molécule

Les électrons ne sont pas tous issus des mêmes sous-couches électroniques et ne seront pas non plus sur la même couche ou sous-couche électronique une fois excités. De même, ils ne seront pas sur la même sous-couche électronique après leur relaxation. Il n'existe donc pas une

valeur mais une gamme de valeurs d'énergie/longueur d'onde qui sera absorbée ou émise par un fluorochrome. Pour chaque fluorochrome, on peut établir un spectre de longueurs d'onde capable de l'exciter et un spectre de longueurs d'onde de fluorescence qui sont définis par plusieurs caractéristiques : premièrement, la gamme de longueurs d'onde d'émission λ_E est toujours supérieure à la gamme de longueurs d'onde d'absorption λ_A . Ce phénomène est appelé « déplacement de Stokes » (Figure n°2).

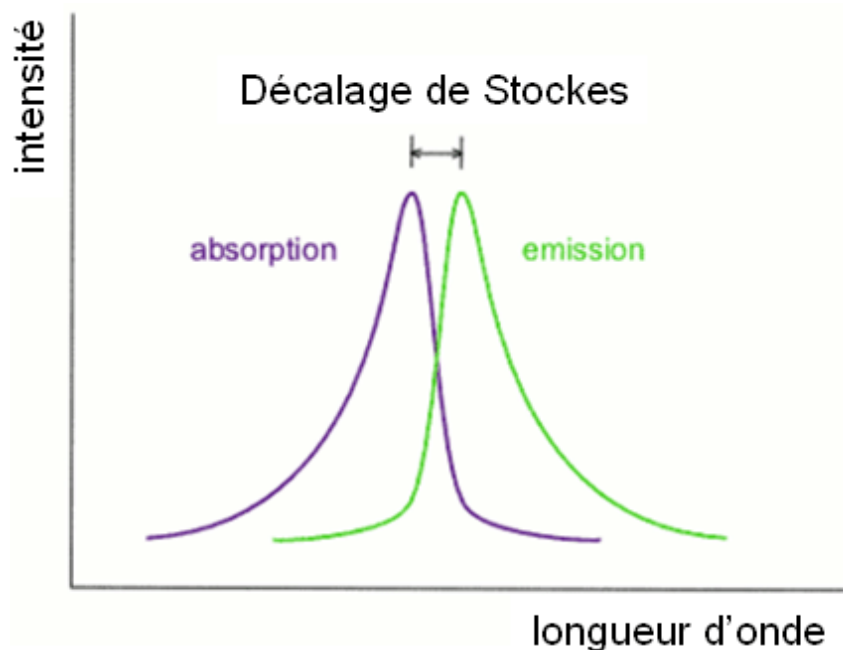


Figure 2 - Loi de Stokes M (d'après Grosjean et Leh, 2011)

Le spectre d'émission de fluorescence est approximativement une image inversée (effet miroir) du spectre d'absorption. L'effet « miroir » entre spectres d'excitation et d'émission n'est pas toujours observé : des dissimilitudes entre les deux spectres peuvent révéler l'existence de plusieurs formes de la molécule considérée, caractérisées par des longueurs d'onde d'absorption et/ou d'émission différentes. Aussi, une longueur d'onde d'absorption (excitation) et une longueur d'onde d'émission (fluorescence) maximales, sont spécifiques pour chaque fluorochrome (Figure n°3). Lorsqu'on illumine (excite) le fluorochrome à une longueur d'onde correspondant à son maximum d'absorption, le fluorochrome émet sous tout son spectre d'émission. La longueur d'onde pour laquelle l'émission est maximale reste la même et on a en retour une intensité de fluorescence maximale. Si, en revanche, on l'excite à une longueur d'onde différente de son maximum d'absorption, le fluorochrome émet aussi sous tout son spectre d'émission, le maximum d'émission ne change pas, en revanche l'intensité de

fluorescence est plus faible. Il est donc important d'optimiser le choix des filtres d'excitation et d'émission afin de récupérer le plus possible de fluorescence.

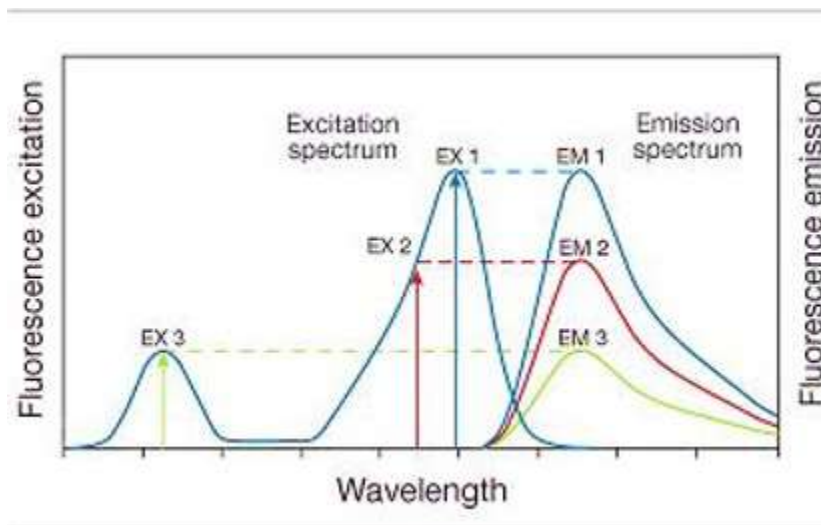


Figure 3 - Comparaison de spectres d'émission et d'excitation (d'après Aurélie Le Ru, 2014)

2 - Fluorescence primaire et secondaire

En fluorescence, il existe deux types de structures. La première est « autofluorescente » et émet donc une fluorescence par elle-même. C'est le cas, par exemple, de la chlorophylle (Figure n°4). D'autres structures, comme l'ADN, doivent être combinées à des fluorochromes pour pouvoir être observées. Il existe de nombreux fluorochromes ayant chacun une gamme de longueurs d'onde d'excitation et d'émission différente. C'est donc souvent possible de marquer spécifiquement l'élément que l'on souhaite suivre avec un fluorochrome. C'est le cas du fluorochrome DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), molécule fluorescente capable de se fixer à l'adénine ou la thymine de l'ADN, et qui fluoresce en bleu (Figure n°5).

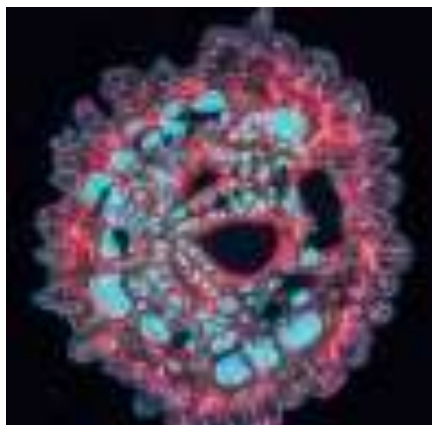


Figure 4 - Autofluorescence de l'arbre d'Arbousier (phiv.cirad.fr)

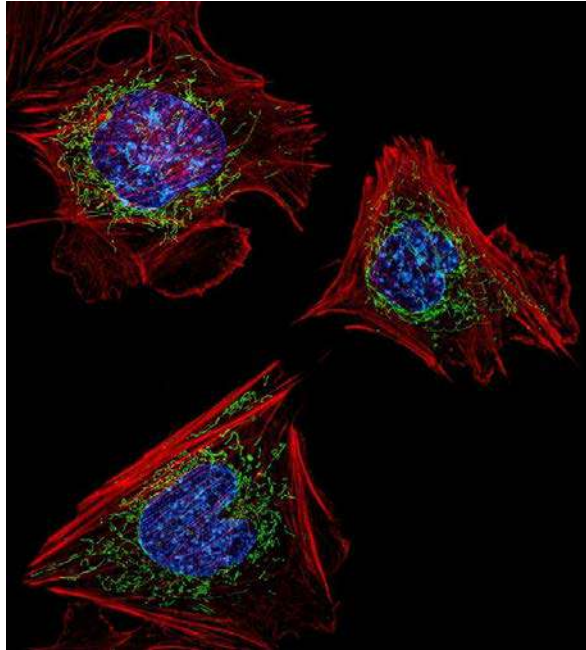


Figure 5 - Fibroblastes d'embryon de souris, avec ADN en bleu, filaments d'actine en rouge (futura-sciences.com)

a - Choix d'une sonde fluorescente

Le choix d'un fluorochrome doit permettre d'obtenir un signal spécifique, durable et fort. Dans la cellule vivante, le fluorochrome doit permettre de respecter autant que possible les fonctions cellulaires (Hawes et Satiat-Jeunemaitre, 2001). Le marquage des cellules par des fluorochromes permet d'accéder à des informations arbitrairement classées en deux catégories : les paramètres fonctionnels et les paramètres structuraux.

Les paramètres fonctionnels

Ils reflètent des modifications rapides dans des cellules vivantes, incluant aussi bien les activités enzymatiques, comme des flux ioniques, ou encore la perméabilité membranaire (Brown et Poujol, 2013).

Les paramètres structuraux

Ils correspondent aux macromolécules ou à un ensemble de constituants (ADN, protéines du cytosquelette...) ou encore à des molécules constitutives de tailles plus faibles mais en quantité suffisamment importante et significative (antigène membranaire, cholestérol ...).

Contraintes liées à l'excitation et à l'émission

Il existe des situations où deux fluorochromes sont excités par une même source mais peuvent se distinguer aisément grâce à des spectres d'émissions différents. On pourra aussi provoquer une excitation simultanée des deux fluorochromes par deux fenêtres spectrales (d'une lampe) ou deux raies (de lasers) distinctes. L'efficacité et la spécificité du signal dépendent de la bonne adéquation entre un fluorochrome spécifique et les sources lasers utilisées. De la même façon, en présence de plusieurs fluorochromes, des fuites optiques à travers des filtres d'analyse respectifs peuvent apparaître à cause du chevauchement de leurs spectres d'émission. On peut contourner ce problème en choisissant le plus judicieusement possible les fluorochromes, avec des spectres d'émission éloignés, on alors on pourra essayer d'utiliser des lasers avec des raies permettant une meilleure excitation spécifique pour chaque fluorochrome, ou encore en excitant nos deux fluorochromes séparément de façon séquentielle (Brown et Poujol, 2013).

Techniques de marquage

De nombreuses techniques de marquage peuvent être utilisées. Le marquage simple se fait par affinité entre un fluorochrome et la molécule à marquer. Il existe ensuite l'immunomarquage (ou immunofluorescence) direct ou indirect. Pour l'immunofluorescence directe, on utilise un anticorps dirigé contre la molécule recherchée, appelée antigène. Cet anticorps est couplé à un fluorochrome. L'immunofluorescence indirecte (IFI) est basée sur l'utilisation successive de deux anticorps : le premier anticorps de type monoclonal reconnaît spécifiquement la protéine d'intérêt. Le second anticorps, de type polyclonal, est dirigé contre l'anticorps primaire (le premier). C'est ce deuxième anticorps qui sera marqué par un fluorochrome (Figure n° 6) (Odell et Cook, 2013 ; P. Letonturier, 2007).

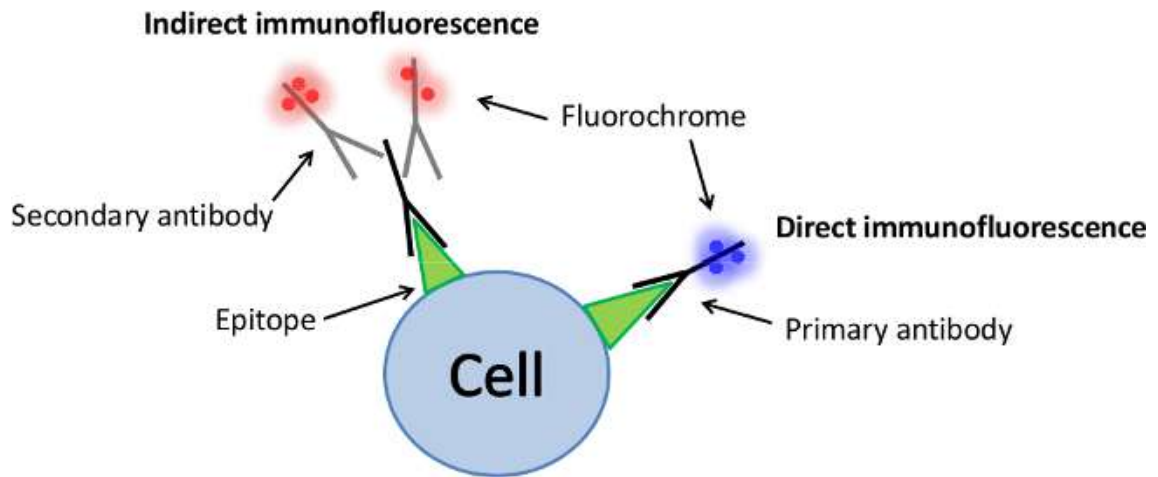


Figure 6 - Schéma de l'immunofluorescence directe et indirecte (d'après Allaire et al., 2015)

Une autre technique très répandue dans l'étude génétique, reprenant le principe d'immunofluorescence, est la technique du FISH (*fluorescent in situ hybridization*). Elle permet, à partir d'un brin d'ADN, de cibler et de marquer des séquences nucléotidiques. La double hélice d'ADN tout d'abord va être dénaturée par chauffage. Puis une sonde d'ADN complémentaire de l'ADN va être incorporée à l'ADN cible, avec sur elle une molécule de reconnaissance. Enfin, cette molécule de reconnaissance va être reconnue par un anticorps muni d'un fluorochrome (Figure n°7) (Romana et Malan, 2011).

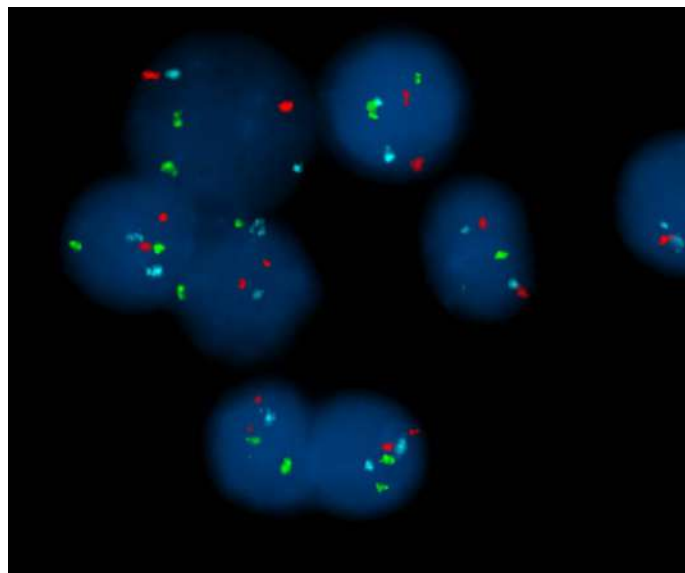


Figure 7 - Photo prise au microscope à fluorescence avec la technique de FISH (Service d'hématologie du laboratoire d'oncogénomique de Lausanne, 2021)

Enfin, il est possible d'utiliser des protéines fluorescentes comme la GFP (*Green Fluorescent Protein*) pour étudier des fonctions biologiques sur des cellules ou tissus fixés mais

aussi pour réaliser des mesures dynamiques sur des cellules en culture ou organismes vivants. La protéine fluorescente peut être utilisée comme gène rapporteur. En effet, associée à un gène d'intérêt, elle permet l'observation directe de l'expression de ce gène dans la cellule. Le gène codant la protéine GFP est incorporé dans le génome de l'organisme, dans la région du gène qui code la protéine d'intérêt, et qui sera ainsi contrôlée par la même séquence régulatrice. Dans les cellules où le gène sera exprimé et la protéine d'intérêt produite, la GFP sera synthétisée au même moment. Ainsi, ces cellules deviendront fluorescentes tandis que celles n'exprimant pas le gène d'intérêt resteront inertes sous la lumière de la microscopie à fluorescence (Georget et al. 1999 ; A. Khetrupal, 2017).

b - Problèmes rencontrés lors de l'excitation d'une molécule

Suite à son irradiation, la molécule à l'état excité a tendance à être plus réactive d'un point de vue chimique par rapport à son état fondamental. Des réactions irréversibles peuvent alors se produire et donner naissance à des photos-produits, qui sont soit non fluorescentes, soit caractérisées par des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence différents de ceux de la molécule initiale. Ces réactions impliquent une perte progressive d'intensité de fluorescence émise par un échantillon, c'est ce qu'on appelle le photo-blanchiment. Certains photo-produits peuvent avoir des effets néfastes sur un milieu biologique vivant, c'est ce qu'on appelle la photo-toxicité.

Un autre problème rencontré est la saturation de l'état excité d'une molécule à cause d'un rayonnement trop intense. Ce processus n'est pas nécessairement destructif pour cette dernière, mais peut conduire à des erreurs d'interprétation des résultats obtenus car en effet, la variation d'intensité de fluorescence émise dans ces conditions ne varie pas linéairement avec l'énergie incidente. Enfin, l'excitation d'une molécule par un rayonnement intense est à l'origine de réactions thermiques, dépendantes des capacités d'absorption des molécules. Ces effets ont donc un effet destructif sur la molécule mais aussi sur son environnement (Guiot, 2001).

Ainsi, l'excitation d'une molécule à l'origine de sa fluorescence par une radiation lumineuse peut conduire à une dégradation de la molécule absorbante et de son environnement local. Ces processus de photo-dégradation dépendent donc de trois choses : de l'énergie incidente, du fluorophore utilisé et de la durée d'irradiation. Ces 3 critères sont donc à prendre

en compte et à déterminer le plus précisément possible à l'avance, pour s'affranchir au mieux des effets de photo-dégradation.

3- Microscopes à fluorescence, principes, avantages et inconvénients

a - La microscopie confocale

Principe du microscope confocal

Le microscope confocal, inventé en 1953 par Marvin Minsky (Minsky, 1953) et breveté en 1957, est un microscope optique dont la propriété est de réaliser des images de très faible profondeur de champ (environ 400 nm) appelées « sections optiques ». Son principe consiste à focaliser, par l'intermédiaire d'un objectif et d'un jeu de miroirs (miroirs dichroïques et de balayage), un faisceau laser qui va exciter les fluorochromes en un point de l'échantillon. Ensuite, par le biais d'un photomultiplicateur, le signal lumineux émis en ce point va être récupéré par l'ordinateur, digitalisé et, enfin, affiché sur le moniteur (Figure n° 8).

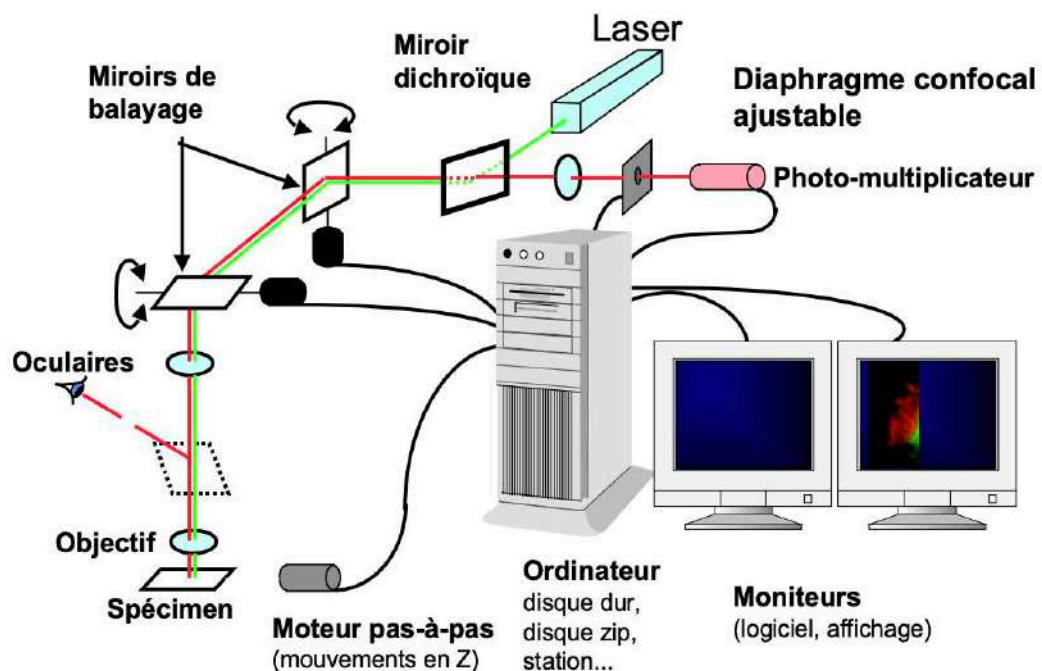


Figure 8 - Schéma du microscope confocal (d'après Cochard, 2014)

Importance et rôle du pinhole

La particularité du microscope par fluorescence, par rapport à un microscope optique classique, est la présence d'un diaphragme devant le photomultiplicateur, le « pinhole ». Ce dernier joue un rôle essentiel pour contrôler la résolution spatiale. Généralement, il est constitué d'un diaphragme à iris permettant d'ajuster le volume analysé (l'épaisseur de la tranche optique) (Figure n° 9). Ouvert au maximum, l'image est floue, et plus le diaphragme se ferme, plus on obtiendra une image nette (Cochard, 2014).

L'épaisseur de la tranche optique (en μm) varie en fonction de l'ouverture du diaphragme confocal. En dessous d'une certaine valeur, la fermeture du diaphragme n'entraîne plus d'amélioration (dépendant de la résolution axiale du système), mais produit une perte d'intensité lumineuse.

Le signal épuré reçu est amplifié dans le photomultiplicateur (PMT), traité et numérisé par ordinateur. L'image est ainsi construite point par point par balayage selon le plan (X,Y).

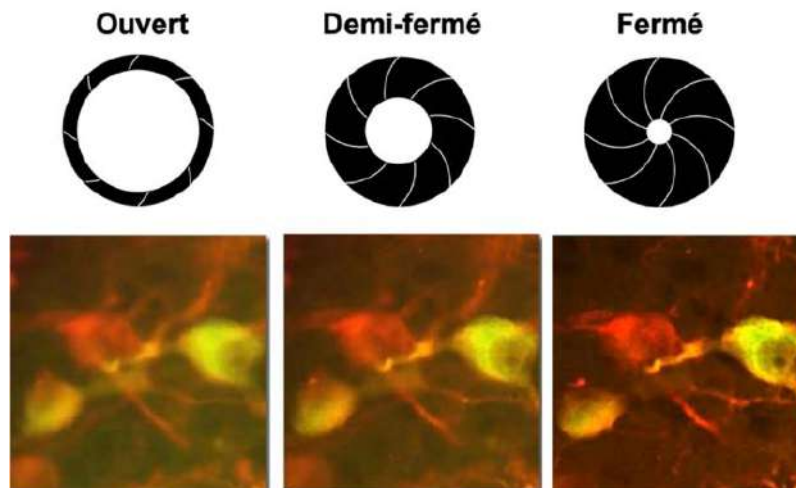


Figure 9 - Images en fonctions de l'ouverture/fermeture du pinhole (d'après Cochard, 2014)

Une platine motorisée déplace le spécimen étudié selon l'axe Z permettant la saisie de différents plans optiques dans l'épaisseur de l'objet. Ainsi, ces plans récupérés par l'ordinateur permettent d'avoir une image en 3D du spécimen.

Éclairage laser

Initialement, les microscopes confocaux étaient équipés de différents types de lasers à gaz qui fournissent une lumière monochromatique et intense, d'excitation ponctuelle). Aujourd'hui les lasers à gaz sont de plus en plus remplacés par des diodes lasers, de coût moindre et dont l'espérance de vie est plus élevée (Figure n°10). Aussi, la plupart des microscopes confocaux actuels combinent plusieurs sources lasers différentes.

Lasers	Abrev.	Raies d'excitation (nm)	Puissance (mW)
• Diode UV		405	20
• Argon	Ar	458 476 488 514	5 5 20 20
• Helium-Neon	He-Ne	543	1,2
• Diode	DPSS	561	10
• Helium-Neon	He-Ne	633	10

Figure 10 - Tableau regroupant différentes sources de laser en fonction de leurs raies d'excitation et de leurs puissances

(d'après Cochard, 2014)

Détection de multi-spectrale

L'examen de plusieurs sondes fluorescentes requiert donc la reconnaissance du signal de chaque sonde, souvent simultanément, ce qui nécessite donc une différence entre les spectres d'excitation et d'émission. Anciennement, des miroirs dichroïques aux caractéristiques appropriées étaient placés sur les trajets optiques, permettant la séparation des différentes longueurs d'ondes. Aujourd'hui, les constructeurs proposent différentes solutions pour mieux séparer les signaux émis et analyser de manière fiable des préparations colorées simultanément par plusieurs sondes. Ils utilisent pour cela un spectromètre optique (Figure n° 11), utilisant des prismes et des sliders (miroirs mobiles). Ainsi, on peut réaliser une analyse spectrale du fluorochrome étudié, ou limiter l'émission à une plage de longueur d'onde précise (Cochard, 2014).

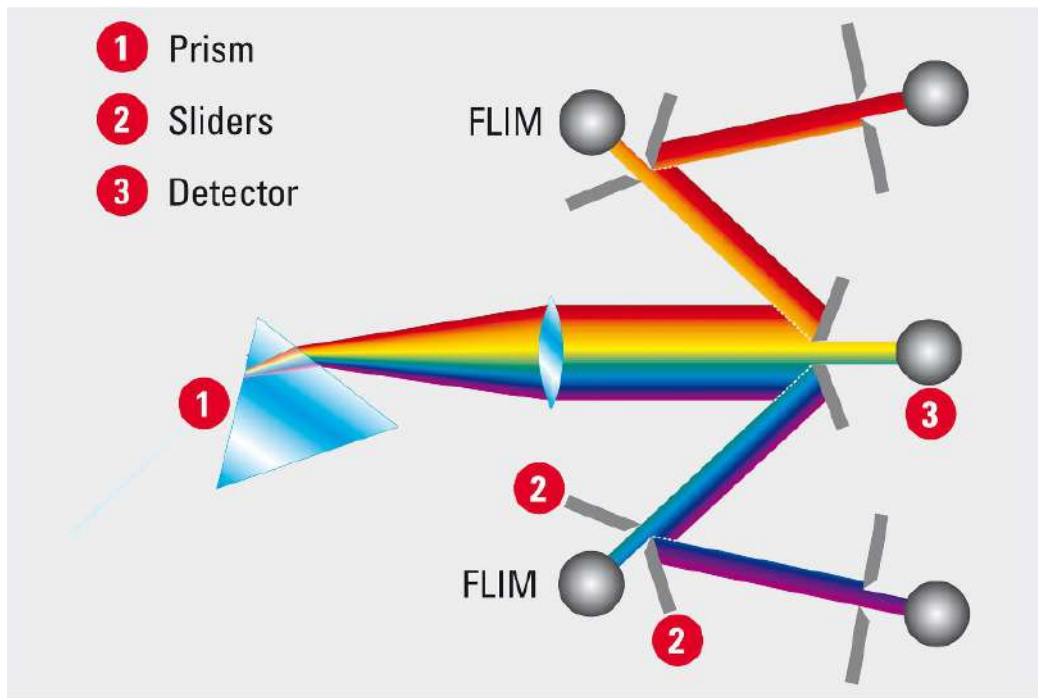


Figure 11 - Schéma d'un spectromètre optique (d'après Borlinghaus, 2012)

Avantages & inconvénients

Les avantages de ce microscope sont tout d'abord sa résolution accrue, associée à sa capacité d'étudier un objet épais grâce à son balayage en Z. Il est ainsi possible d'obtenir des images 3D de grande résolution. Enfin, ce microscope permet une analyse en temps réel de phénomènes dynamiques.

En revanche, cette technique de microscopie par fluorescence crée des photo-dommages cellulaires dans toute l'épaisseur de la préparation, même les plans hors zones d'étude. En effet, étant donné que les molécules étudiées ont un fort coefficient d'absorption dans l'ultraviolet et le domaine du visible, la dégradation (photo-toxicité, photo-blanchiment- saturation, échauffement...) des échantillons vivants est très rapide. Aussi, des pertes sont dues à l'utilisation du « pinhole ». En effet ce dernier marche comme un diaphragme, ainsi son diamètre doit être judicieusement choisi, et l'alignement du montage doit être parfaitement réalisé pour minimiser ces pertes. De plus, la plupart des composants biologiques ont des coefficients d'absorption élevés dans le domaine du visible et de l'ultraviolet, ainsi la profondeur de pénétration dans des échantillons biologiques est très limitée (<50 micromètres). Enfin, la vitesse d'acquisition est lente avec cette technique, autant à cause du scan de

l'échantillon, d'autant plus s'il y a de la multi-couleur, que l'acquisition sur l'axe Z (Guiot, 2001).

b - La microscopie de fluorescence par excitation à deux photons.

Principe

La microscopie à fluorescence par excitation à deux photons est une technique récente, utilisée pour la première fois en 1990 (Denk et al. 1990). Globalement, son principe est similaire à celui du microscope confocal, mais le laser d'excitation visible ou UV est remplacé par un laser impulsionnel femto seconde émettant dans l'infrarouge. En effet, il est possible pour un atome ou une molécule d'absorber « simultanément » deux photons, ce qu'on appelle l'absorption à deux photons (Figure n° 12).

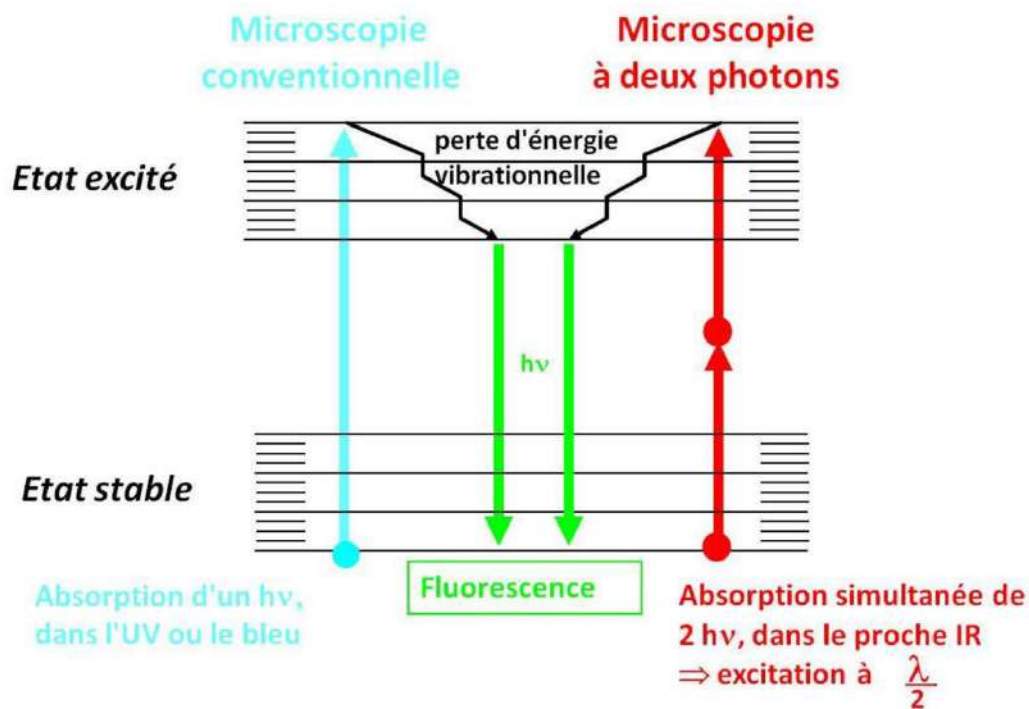


Figure 12 - Principe de la microscopie biphotonique (d'après Cochard, 2014)

Une intensité lumineuse très grande est nécessaire afin que la probabilité soit non négligeable et que deux photons passent près de l'atome ou de la molécule à exciter dans un

laps de temps suffisamment court (10^{-16} s) pour que leurs actions s'additionnent. C'est pourquoi des impulsions de très courtes durées sont nécessaires (Figure n°13) afin d'atteindre des intensités suffisantes à l'observation de ce phénomène (Dufour et al. 2006).

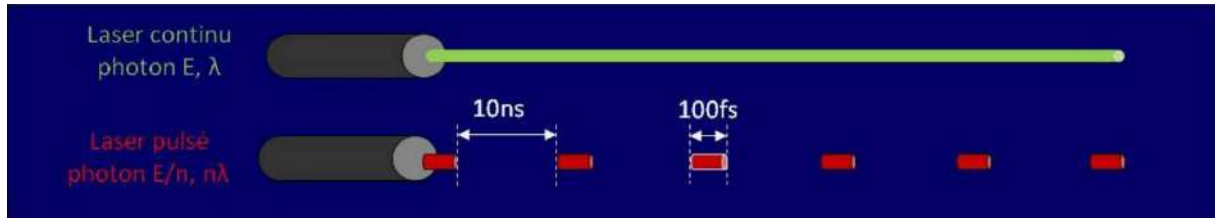


Figure 13 - Différence entre laser continu et laser pulsé (d'après Cochard, 2014)

Ainsi l'émission de fluorescence n'a lieu qu'au point où la densité de photons est la plus élevée, autrement dit, la fluorescence n'est excitée qu'au voisinage du point focal de l'objectif du microscope (Illustration n°1).

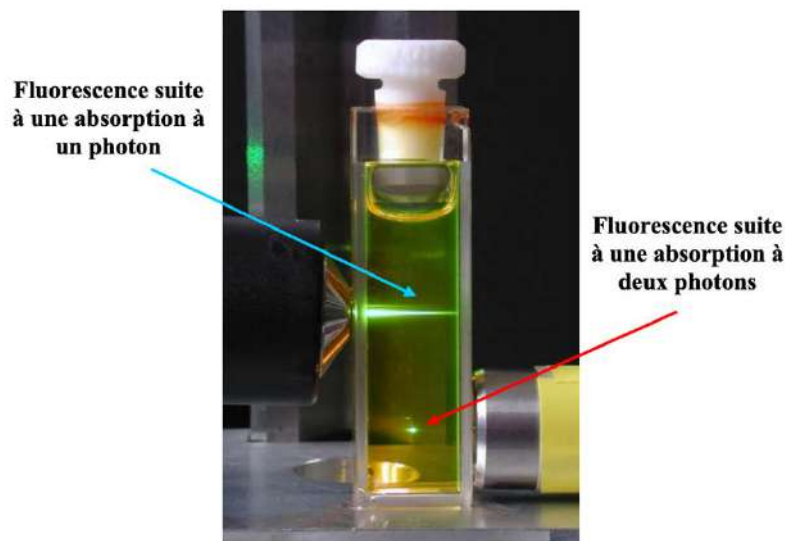


Illustration 1 - Illustration du confinement intrinsèque de la fluorescence par excitation à deux photons (d'après Guiot, 2001)

Avantages & inconvénients

C'est par ce système de nouveaux laser que le microscope par fluorescence biphotonique détient d'excellentes résolutions spatiales dans les trois dimensions, et devient vite une alternative à la microscopie confocale, avec des avantages supplémentaires (Brakenhoff et al. 1996 ; Köning et al. 1996). Premièrement, il n'y a peu voire pas de bruit de fond. En effet, la

production de fluorescence ne se fait qu'au point focal et, ainsi, aucun signal parasite ne provient des plans inférieurs et supérieurs au plan focal.

Ensuite, les longueurs d'onde d'émission et d'excitation sont bien séparées. En effet, la longueur d'onde d'excitation est quasiment le double de la longueur d'onde d'émission, puisqu'elle met en jeu non pas un mais deux photons. Il est donc très facile de séparer efficacement le signal de fluorescence émis du rayonnement excitateur incident au moyen de filtres appropriés, ce qui n'est pas toujours le cas pour le microscope confocal. Cette technique présente aussi un avantage au niveau de la profondeur de pénétration (jusqu'à 1mm), puisque les coefficients d'absorptions dans la majorité des composants biologiques sont plus faibles dans l'infrarouge que dans l'ultraviolet. Enfin, le principal avantage du microscope de fluorescence par excitation biphotonique est la limitation des dommages (photo-blanchiment, effets thermiques, création de photo-produits, photo-dégradation) au point focal, due à la localisation de l'excitation. Néanmoins, la question de savoir si le microscope biphotonique n'est pas plus destructeur au point focal en raison de de l'utilisation de lasers pulsés à haute puissance n'est pas totalement résolue. Un des principaux inconvénients de ce microscope est son prix, en effet le femto laser à un coût bien supérieur aux lasers utilisés pour les microscopes confocaux. De plus avec cette technique, il y a une limitation des fluorochromes et des milieux de montages utilisables, notamment avec les montages gras, le glycérol où on observe des ébullitions du milieu, ou encore des cloques. Aussi, par l'élargissement des spectres et l'excitation multiple, il y a un problème de spécificité des émissions observées. Enfin, la vitesse d'acquisition des images demande du temps (Guiot, 2001 ; Cochard, 2001).

c - La microscopie à feuille de lumière

Principe

Pour ce qui est du microscope à fluorescence confocal ou à excitation biphotonique, l'illumination et la détection se font par le même objectif. Pour la microscopie à feuille de lumière, le principe est d'utiliser un objectif d'excitation pour éclairer latéralement une fine tranche d'échantillon perpendiculairement à l'axe de l'objectif de détection (Figure n°14). Cette configuration fait de ce microscope une technologie de choix pour visualiser sur plusieurs centaines de micromètres voire quelques millimètres des organismes entiers ou des modèles multicellulaires en 3D avec une faible toxicité. La configuration la plus répandue, appelée SPIM

(*Selective Plane Illumination Microscopy*), consiste à utiliser une lentille cylindrique couplée avec un objectif pour créer la feuille de lumière (Greger et al. 2007)

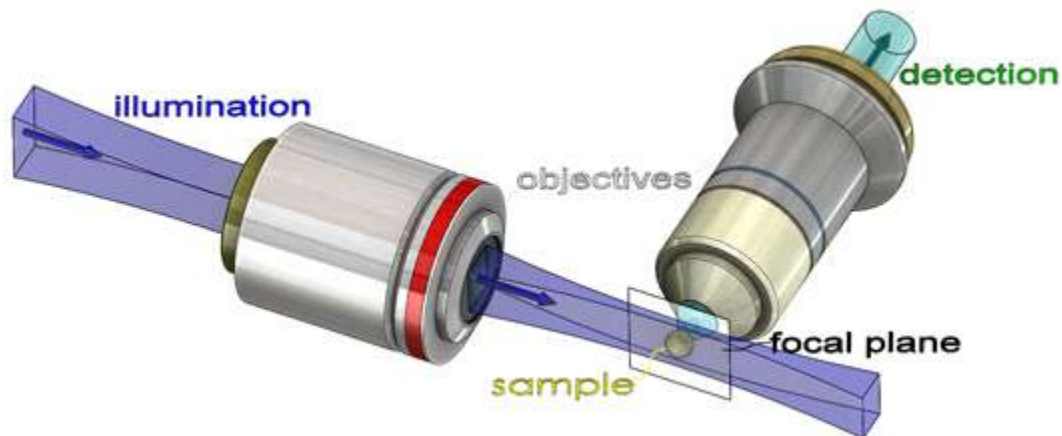


Figure 14 - Principe de la microscopie à feuille de lumière (d'après Cochard, 2014).

Une des caractéristiques du microscope à feuille de lumière est l'« imagerie multivues », c'est-à-dire la possibilité d'obtenir une image d'un échantillon sous différents angles. Des piles d'images 3D, enregistrées suivant deux ou plusieurs directions du même échantillon, sont ensuite fusionnées pour aboutir au volume final représentant l'objet. L'acquisition est généralement réalisée pas de multiples objectifs disposés tout autour de l'échantillon qui lui, reste fixe, ou alors un seul objectif en faisant tourner l'échantillon sur un axe pour l'imager sous différents angles. Cette imagerie multivues présente deux intérêts majeurs : premièrement, dans les tissus diffusants et absorbants, la qualité des images est améliorée et devient plus uniforme, et ensuite dans les échantillons transparents, la résolution devient isotrope, ce qui veut dire que les propriétés physiques de l'échantillon ne varient pas en fonction de la direction (Girard et Forget, 2011).

Avantages & inconvénients

L'un des principaux avantages de la microscopie à feuille de lumière est la vitesse d'acquisition qui est possible grâce à l'utilisation de caméras. En effet, elles permettent d'acquérir un champ entier grâce à une matrice de pixels contrairement aux PMT qui ne captent l'information que d'un seul point. Ainsi, nous n'avons plus besoin de scanner l'échantillon. De plus, les caméras sont plus sensibles que les PMT, ce qui signifie que l'on a besoin de moins de puissance laser pour exciter notre échantillon et donc moins de photo-dommages. En MFL,

comme les fluorophores sont excités seulement dans la tranche illuminée, le photoblanchiment et la phototoxicité sont limités au volume de cette tranche et, de ce fait, fortement réduits (Keller et al. 2007).

En ce qui concerne les inconvénients de cette microscopie, l'imagerie multivues génère énormément de données qui sont difficiles à manipuler pour l'analyse après l'acquisition. Aussi, ce type d'acquisition demande une préparation et un montage de l'échantillon particulier, à prendre en compte dans la préparation (Guiot, 2001 ; Girard et Forget, 2011).

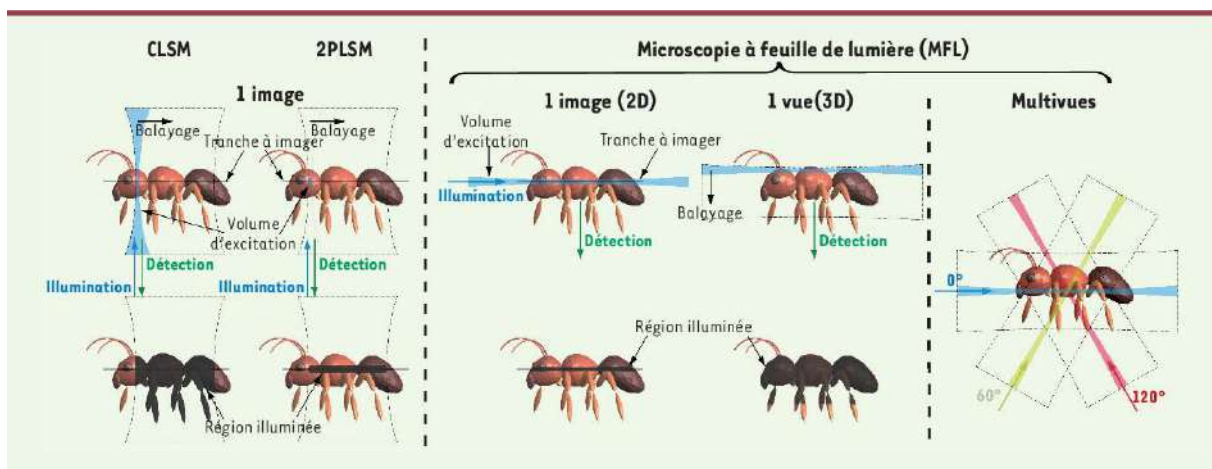


Figure 15 - Différence d'illumination en microscopies confocale, biphotonique et à feuille de lumière (d'après Girard et Forget, 2011)

4 – La microscopie dans l'entomologie

L'évolution de la microscopie à fluorescence depuis ces dernières dizaines d'années représente une véritable évolution technologique.

Différents auteurs se sont intéressés à l'étude systémique d'arthropodes, comme Galassi qui a notamment travaillé sur les copépodes (*Seudectinosoma kunzi*, *Parastenocaris Crenobia*) (Galassi 1997b ; 1997a ; Galassi et al. 1998). D'autres travaux ont utilisé l'imagerie en 3D et notamment l'autofluorescence de la cuticule pour obtenir des images innovantes chez la drosophile (*Drosophila megalonaster*, *Drosophila melanica*) (McGurk et al. 2007), les cafards (*Lauraesilpha heteroclita*), (Klaus et Schawaroch, 2006), et les lépidoptères (Lee et al. 2009), et différentes espèces d'acariens (*Torrenticola sp*, *Sperchon sp*, *Lebertia sp*, *Sperchonopsis sp*) (Valdecasas et Abad, 2011).

La microscopie à fluorescence a servi d'outil d'étude de la morphologie fonctionnelle et biomécanique des arthropodes, comme par exemple la visualisation et l'étude de la résiline (Michels et Gorb, 2012), ou encore dans l'étude structurelle du système vasculaire et du cœur de la drosophile (Alayari et al. 2009).

La microscopie en 3D reste cependant un outil très peu utilisé dans le domaine de l'entomologie médicale et vétérinaire.

C – Préparation de l'échantillon en vue d'une imagerie 3D

1 – Bases physiques de la lumière

La lumière se comporte comme une onde électromagnétique, c'est-à-dire quelle interagit avec la matière par deux grands phénomènes : l'absorption (souvent due à la mélanine comprise dans les tissus) et la diffusion/diffraction, qui ont pour effet d'induire un retard de propagation de l'onde lumineuse, qui est représenté par l'indice optique RI. Cet indice est proportionnel à la densité des molécules et des électrons que composent un tissu. Ainsi, les lipides par exemple ont une grande densité électronique et ralentissent la lumière. C'est ainsi que dans un tissu complexe, on va retrouver une grande diversité d'indices optique hétérogènes (Michel, 2019).

2 – Problème de transparence appliquée à la biologie et l'imagerie 3D

L'utilisation de l'imagerie en 3D à des tissus biologiques complexes est un apport original et pertinent à la compréhension de l'anatomie et de la biologie des systèmes.

Cependant le principal obstacle à l'utilisation de l'imagerie en 3D en profondeur de tissus biologiques, est tout d'abord la présence de pigments dans les tissus, qui représentent un obstacle à la lumière en l'absorbant. Le deuxième problème majeur est la pénétration des photons au cœur de l'échantillon. Les différentes molécules composant la matière ont des indices de réfraction différents, ainsi la lumière se retrouve très fortement diffusée (phénomène de « scattering »), et ce dès les premières couches traversées. Une préparation des tissus est donc nécessaire afin de les rendre transparents et utilisable en microscopie. Les étapes de préparation sont décrites ci-après ([Richardson et Lichtman 2015](#) ; [Michel, 2019](#)).

3 – Le blanchiment ou ‘bleaching’

Certains pigments comme l’hémoglobine ou les cytochromes sont des molécules qui ont des propriétés fortes d’absorption de la lumière. Ainsi ces substances doivent être détruites ou neutralisées selon une première étape dite de décoloration ou de blanchiment (ou encore « bleaching ») de l’échantillon. Cette étape est fondamentale notamment dans le cas d’échantillons très pigmentés, ou richement vascularisés (comme le pancréas). Pratiquement, la destruction des molécules pigmentaires absorbantes est réalisée à l’aide de peroxydes, comme le peroxyde d’hydrogène (H₂O₂).

4 – La transparisation

La deuxième étape s’appelle la « transparisation ». L’objectif de cette préparation est d’homogénéiser les indices de réfraction de l’échantillon, et de supprimer les points de diffusion. Pour cela il est possible d’augmenter l’indice réfraction du milieu ou de baisser celui des tissus que l’on souhaite observer, afin de se rapprocher de l’indice de réfraction de l’eau. Pour se faire, la transparisation va principalement :

- Supprimer (ou réduire) l’opacité des cellules en supprimant les lipides présents dans les gouttelettes lipidiques des adipocytes, sans endommager les cellules
- Éliminer les pigments
- Homogénéiser les indices de réfraction pour limiter les phénomènes de diffraction de la lumière.

5 – Protocoles de transparisation

Le premier protocole de transparisation a été mis au point en 1912, par Spatelholz, un anatomiste. Son protocole consistait à homogénéiser l’indice optique à l’intérieur et à l’extérieur de l’échantillon à l’aide de solvants, qui se sont montrés trop agressifs pour les échantillons. En effet, sa technique utilisant des peroxydes porte atteinte à l’intégrité et à la morphologie des tissus, elle endommage gravement les tissus fixés au formol et empêche toute investigation ultérieure au niveau histologique. Depuis différents protocoles ont été mis au point, assurant la conservation de la structure des échantillons.

Il existe quatre protocoles permettant de réaliser la transparisation des tissus utilisant différents types de solvants :

- Transparisation à base de solvants organiques (utilisant des benzènes) : ces solvants permettent de déshydrater l'échantillon, et de remplacer l'eau et les lipides par le solvant pour avoir un indice de réfraction globale qui se rapproche de celui du verre. Cette technique est très courante, mais détériore la fluorescence des protéines endogènes de la famille des GFP (« Green Fluorescent Protein »), ce qui implique de réaliser des marquages immunofluorescents pour détecter les cibles d'intérêt (Michel, 2019).
- Transparisation à base solutions aqueuses (protocole d'immersion simple) : ce type de solvants permet de faire baisser les indices de réfraction de l'échantillon pour se rapprocher de celui de l'eau. Les protéines fluorescentes sont conservées, mais un gonflement important de l'échantillon peut être observé, et donc le déformer (Tainaka et al. 2018).
- Transparisation par inclusion en hydrogel, selon le protocole « Clarity » (Figure n° 16) : ce protocole permet d'éliminer les lipides grâce à un détergent (le lithium dodecyl sulfate ou LDS), et par l'intégration de l'échantillon dans de l'hydrogel, préserve la morphologie de celui-ci tout en permettant un marquage immunofluorescent et une préservation des protéines de la famille des GFP (Gradinaru et al, 2018), (voir Figure 18).



Figure 16 - Cerveau de souris transparisé par la technique Clarity (Chung et al. 2013)

Les protocoles de blanchiment et de transparisation se sont améliorés au fil du temps et permettent désormais de s'adapter à des échantillons de nature très différente. La pénétration de la lumière des microscopes à laser est permise sans diffusion, tant pour l'excitation que pour la détection des fluorophores. L'acquisition en est ainsi simplifiée et beaucoup plus efficace, permettant l'obtention d'images en 3D de très grande qualité.

D - Objectifs et présentation du travail

Nous proposons dans ce travail de thèse l'utilisation de la microscopie en 3D pour la première fois sur des stomoxes transparisés, dans le but de décrire de façon originale et innovante leur anatomie pour réaliser, plus tard, le suivi d'un agent pathogène transmis par *Stomoxys calcitrans* en utilisant cette même technique. Nous proposons d'établir un atlas anatomique, venant en complément d'un travail antérieur réalisé par Pierre-Louis Huyart (2020), sur coupes histologiques en 2D des stomoxes.

Dans les parties suivantes, nous décrivons le matériel et les méthodes utilisés, en y incluant la mise au point du protocole de transparisation sur les stomoxes. Nous consacrons ensuite la partie « Résultats » à la description des images obtenues.

La mise au point du protocole de transparisation et l'imagerie confocale ont été réalisées en collaboration avec Corinne Barreau et Laetitia Pieruccioni, ingénieures d'étude au sein du Centre d'Expertise et de Ressources Technologiques (CERT) du laboratoire RESTORE (INSERM U1301 / CNRS UMR5070 / Univ. P. Sabatier / EFS / ENVT). L'utilisation de la microscopie en feuille de lumière a été réalisée en collaboration avec Jean-Michel Lagarde, PDG de l'entreprise Imactiv-3D (<https://www.imactiv-3d.com/>), Pascale Bernes-Lasserre, technicienne supérieure en biologie, Victoria Ramé, chef de projet en recherche et développement et marketing, et enfin Renaud Morin, chef de projet en recherche et développement en traitement d'images biomédicales.

II - Matériel et méthode

A - Origine des stomoxes d'élevage

Les stomoxes utilisés pour cette thèse proviennent de l'élevage de l'insectarium du service de Parasitologie de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT).

Brièvement, les adultes sont maintenus dans une cage cubique entourée d'une toile, et sont nourris à l'aide d'un nourrisseur artificiel à membrane contenant du sang de bovin posé sur le toit de cette cage. Un système de circulation d'eau maintient le sang à une température aux alentours de 38°C, température proche de la température corporelle des bovins. Les stomoxes se nourrissent en piquant à travers la toile qui présente un maillage très fin, et la membrane en plastique de paraffine (Parafilm®) refermant la base du nourrisseur artificiel. La température de la salle d'élevage est maintenue à 22°C ± 2°C, et le taux d'humidité est de 40% ± 10% (Voir Illustrations 2 et 3).

Les imagos utilisés dans cette thèse étaient des mâles et des femelles âgés de 5-7 jours. Après aspiration depuis une cage d'élevage, les adultes ont été fixés dans du formaldéhyde à 4% pendant 24h, puis placés dans du PBS et laissés à température ambiante en attendant les étapes de blanchiment et de transpiration.

Des adultes gorgés de sang et non gorgés ont été prélevés.



Illustration 2 - Cage d'élevage de stomoxes adultes (illustration originale)



Illustration 3 - Nourrisseur artificiel à membrane (illustration originale)

B - Préparation des stomoxes

1 - Solvants et protocoles utilisés

Pour cette étude, nos échantillons ont été transparisés avec du Benzyl Alcool (BA) et du Benzyl Benzoate (BB), qui sont tous deux des solvants organiques. Ces solvants ont été notamment utilisés pour la transparisation de cerveaux et d'embryons de souris (Dodt et al., 2007), et également sur la drosophile, *Drosophila melanogaster* (McGurk et al., 2007), ou encore dans un travail de thèse précédent (Barbaray, 2019) pour la transparisation d'un autre insecte, la puce *Ctenocephalides felis*, en vue de l'utilisation de la microscopie confocale.

L'échantillon biologique est tout d'abord déshydraté avec des bains de concentration croissante en méthanol (MeOH), puis décoloré avec une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce blanchiment a été réalisé sur plusieurs stomoxes gorgés et non gorgés, regroupés en 4 lots différents en fonction du temps d'incubation dans la solution de blanchiment (5, 8, 12 ou 15 jours) :

- Méthanol 50% - PBS : 1h, température ambiante, sous agitation
- Méthanol 80% - PBS : 1h, température ambiante, sous agitation
- Méthanol 100% : 1h, température ambiante, sous agitation
- Méthanol 100% : 1h, température ambiante, sous agitation
- 1 volume d'H₂O₂ (30%) / 1 volume de DMSO / 4 volumes de Méthanol : à 4°C, pendant **5, 8, 12 et 15 jours** suivant les lots, avec renouvellement de la solution toutes les 48 heures
- Méthanol 100% : 1h, température ambiante, sous agitation
- Méthanol 100 : 1h, température ambiante, sous agitation
- Méthanol / DMSO 20% : 1h, température ambiante, sous agitation
- Méthanol / DMSO 20% : 1h, température ambiante, sous agitation
- Méthanol 80% - PBS : 1h, température ambiante, sous agitation
- Méthanol 50% - PBS : 1h, température ambiante, sous agitation
- PBS : 1h, température ambiante, sous agitation
- Renouvellement du PBS et stockage des échantillons à 4°C

Il est ensuite nécessaire d'inclure les échantillons en agarose. En effet cela facilite le montage de l'échantillon pour la microscopie, et le stabilise pendant l'acquisition. Pour se faire, il faut préparer la solution d'enrobage avec de l'agarose et du PBS. Ensuite les stomoxes sont placés dans des boîtes de pétri et disposés en position ventro-dorsale, puis recouverts de la solution d'enrobage liquide. Il faut ensuite laisser la solution se solidifier à température ambiante. La position ventro-dorsale a été choisie arbitrairement pour permettre aux mouches de rester en équilibre et donc d'éviter de bouger pendant que l'agarose se solidifie.

Les étapes de déshydratation et de clarification qui interviennent ensuite permettent de rendre les mouches transparentes et d'homogénéiser les indices de réfraction à l'aide des solvants organiques :

- Méthanol 100% : 6h, à température ambiante, sous agitation
- Méthanol 100% : toute la nuit, à température ambiante, sous agitation
- Méthanol 100% : 8h à température ambiante, sous agitation
- 3 volumes de méthanol, 1 volume de BA, 2 volumes de BB : 30 minutes à température ambiante, sous agitation

- 1 volume de BA, 2 volumes de BB : toute la nuit, à température ambiante, sous agitation
- 1 volume de BA, 2 volumes de BB : 8h, à température ambiante, sous agitation

2 - Microscopie confocale

Les mouches clarifiées ont ensuite été imagées avec un microscope confocal droit de chez ZEISS (LSM880). Plusieurs lasers ont été utilisés pour les acquisitions : le laser Argon, illuminant à 488nm (bleu) et récupérant la fluorescence émise dans le vert, le laser diode illuminant à 561nm (vert) et récupérant dans le rouge et enfin le laser Helion-Néon, illuminant à 633nm (rouge) émettant dans le rouge lointain. Les acquisitions ont été réalisées avec le logiciel ZEN Black®, et les projections en Z d'intensité maximale ainsi que les reconstructions 3D ont été réalisées respectivement avec le logiciel IMAGEL® et IMARIS®.

3 - Choix de la durée des bains de blanchiment

Suite au blanchiment et à la transparisation des échantillons, nous avons obtenus différents lots, selon leur temps passé dans la solution de blanchiment. Macroscopiquement, nous pouvons déjà observer une différence entre les lots (Illustration n°3). En effet, plus les mouches passent de temps dans le bain à base d'H₂O₂, DMSO et Méthanol, plus elles deviennent dépigmentées, et paraissent donc plus transparentes. Cependant il est difficile d'apprécier à l'œil nu une différence de dépigmentation entre les J12 et les J15. Cet éclaircissement s'observe pour les mouches gorgées et non gorgées. Cependant pour un même temps d'incubation, on observe que les mouches gorgées sont moins bien éclaircies que les mouches non gorgées (ce qui semble bien visible pour le lot J8, voir Illustration n°3). Ainsi la présence de sang dans le tube digestif semble avoir une influence sur la transparisation des stomoxes.

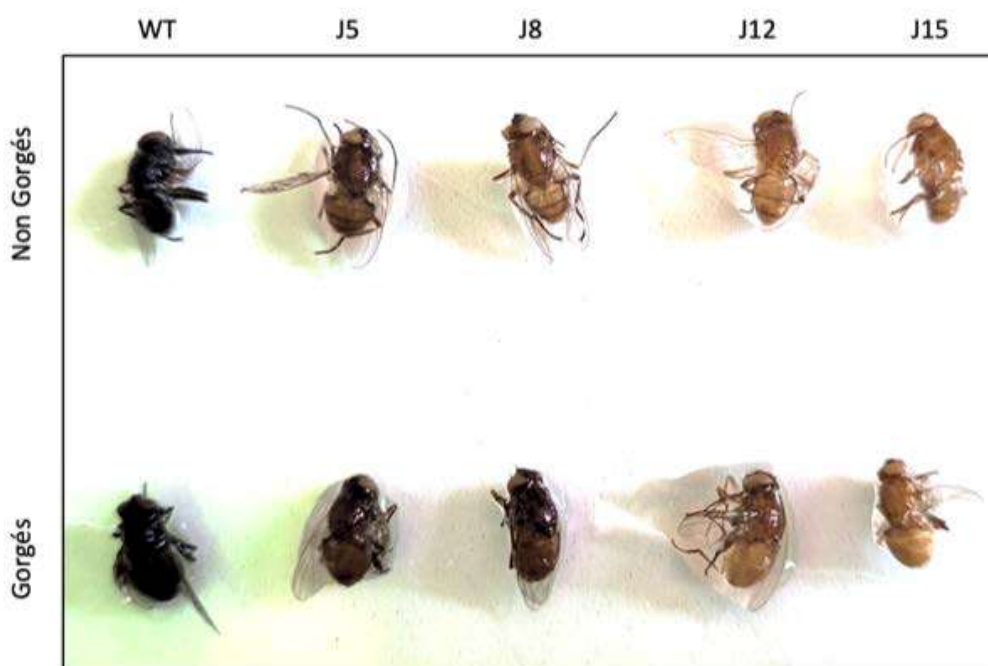


Illustration 3 - Observation macroscopique des stomoxes gorgés et non gorgés en fonction du temps d'incubation du blanchiment (J0, J5, J8, J12 et 15) (Illustration originale)

4 - Observation des mouches après transparisation au microscope confocal

Chaque lot a ensuite été imagé au microscope confocal, avec une acquisition ventro-dorsale.

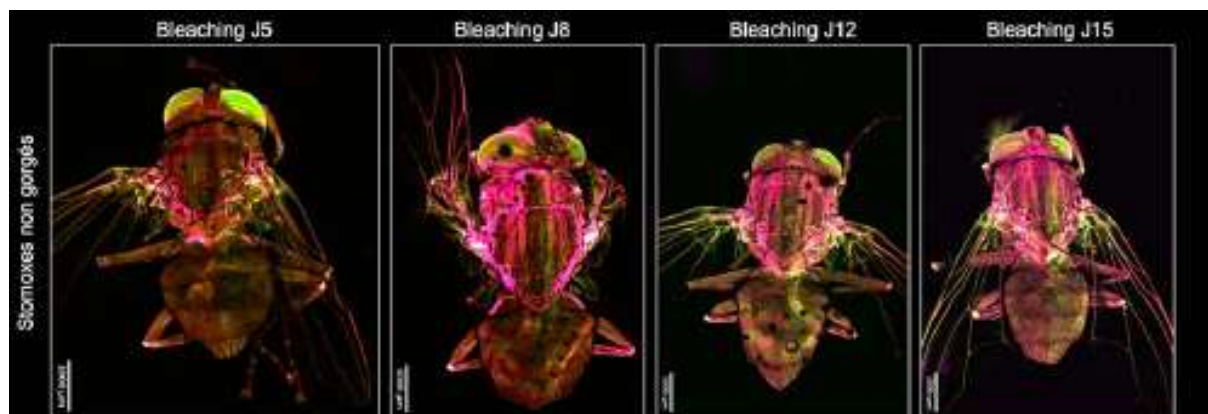


Illustration 4 - Acquisition au microscope confocal des stomoxes non gorgés en fonction de la durée d'incubation du blanchiment (J5, J8, J12 et J15)

Nous pouvons remarquer (Illustration n°4) que les images obtenues sur les mouches incubées pendant 5 jours (J5) ne sont pas optimales. L'anatomie externe n'est pas parfaitement

observée et certaines structures manquent de fluorescence (ailes, pattes). Il a été estimé que la transparisation de ce lot ne permettait pas une imagerie de bonne qualité, et nous l'avons donc éliminé. De même l'observation de l'anatomie interne (tube digestif visible, rempli ou non de sang) du lot J8 était décevante, et ce lot n'a pas été conservé pour la suite.

Enfin pour les lots J12 et J15, les différences sont peut notables. C'est ainsi que nous avons choisi de réaliser la quasi-totalité des acquisitions au microscope confocal avec le lot J12.

Pour les stomoxes gorgés (Illustration n°5), imagés principalement pour l'observation du tube digestif avec la fluorescence du sang, les résultats sont plus satisfaisants pour les mouches J12 et J15. En effet les contours de l'intestin moyen dans l'abdomen semblent plus précis, et mieux détaillés. Nous avons donc également décidé d'imager principalement le lot de mouches gorgées J12.

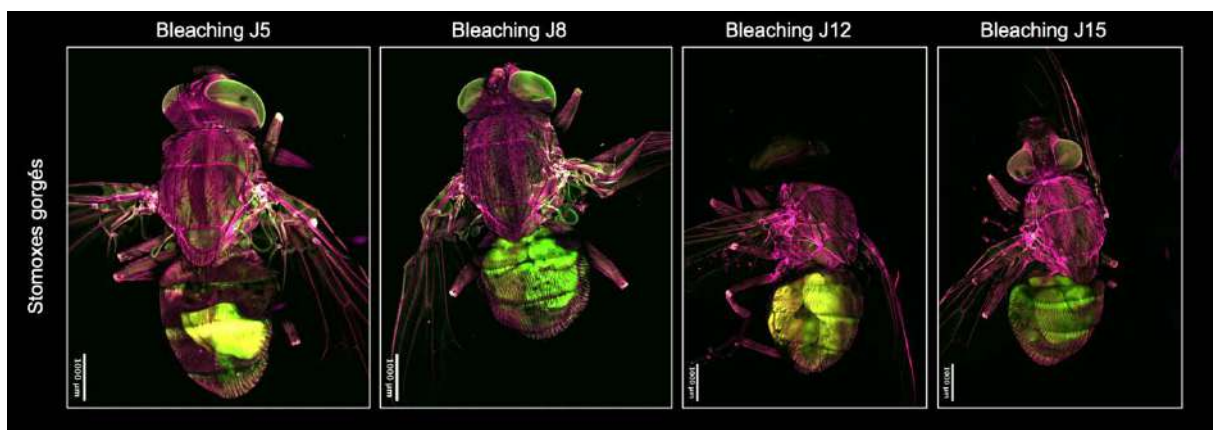


Illustration 5 - Acquisition au microscope confocal des stomoxes gorgés en fonction de la durée d'incubation du blanchiment (J5, J8, J12 et J15)

Ainsi, étant donné ces résultats préliminaires, nous avons décidé de standardiser notre protocole de transparisation des stomoxes en réalisant un bain (H₂O₂/Méthanol/DMSO) de **12 jours**.



Illustration 6 - Acquisition du stomoxe J12 au microscope confocal en vue dorso-ventrale (gauche) et ventro-dorsale (droite)

5 - Microscopie à feuilles de lumière

Un deuxième type de microscopie a été utilisé dans ce travail, la microscopie à feuille de lumière, bien adaptée aux échantillons ayant une taille supérieure au millimètre.

Les stomoxes des lots J8, J12 et J15 ont été imagés par le microscope à feuille de lumière. Toutes les acquisitions ont été réalisées au laser 561nm (vert), sauf pour les stomoxes appartenant au lot J15, non gorgé qui ont subi deux acquisitions : une vue entière avec le laser à 638nm (rouge lointain) et une vue plus zoomée sur l'abdomen imagée en 561nm. Le logiciel d'acquisition était le ZEN Black® et celui du traitement d'image, le ZEN Blue®.

Dans la suite de ce travail, nous présentons la morphologie externe de *Stomoxys calcitrans*, en utilisant les images obtenues en microscopie confocale, et la morphologie interne en utilisant des images obtenues à la fois en microscopie confocale et à feuille de lumière.

III - Résultats

A - Morphologie externe de l'imago

1 – La tête

La tête de *Stomoxys calcitrans* porte les organes sensoriels (yeux composés, ocelles, antennes), et les pièces buccales.

2 – Les yeux

Stomoxys calcitrans possède comme tous les diptères deux grands yeux composés et trois ocelles (Illustration n° 8).

Les yeux composés sont qualifiés de dischoptiques chez les stomoxes puisqu'ils ne se rejoignent pas au niveau du vertex (Duvallet et al. 2017). Il existe un dimorphisme sexuel entre le mâle et la femelle identifiable en observant les yeux composés : leur écartement est plus important pour la femelle que pour le mâle. Ces yeux sont ainsi nommés du fait de leur composition de multiples unités fonctionnelles nommées les ommatidies. La juxtaposition des ommatidies, par milliers pour chaque œil, forme un réseau régulier de mailles hexagonales. Ces yeux permettent principalement une résolution temporelle et une vision à 360°, leur vision spatiale étant assez mauvaise (Dajoz, 2010). Une ommatidie est composée d'une cornée cuticulaire, de cellules cristalliniennes, qui constituent le cristallin et qui sont encadrées par des cellules pigmentaires, et enfin des neurones photorécepteurs appelés cellules rétiniennes (Figure n°17, Illustration n° 7). Les marges latérales adjacentes à l'axe de l'ommatidie de ces neurones présentent des microvillosités qui s'entremêlent et s'alignent pour former le rhabdome. Cette structure originale guide la lumière à l'intérieur de l'ommatidie et optimise sa réception. Le rhabdome des diptères est dit « ouvert » car les plaques de microvillosités des photorécepteurs ne sont pas totalement fusionnées par endroits.

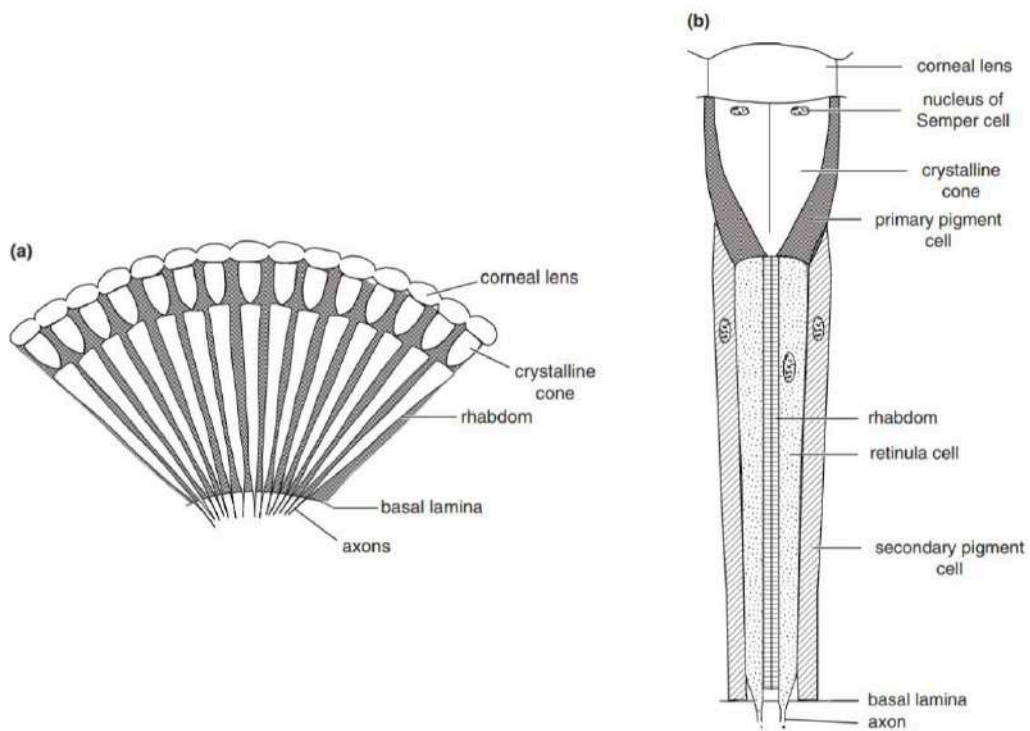


Figure 17 - Structure d'un œil composé (Chapman et al, 2013)

(a) = Section d'un œil composé ; (b) = Structure d'une ommatidie

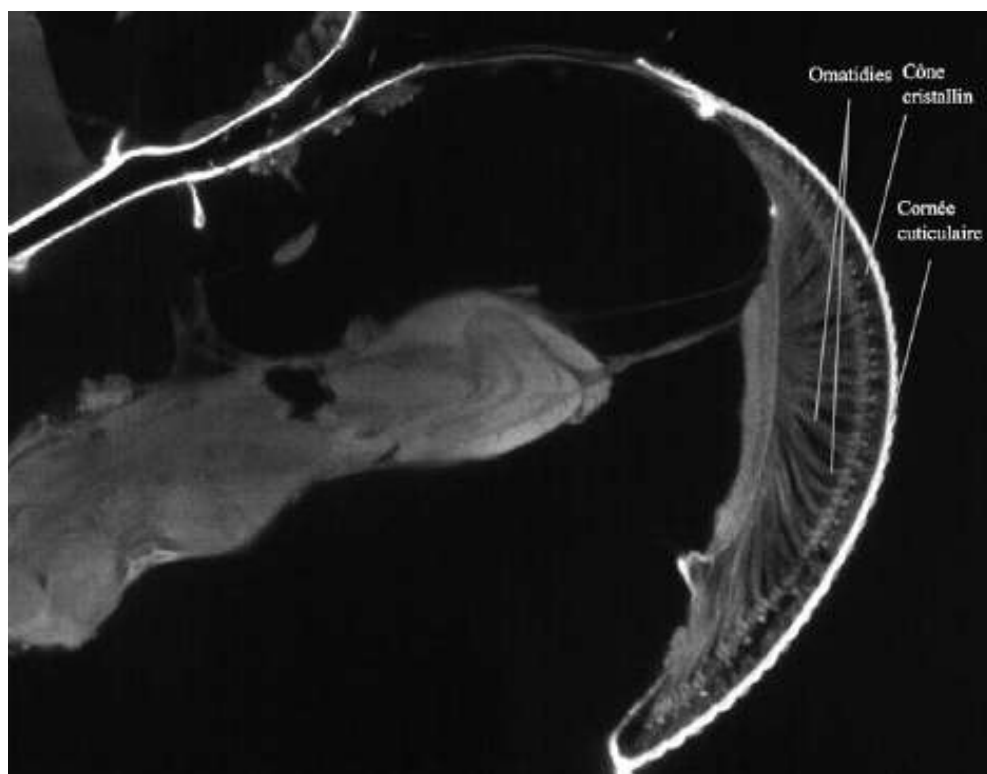


Illustration 7 - Coupe d'un œil composé de *Stomoxys calcitrans* (J15, gorgé) transversale au microscope à feuille de lumière

Les ocelles sont disposés dorsalement au niveau de l'épicrâne (Illustration n°8, 9), en triangle. Elles détectent les variations d'intensité lumineuse, ce qui permet au stomoxe de changer rapidement sa trajectoire de vol.

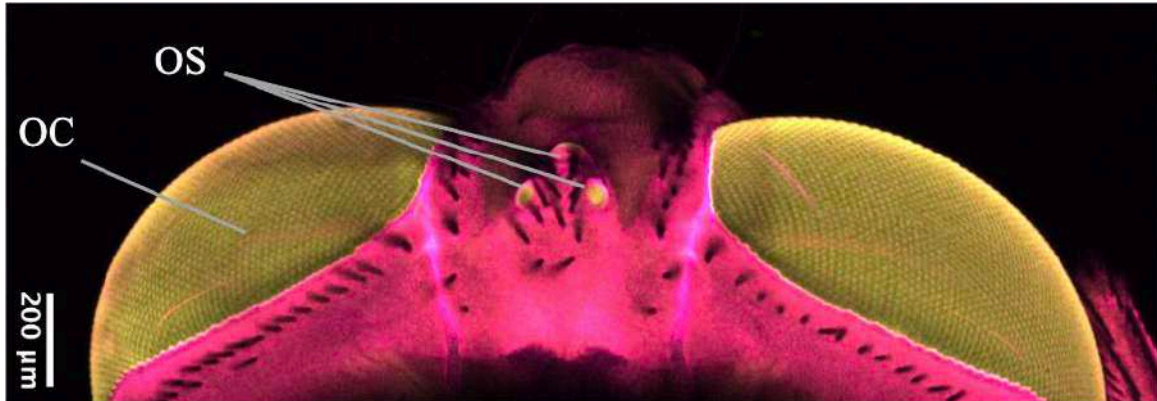


Illustration 8 - Yeux de Stomoxys calcitrans en vue dorso-ventrale au microscope confocal

(OC : Oeil composé, OS : Oeil simple : Ocelle)

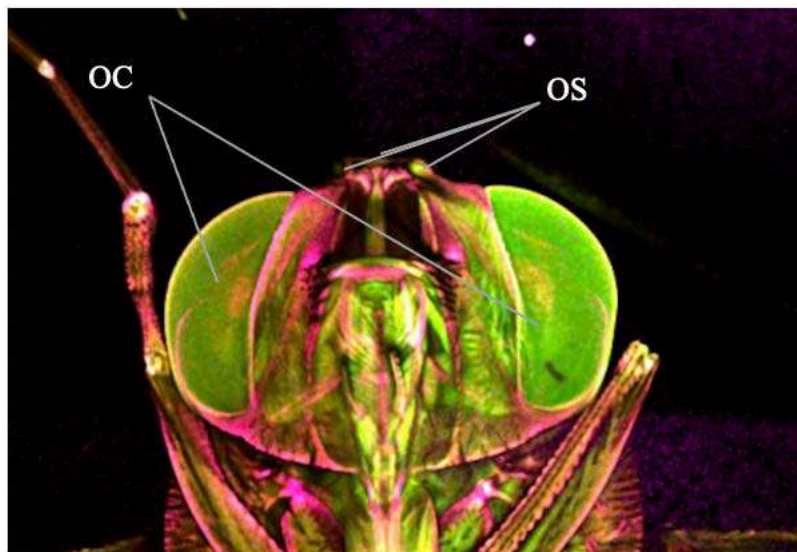


Illustration 9 - Yeux de Stomoxys calcitrans en vue ventro-dorsale au microscope confocal

(OC : Oeil composé, OS : Oeil simple : Ocelle)

3 - Les antennes

Les antennes sont de couleur noirâtre, et sont identiques dans les deux sexes. Elles se composent de trois segments : le scalpe qui s'articule avec l'épicrâne au niveau d'une région membraneuse dans laquelle il peut pivoter, le pédicelle et le flagelle, aussi appelé *funiculus*, portant une soie plumeuse, *l'arista* (Illustration n°10, 11, 12). Le flagelle est environ 2,5 fois

plus long que le pédicelle. Chez le stomoxe, l'*arista* porte de longues soies dorsalement. Les soies sensorielles sont situées sur le troisième segment.

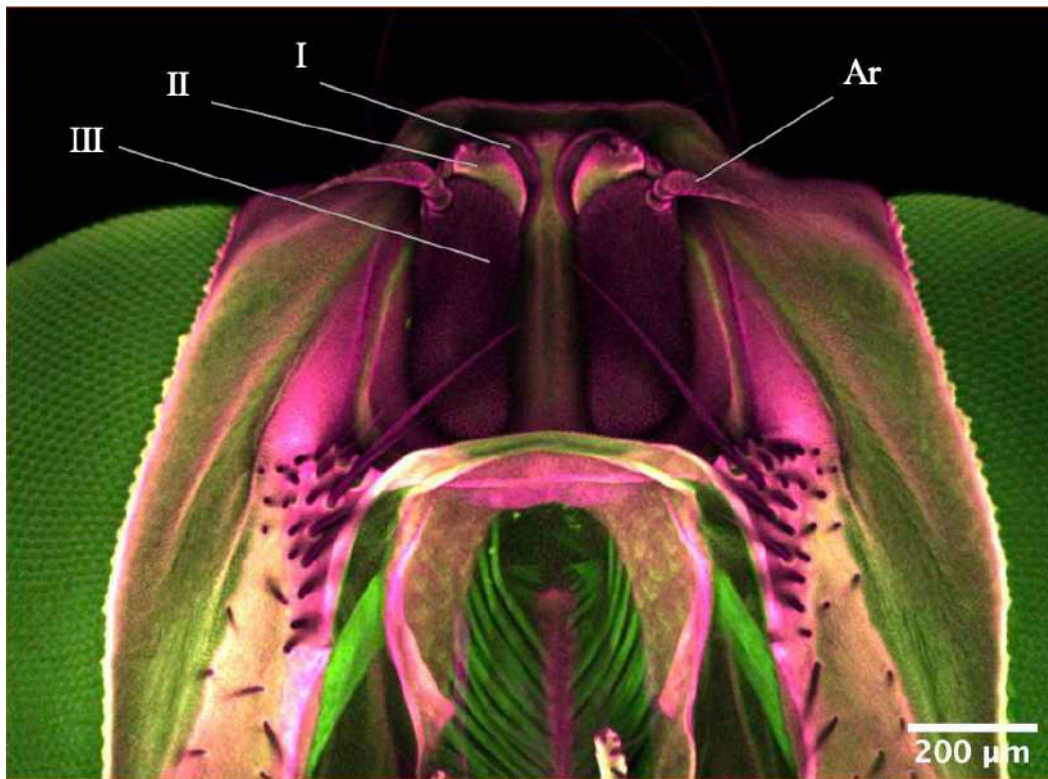


Illustration 10 - Antennes segmentaires de *Stomoxys Calcitrans* en vue ventro-dorsale au microscope confocal

(I : Scalpe, II : Pédicelle, III : Flagelle, AR : Arista)

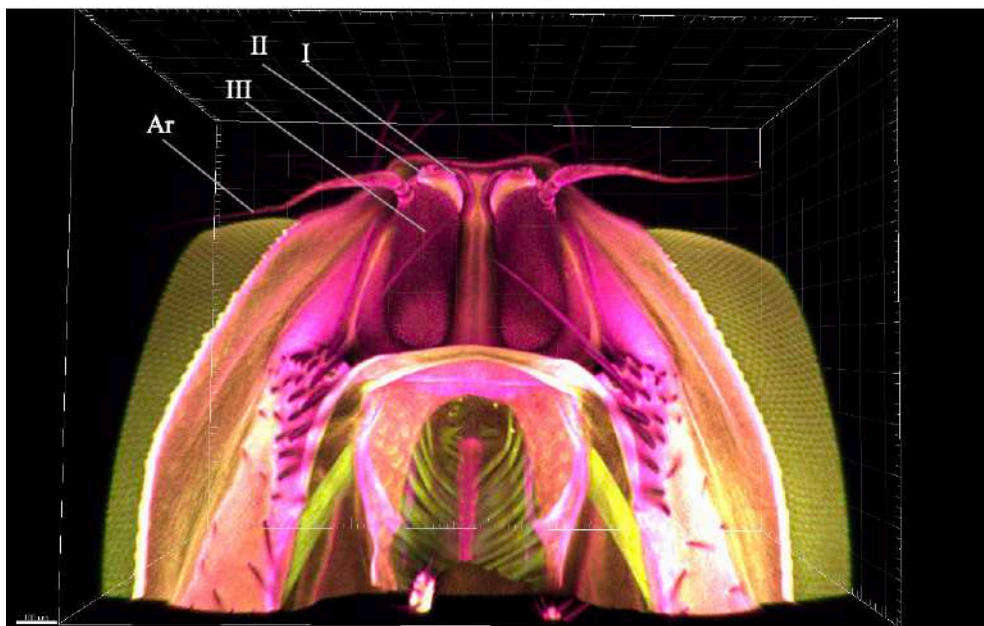


Illustration 11 - Représentation 3D des antennes de *Stomoxys calcitrans* en vue de face au microscope confocal

(I : Scalpe, II : Pédicelle, III : Flagelle, AR : Arista)

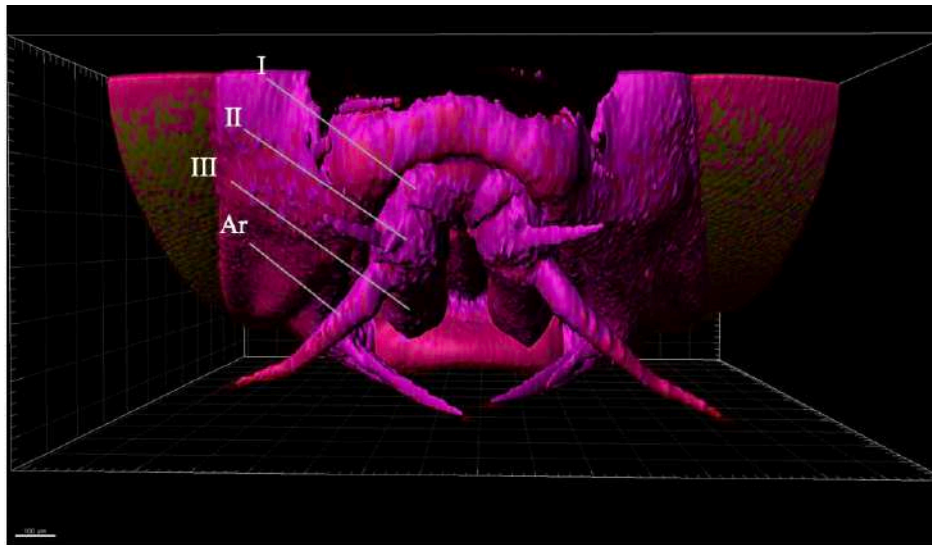


Illustration 12 - Représentation 3D des antennes de Stomoxys calcitrans en vue dorso-ventrale au microscope confocal

(I : Scalpe, II : Pédicelle, III : Flagelle, AR : Arista)

Les antennes sont des organes sensoriels. En effet, le pédicelle porte un organe sensoriel : l'organe de Johnston (Chapman et al. 2013 ; Dajoz, 2010). Cet organe est sensible aux variations de pression, et va notamment réagir à tout mouvement du flagelle par rapport au pédicelle. Cet organe possède plusieurs fonctions : il indique la vitesse de vol de l'insecte et la pression de l'air, il permet de détecter les vibrations émises par le vol de l'individu du sexe opposé lors de la parade sexuelle, permettant alors une reconnaissance d'espèce.

Le flagelle est aussi un organe sensoriel, il est en effet couvert de milliers de sensilles de natures diverses. C'est cette particularité qui fait des antennes le premier organe olfactif des insectes.

Ainsi les antennes permettent ce rôle de récepteur sensoriel via l'organe de Johnston et par le funiculus et ses nombreuses sensilles. Les deux autres segments servent de maintien de la structure sur l'épicrâne, et de prise au vent pour faire réagir l'organe de Johnston.

4- Les pièces buccales

Le stomoxe adulte possède un appareil buccal, non rétractile appelé proboscis. Ce dernier est fortement sclérifié (Illustration n°14), ce qui lui confère une grande rigidité. Il est porté horizontalement vers l'avant dans l'axe du corps, et est de couleur noire. Il est composé

de trois pièces : le labium, terminé par le labelle porteur de dents préstomales développées, le labre et enfin l'hypopharynx, qui contient le canal salivaire (Illustration n°13, Figure n°18). Le labium entoure l'hypopharynx et le labre. Chez les stomoxes, les palpes maxillaires sont plus courts que le proboscis (Illustration n°14). Ce qui permet de servir de critère de diagnose et de différencier cette espèce d'autres mouches piqueuses hématophages comme les *Haematobia* sp.

Pendant le repas de sang, dents préstomales perforent la peau de l'hôte. Puis la salive est injectée par l'hypopharynx, et le sang est aspiré par le labre et la partie dorsale de l'hypopharynx pour rejoindre l'œsophage (Zumpt, 1973). Le proboscis dans son ensemble joue alors un rôle de pompe.

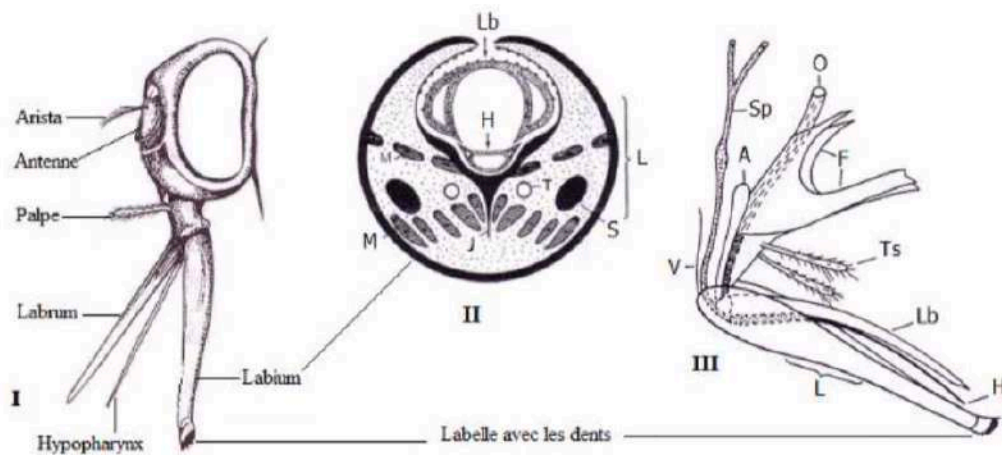


Figure 18 - Détail des pièces buccales de *Stomoxys calcitrans* (I) tête vue de profil, (II) proboscis en coupe transversale, (III) pièces buccales en vue latérale

(L : Labium, H : Hypopharynx, Lb : Labre, Ts : Palpes, V : Membrane entre le proboscis et la capsule céphalique, A : Apodème, F : Fulcrum, Sp : Glande salivaire, O : Œsophage, T : Trachée, J : Endosquelette, S : Tendon des labelles, M : Muscles, (d'après Zumpt, 1973))

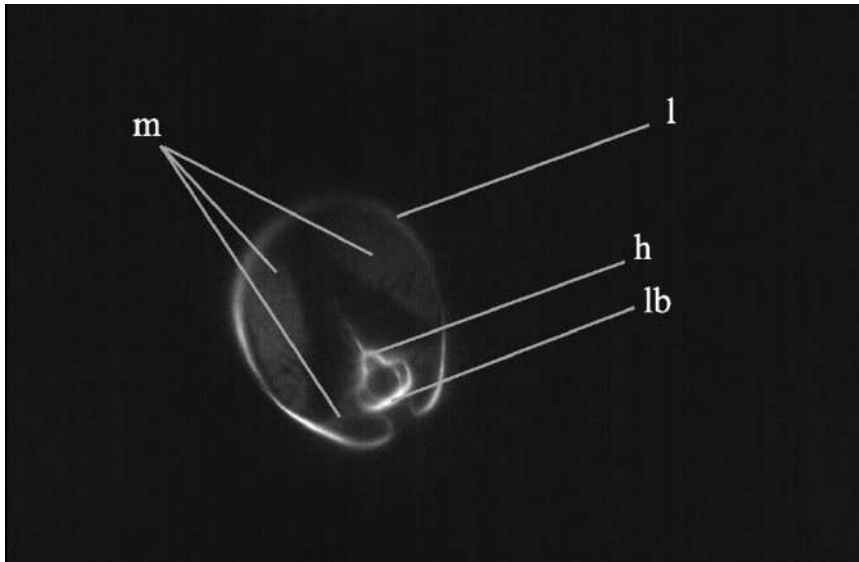


Illustration 13 - Coupe transversale des pièces buccales de *Stomoxys calcitrans* (J12, non gorgé) au microscope à feuille de lumière

(m : Muscles, l : Labre, h : Hypopharynx, lb : Labium)

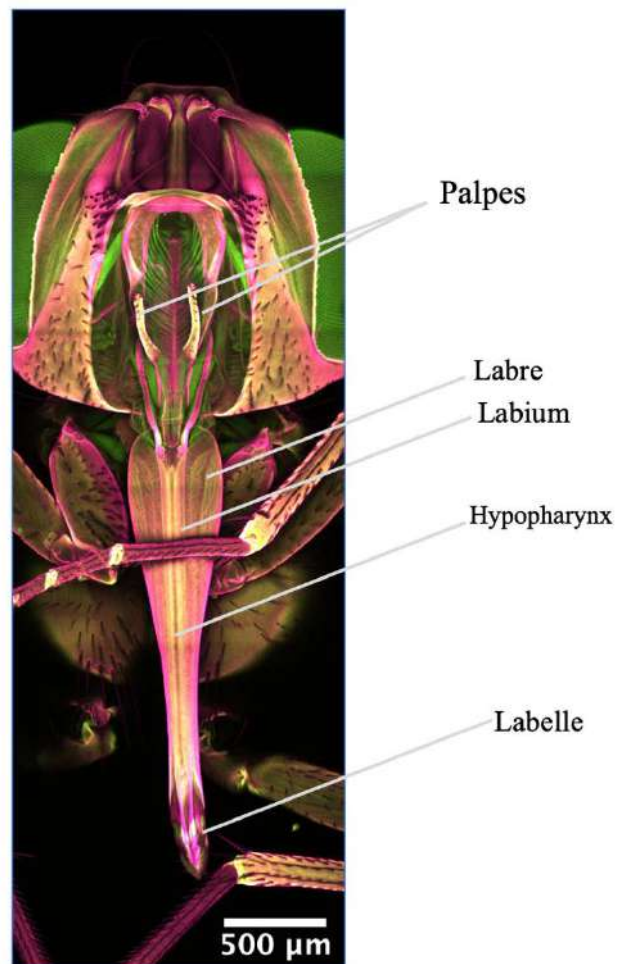


Illustration 14 - Pièces buccales de *Stomoxys calcitrans* en vue ventro-dorsale au microscope confocal

5 - Le thorax

Le thorax est composé de trois segments, le prothorax, le mésothorax qui est surdéveloppé par rapport aux deux autres, et enfin le métathorax. Chacune de ses parties porte une paire de pattes, et la deuxième partie porte la première paire d'aile et la troisième partie la deuxième paire d'aile, réduite à des balanciers, aussi appelés « haltères ». Chaque segment du thorax se compose de plusieurs plaques cuticulaires, appelées sclérites, qui vont former l'exosquelette : le sternite ou *sternum* ventralement, le tergite ou *tergum* dorsalement et les pleurites latéralement. Chacun de ces éléments est subdivisé (Chapman et al. 2013) :

- Les pleurites thoraciques, constituées de deux plaques fusionnées, appelées épisternite crânialement et l'épimère caudalement.
- Le *notum* constitue l'ensemble des pièces dorsales thoracique (Illustration n°15), et se divise en *pronotum* (prothorax), *mesonotum* (mésothorax), et *metanotum* (métathorax). De plus, chaque *notum* se divise en trois sclérites, de crânialement à ventralement : le *prescutum*, le *scutum* et le *scutellum*.
- Le sternum, composé du *presternum*, *basisternum* et *sternellum*.

Le thorax de *Stomoxys calcitrans* est de couleur grisâtre et présente dorsalement quatre bandes noires très caractéristiques, s'étendant du *pronotum* jusqu'au *mesonotum*.

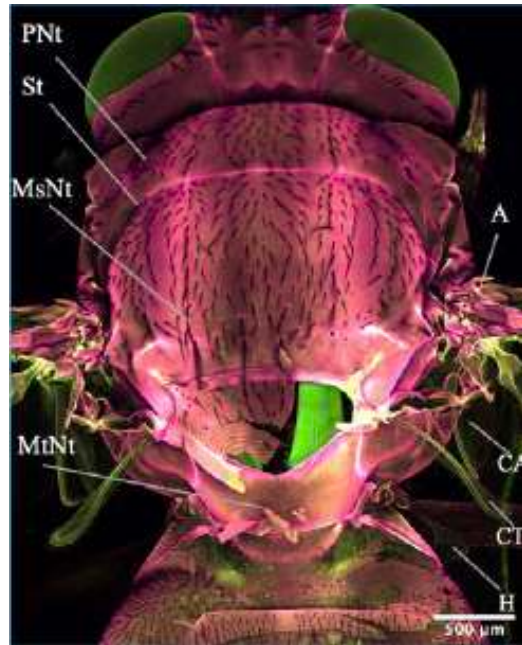


Illustration 15 - Thorax de Stomoxys calcitrans en vue dorso-ventrale au microscope confocal

(PNt : Pronotum, St : Suture transverse, MsNt : Mesonotum, MtNt : Métanotum, CA : Cuilleron alaire, CT : Cuilleron thoracique, A : Aile, H : Haltère)

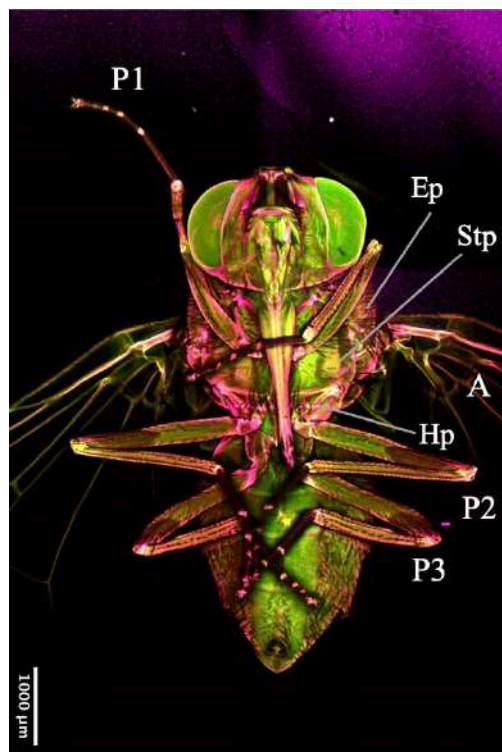


Illustration 16 - Stomoxys calcitrans en vue ventro-dorsale au microscope confocal

(Ep : Épistérne, Hp : Hypopleure, Stp : Sternopleure, P1, P2, P3 : Paires de pattes)

6 - Les ailes

C'est sur le mésothorax surdéveloppé que se tient la paire d'aile permettant le vol (Roth, 1974). Quand l'adulte est au repos, elles sont disposées en « V » majuscule inversé au-dessus de l'abdomen. Comme chez les autres Muscidae, les ailes sont hyalines et leurs nervations représentent des critères de diagnose d'espèce (Zumpt, 1973). C'est la première cellule postérieure (R5) qui représente un élément caractéristique des stomoxes. En effet, cette dernière est rétrécie à son extrémité distale (Illustration n°17).

Les ailes sont composées de veines ou nervures, qui sont des structures creusées par le couplage des parois supérieures et inférieures de l'aile. Les plus grosses d'entre elles peuvent contenir des nerfs, trachées et de l'hémolymphe. Les plus petites sont principalement des structures rigides formées de chitine. Il y a ensuite les cellules, qui sont les espaces de membrane formés entre les connexions des veines. Elles sont soit « ouvertes » et donc s'étendent jusqu'au bord de l'aile, ou fermées, et être délimitées seulement par des veines.

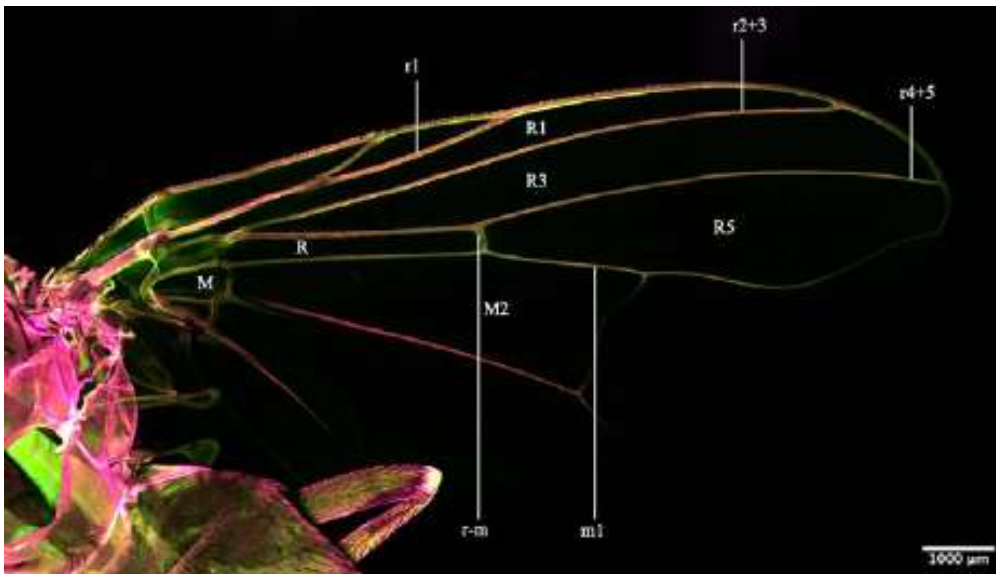


Illustration 17 - Aile mésothoracique droite de *Stomoxys calcitrans* en vue dorso-ventrale au microscope confocal

(R : Première cellule basale, R1 : Cellule marginale, R3 : Cellule submarginale, R5 : Première cellule postérieure, M : Deuxième cellule basale, M2 : Deuxième cellule postérieure ou discale, r1 : Premier nervure longitudinale, r2+3 : Deuxième nervure longitudinale, r4+5 : Troisième nervure longitudinale, m1 : Quatrième nervure longitudinale (media), r-m : Nervure transversale discale)

Les haltères, portés par le métathorax, représentent la deuxième paire d'ailes, postérieures chez les diptères, et atrophiée servant à l'équilibre. Ils sont protégés par les cuillerons alaires et thoraciques (Illustration n°15, 18, 19). Ils possèdent un rôle essentiellement

sensoriel ; ils sont agités rapidement afin de maintenir la stabilité du vol ; ils permettent également de contrôler la trajectoire de vol et de changer de trajectoire rapidement.

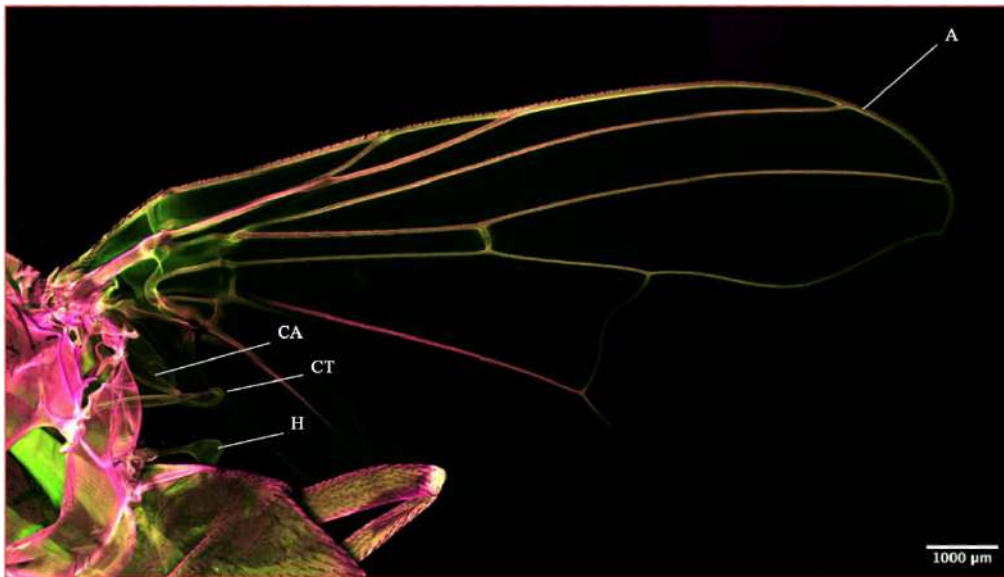


Illustration 18 - Aile mésothoracique droite de Stomoxys calcitrans en vue dorso-ventrale au microscope confocal

(A : Aile, H : Haltère, CA : Cuilleron alaire, CT : Cuilleron thoracique)

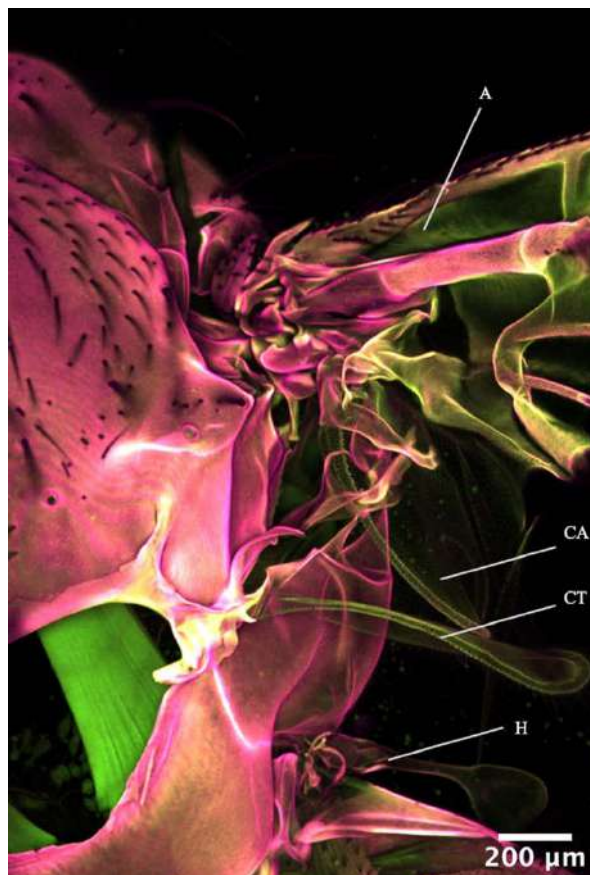


Illustration 19 - Zone d'insertion de l'aile de Stomoxys calcitrans en vue dorso-ventrale au microscope confocal

(A : Aile, H : Haltère, CA : Cuilleron alaire, CT : Cuilleron thoracique)

7 – Articulation des ailes avec le thorax

C'est la région qui constitue le système morpho-anatomique complexe qui relie les ailes au thorax. Cette région (Figure n°19) comprend un ensemble de petits sclérites et membranes qui s'articulent d'un côté aux apophyses alaires tergopleurales et de l'autre aux côtes longitudinales de l'aile et, enfin, fournissent un support pour l'insertion des muscles directs de l'aile. Il y a généralement trois sclérites axillaires, et la disposition précise de ces sclérites les unes par rapport aux autres et par rapport aux lignes de flexion de l'aile est extrêmement complexe et joue un rôle important dans les changements de forme de l'aile pendant le vol. En plus des sclérites axillaires, il existe d'autres plaques à la base de l'aile. En relation avec le troisième sclérite axillaire, il peut y avoir une ou deux plaques médianes d'où naissent la *media* et le *cubitus* («M» et «Cu» sur la figure n° 19). A la base de la *costa*, une des veines assurant support de la membrane de l'aile («C» sur la figure n°19) se trouve une plaque humérale et souvent, à proximité de celle-ci, une autre plaque dérivée du bord de la membrane articulaire, appelée *tegula*. Elle est bien développée chez les diptères (Illustration n°20).

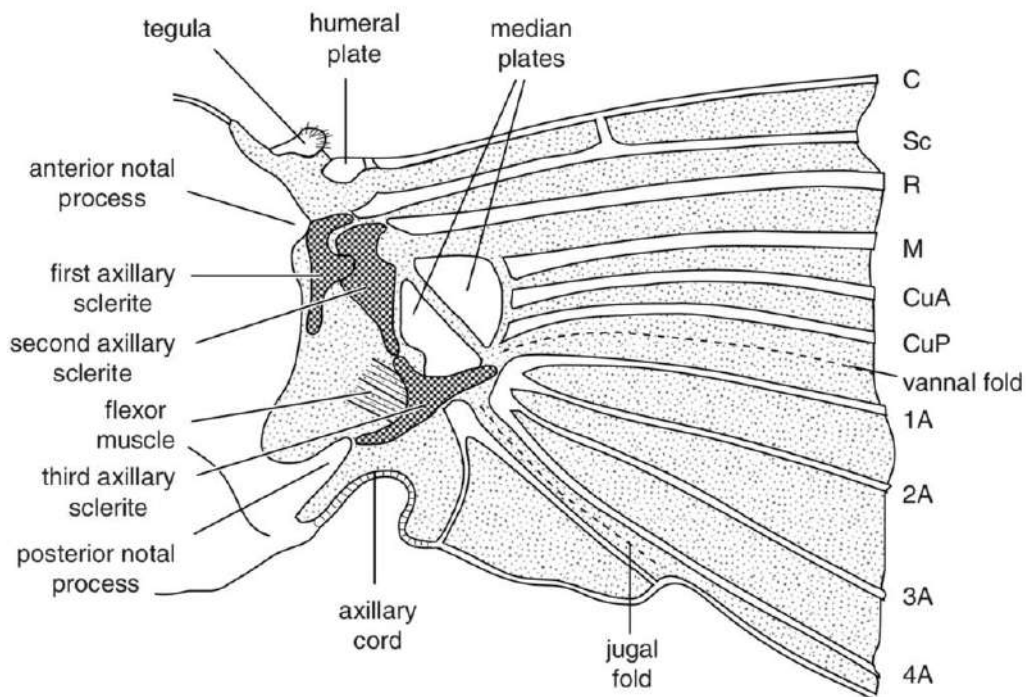


Figure 19 - Insertion de l'aile avec le thorax d'un insecte (d'après Chapman, 2013)

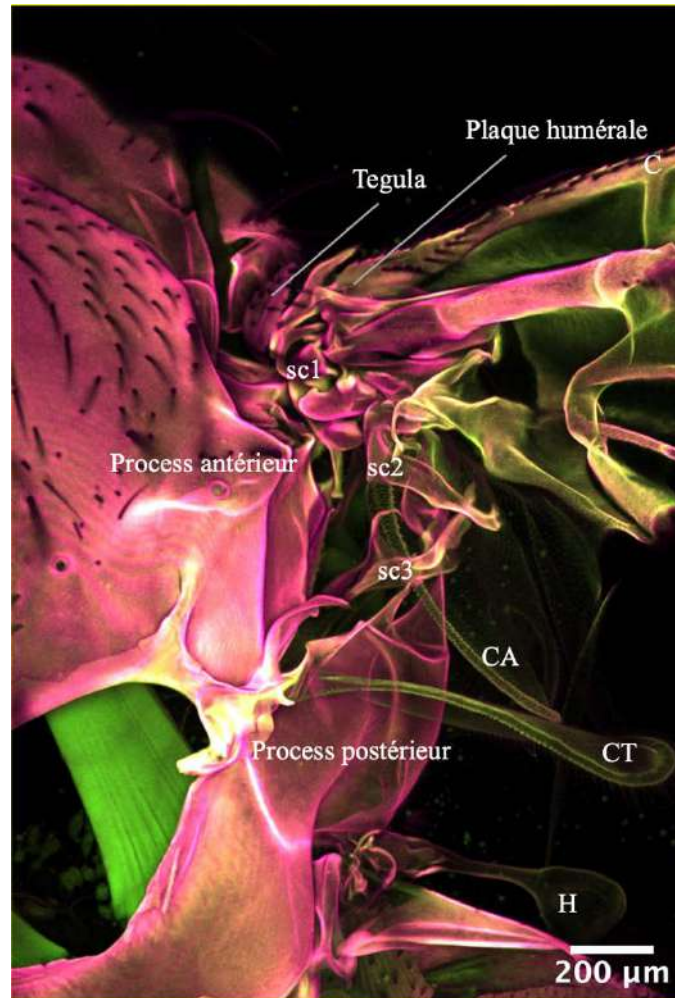


Illustration 20 - Zone d'insertion de l'aile de *Stomoxys calcitrans* en vue dorso-ventrale au microscope confocal

(sc1 : Sclérite axillaire n°1, sc2 : Sclérite axillaire n°2, sc3 : Sclérite axillaire n°3, CA : Cuilleron alaire, CT : Cuilleron thoracique, H : Haltere, C : Costa)

8 - Les pattes

Les pattes des stomoxes sont constituées de cinq articles : la coxa, le trochanter, le fémur, le tibia et le tarse, lui-même composé de cinq articles (Illustration n°21). Les pattes sont de couleur brun-foncé à noirâtre, avec une couleur plus pâle sur la partie de la base des tibias. Les fémurs de la première paire de pattes (P1) portent des soies raides et longues sur leur partie ventrale et dorsale. Le tibia ne porte des soies que sur sa partie médiane et les métatarses sont simples. Pour les P2, les soies ne sont présentes que sur le fémur en face ventrale et le tibia est dépourvu de soies médianes. Les fémurs des P3 portent des soies ventrales et courtes, seule la partie terminale est longue. Le tibia est lui aussi sans soie médiane.

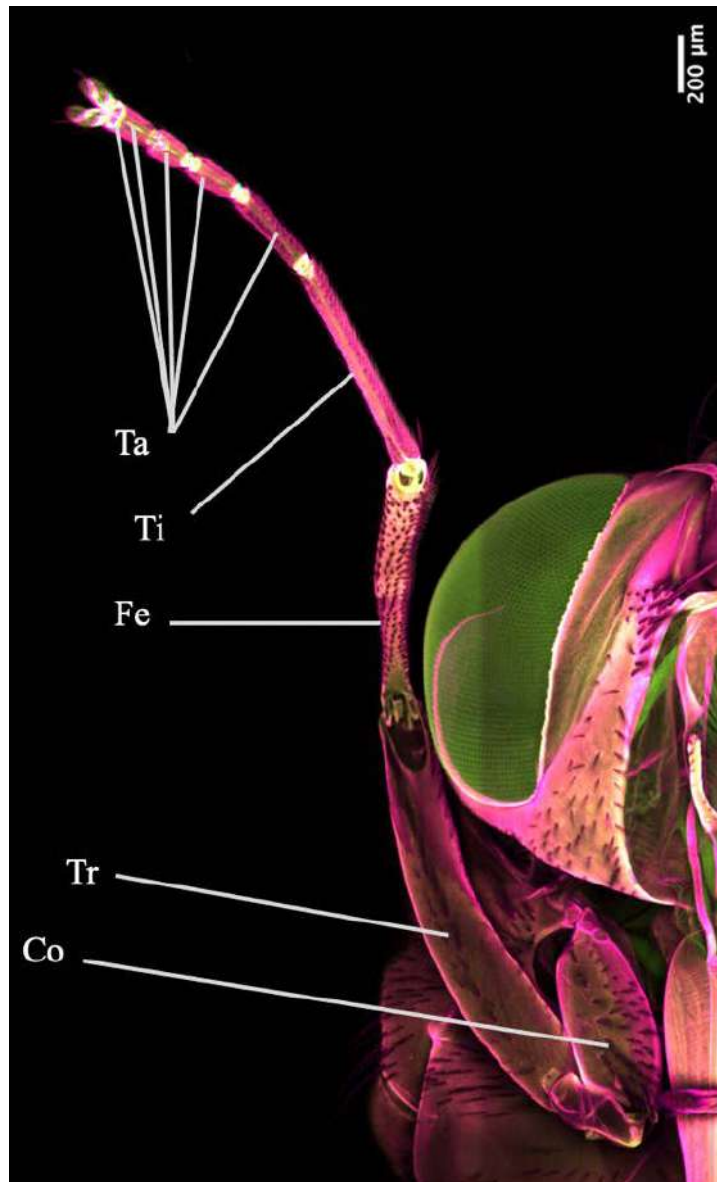
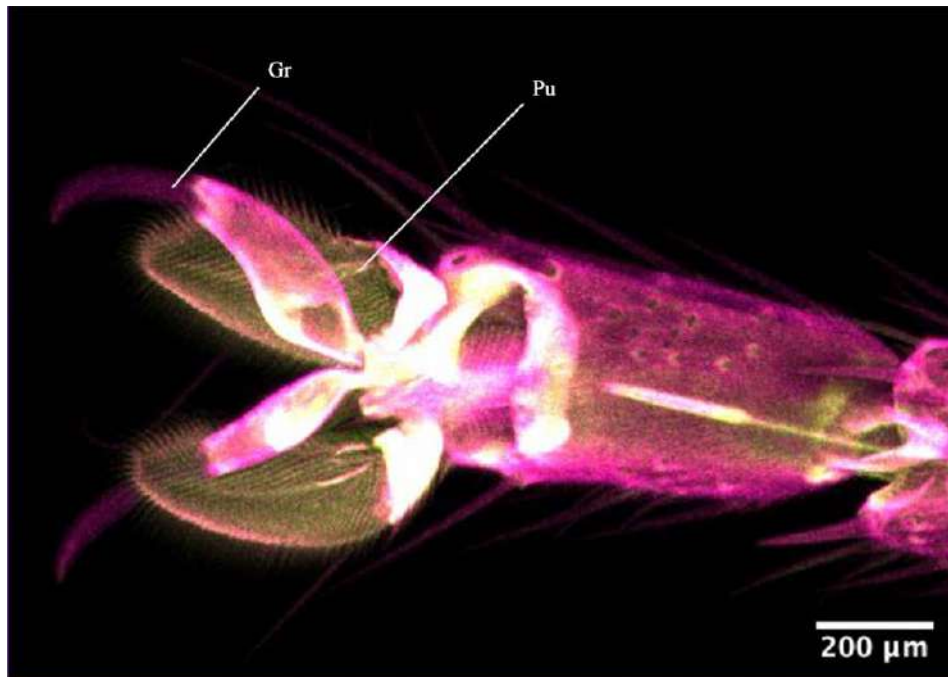


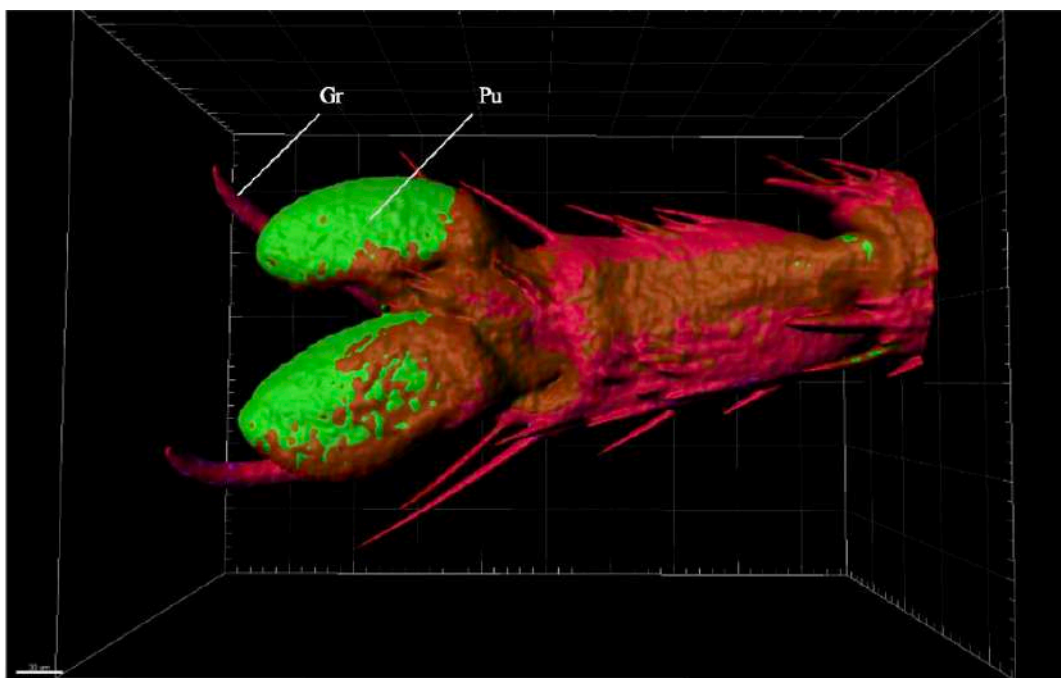
Illustration 21 - Patte P1 droite de Stomoxys calcitrans en vue dorso-ventrale au microscope confocal

(Co : Coxa, Ti : Tibia, Tr : Trochanter, Fe : Fémur, Ta : Tarse)

A l'extrémité des pattes (Illustrations n°22, 23, 24, 25), on retrouve deux griffes latérales encadrant deux pulvilles couvertes de soies adhésives, le tout encadrant une unique soie sensorielle, *l'empodium*. Cet ensemble permet l'adhésion du stomoxe à tout type de support.



*Illustration 22 - Extrémité de patte de Stomoxys calcitrans en vue ventro-dorsale au microscope confocal
(Pu : Pulville, Gr : Griffé)*



*Illustration 23 - Reconstitution 3D de l'extrémité de la patte de Stomoxys calcitrans en vue ventrale au microscope confocal
(Pu : Pulville, Gr : Griffé)*

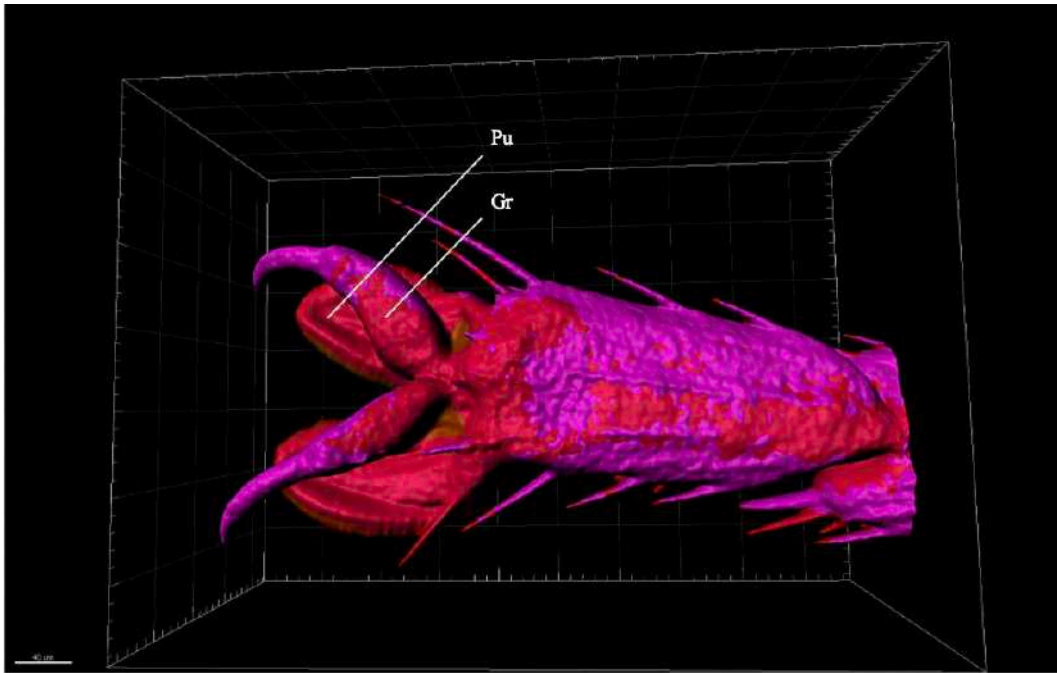


Illustration 24 - Reconstitution 3D de l'extrémité de la patte de Stomoxys calcitrans en vue dorsale au microscope confocal

(Pu : Pulville, Gr : Griffe)

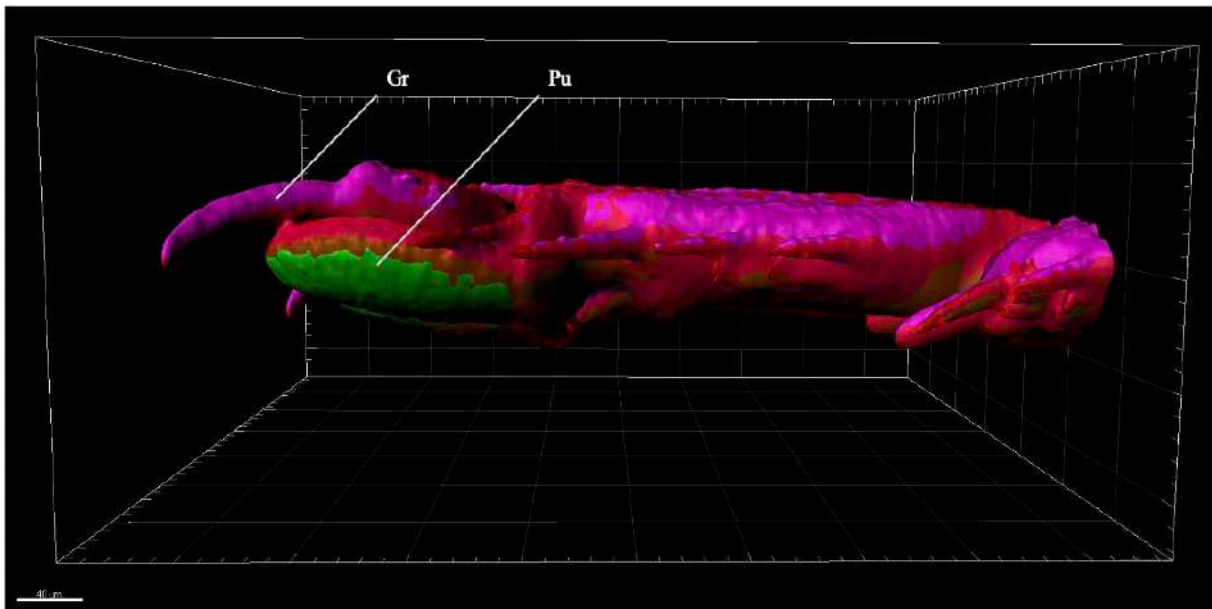


Illustration 25 - Reconstitution 3D de l'extrémité de la patte de Stomoxys calcitrans en vue latérale au microscope confocal

(Pu : Pulville, Gr : Griffe)

L'empodium n'apparaît pas sur les acquisitions ni sur les reconstitutions présentées précédemment. En effet étant une structure assez fragile, *l'empodium* a dû être arrachée du corps pendant le protocole de transparence.

9 - L'abdomen

L'abdomen du stomoxe (Illustration n°26) se divise en deux parties : le pré-abdomen et le post-abdomen. Le pré-abdomen se constitue de cinq sternites, et quatre tergites car les tergites I et II sont fusionnés. Le post abdomen est constitué de sept segments transformés en un appareil reproducteur. Les tergites et sternites sont reliés entre elles par une fine membrane tissulaire permettant à l'abdomen de se distendre fortement ventralement au moment du repas de sang notamment. Les segments II et III présentent un point sombre médial et deux points sombres latéraux.

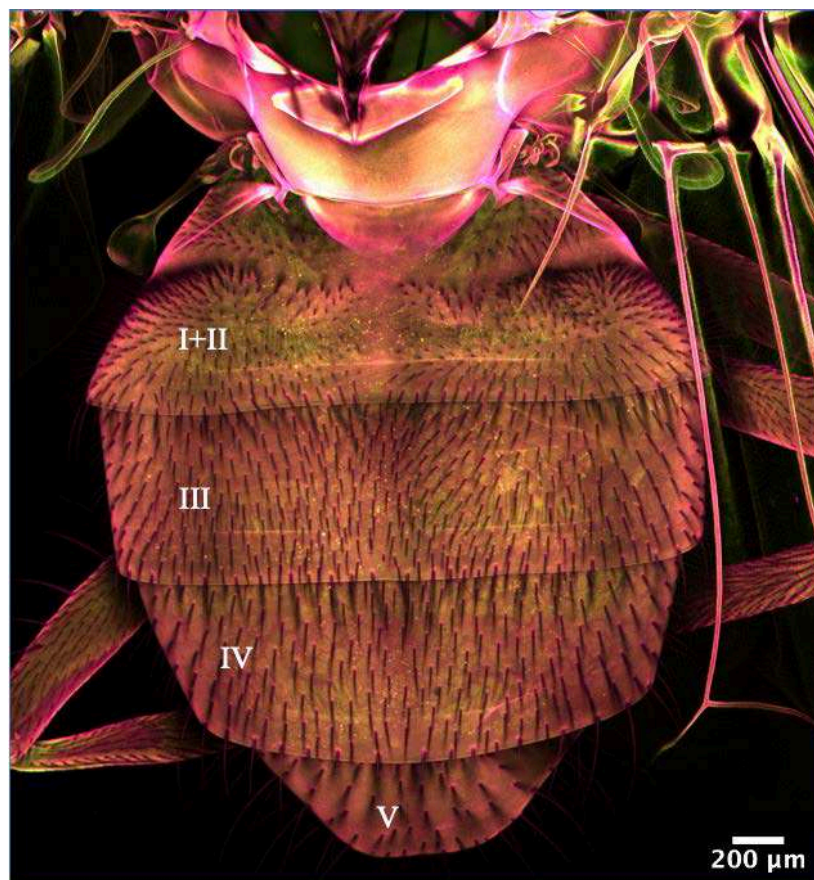


Illustration 26 - Abdomen de *Stomoxys calcitrans* (J15) en vue dorso-ventrale au microscope confocal

(I+II, III, IV, V : Tergites)

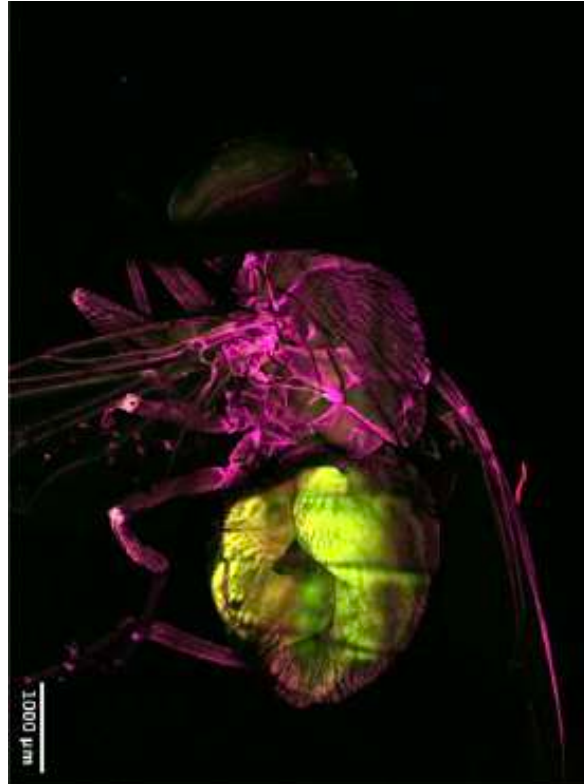


Illustration 27 – Observation de l’abdomen de *Stomoxys calcitrans* gorgé au microscope confocal en vue latérale

Le dimorphisme sexuel s’observe au niveau des yeux, comme nous l’avons vu précédemment, mais également au niveau de l’extrémité de l’abdomen, notamment après le repas sanguin. Lorsque l’abdomen n’est pas rempli de sang, l’appareil génital (Illustration n°28, 29) encapuchonné dans le pré-abdomen est difficilement observable. Après le repas sanguin, une fois le tube digestif rempli de sang, l’abdomen se distend ce qui a pour effet d’étirer le post-abdomen et donc de faire ressortir l’appareil génital (Figure n°20), qui devient ainsi visible. Le mâle possède un appareil reproducteur appelé un *hypopygium*, qui présente un organe d’intromission nommé *aedeagus*. Chez la femelle, l’extrémité distale est plus fine et pointue, et son appareil reproducteur est un ovipositeur tubulaire télescopique appelé oviscapte (Zumpt, 1973).

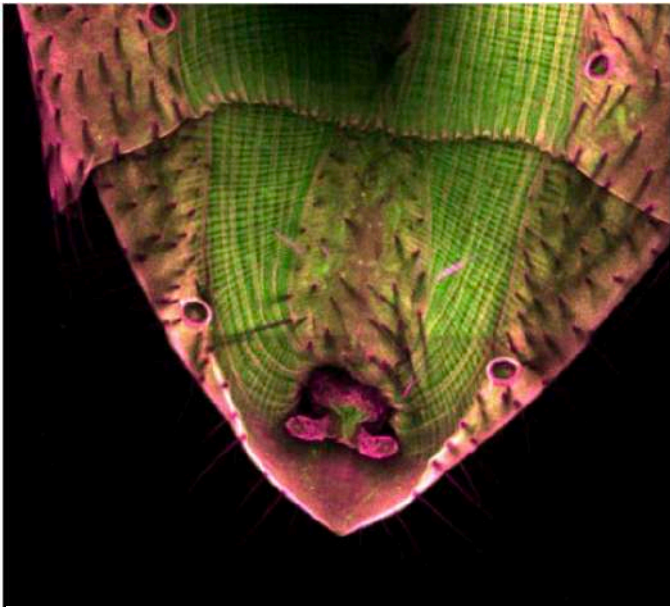


Illustration 28 - Appareil génital femelle de Stomoxys calcitrans en vue ventro-dorsale

(Avant gorgement à gauche, après à droite) au microscope confocal

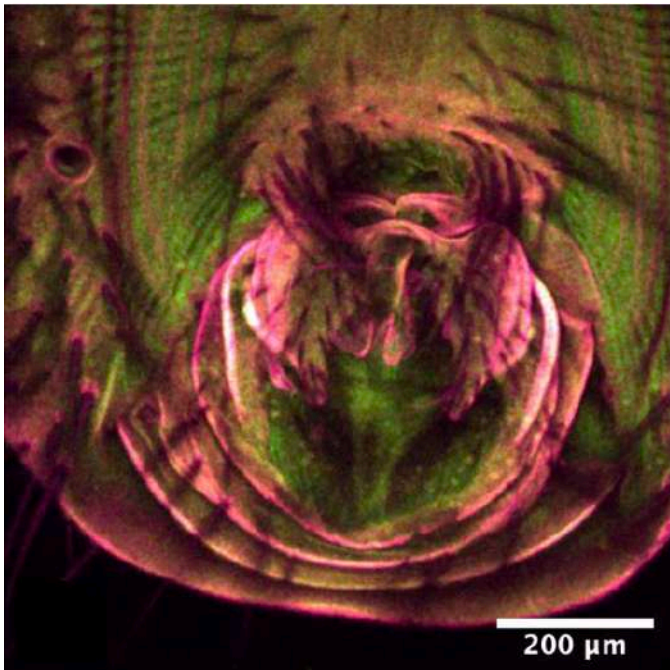


Illustration 29 - Appareil génital mâle de Stomoxys calcitrans en vue ventro-dorsale

(Avant gorgement à gauche, après gorgement à droite) au microscope confocal

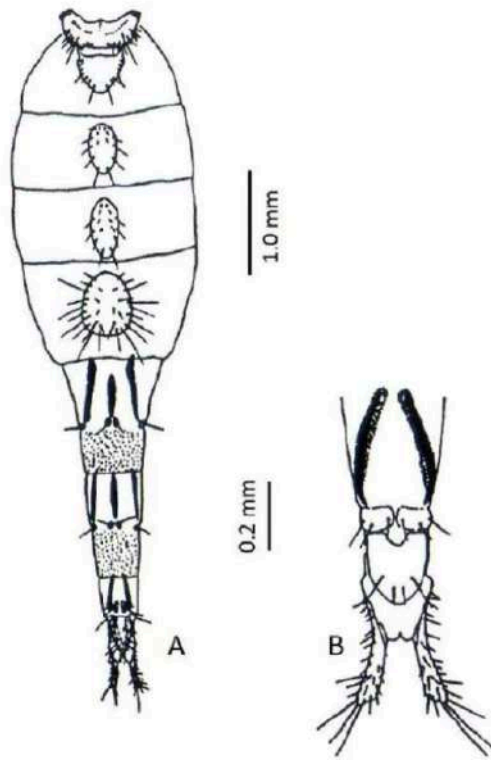


Figure 20 - Oviscapte de *Stomoxys calcitrans* (d'après Zumpt, 1973)

B – Morphologie interne de l'imago

Dans cette partie, nous avons fait le choix de ne présenter qu'une partie de l'anatomie interne du stomoxe (muscles du vol, système nerveux central l'appareil reproducteur femelle, système digestif et système respiratoire), cette liste n'est donc pas exhaustive.

1 – Les muscles du vol (Dickinson et Tu, 1997)

On distingue deux grands types de muscles indirects (Figure n°21) fournissant des niveaux élevés de puissance mécanique, nécessaires au déplacement des ailes vers le haut et vers le bas. Sur les parois latérales du thorax, 18 paires de petits muscles (Figure n°22) participent finement au mouvement des ailes. Ensemble, ces muscles moteurs et de contrôle sont responsables d'un des comportements locomoteurs les plus complexes du règne animal. Parmi les deux ensembles antagonistes de grands muscles moteurs qui remplissent une grande partie du volume interne du thorax de la mouche, on retrouve :

- Six paires de cellules musculaires longitudinales dorsales qui s'étendent médialement sur toute la longueur du thorax, parallèlement à l'axe longitudinal de la mouche. Ces six paires sont empilées les unes sur les autres et sont souvent considérées comme six muscles distincts.
- Sept paires de cellules musculaires dorso-ventrales qui s'étendent perpendiculairement à l'axe longitudinal de la mouche, de l'*épisternum* ventralement au *méso-praesutum* et au *méso-scutum* dorsalement. Ces sept paires de cellules musculaires sont disposées en trois groupes distincts qui sont généralement considérés comme des muscles séparés. Le muscle le plus antérieur contient trois cellules et les deux muscles postérieurs sont constitués de deux cellules chacun.

Voir les illustrations n°30, 31, 32, 33.

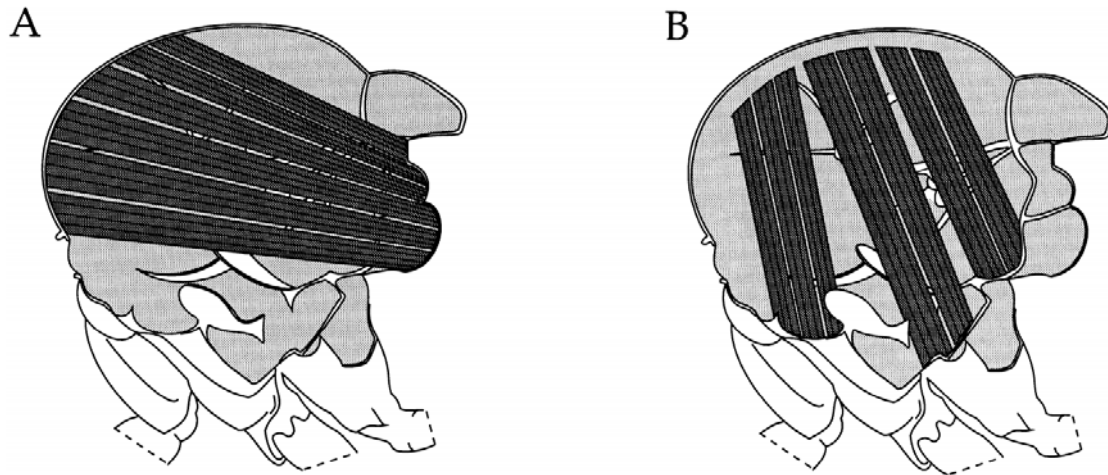


Figure 21 - Morphologie généralisée des muscles de la puissance indirecte chez les mouches, basée principalement sur la description de *D. repleta*. (A) Les six fibres musculaires longitudinales dorsales vues à partir d'une section sagittale médiane du côté droit. (B) Une vue plus latérale montrant les sept fibres dorso-ventrales qui sont disposées en trois groupes (d'après Dickinson et Tu 1997)

Steering Muscles

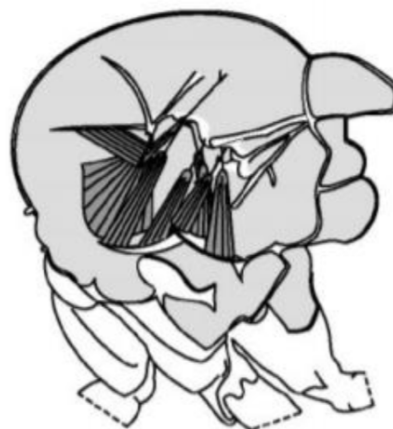


Figure 22 - Muscles directionnels du thorax (d'après Dickinson, 2005)

La contraction de ces muscles est asynchrone chez les diptères, c'est-à-dire qu'il existe un système de contrôle musculo-nerveux où une seule impulsion nerveuse entraîne la contraction répétée d'une fibre musculaire. Ceci permet à la fréquence des battements d'ailes d'excéder le rythme auquel le système nerveux peut envoyer des impulsions. C'est ainsi que le stomoxe effectue un mécanisme de vol dit « indirect » : les muscles dorsaux longitudinaux compriment le thorax de l'avant vers l'arrière, provoquant une courbure vers le haut de la surface

dorsale du thorax, le *notum*, et faisant s'abaisser les ailes. Ensuite les muscles dorso-ventraux tirent le *notum* vers le bas de nouveau, provoquant le mouvement vers le haut des ailes.

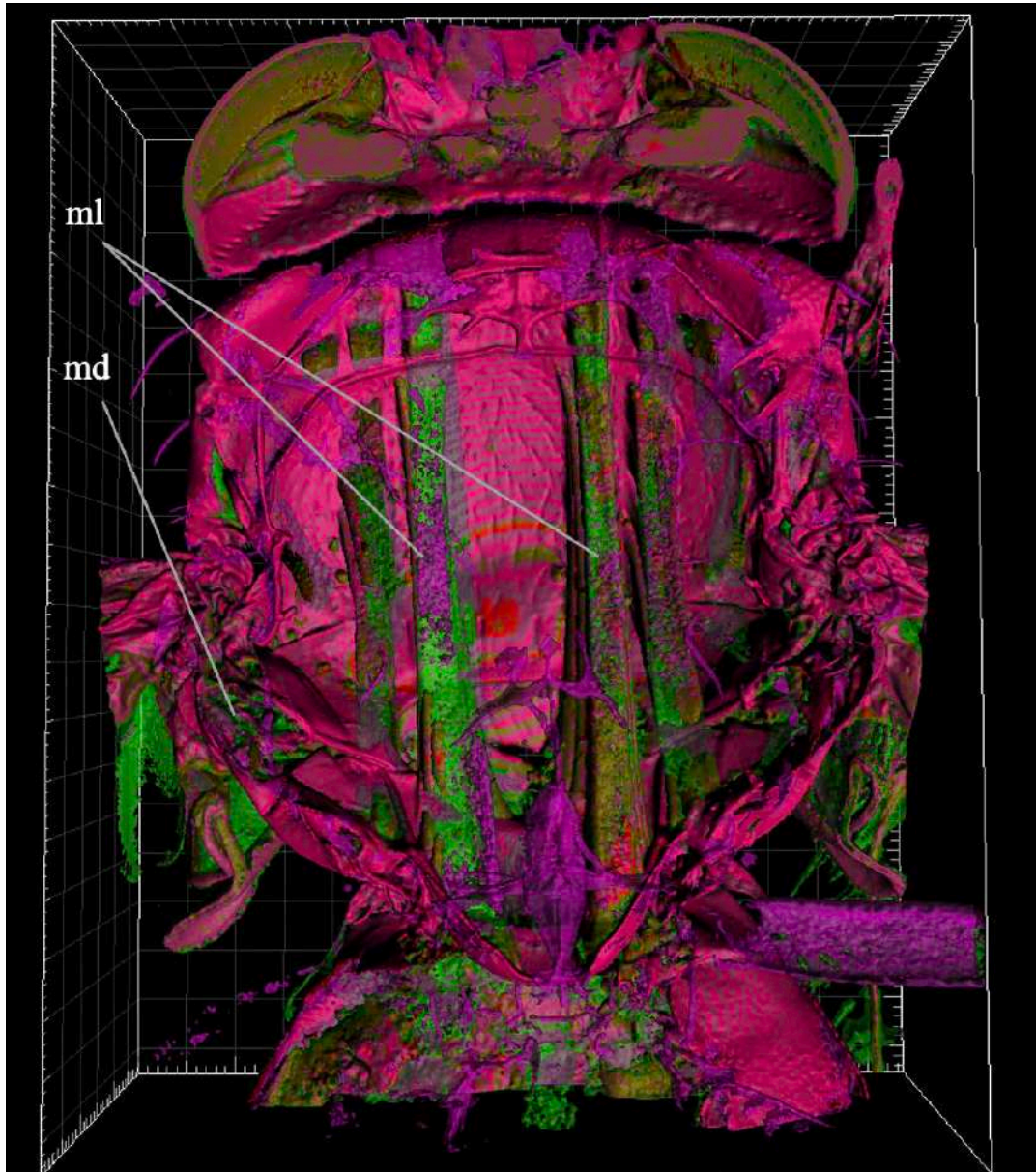


Illustration 30 – Représentation 3D du thorax de Stomoxys calcitrans en vue dorso ventrale au microscope confocal

(ml : Muscles longitudinaux, md : Muscles directionnels)

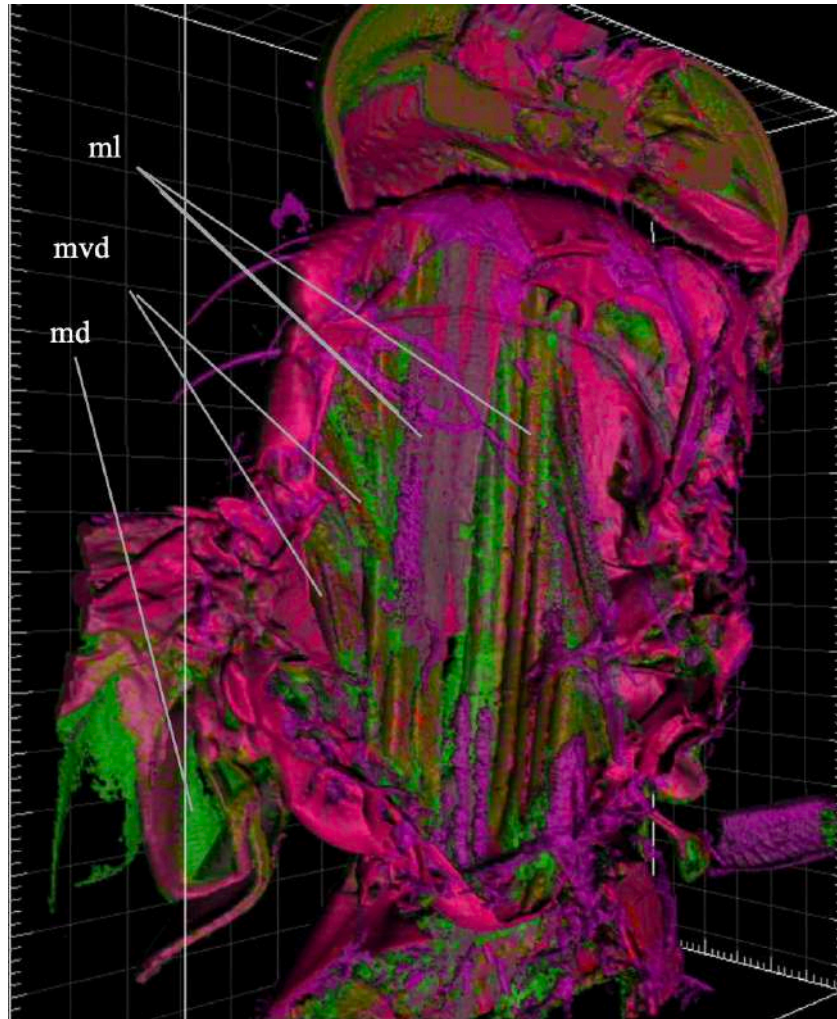


Illustration 31 – Arrêt sur image d'une vidéo d'une représentation 3D du thorax de *Stomoxys calcitrans* en vue de trois-quart au microscope confocal

(ml : Muscles longitudinaux, md : Muscles directionnels, mvd : Muscles ventro-dorsaux)

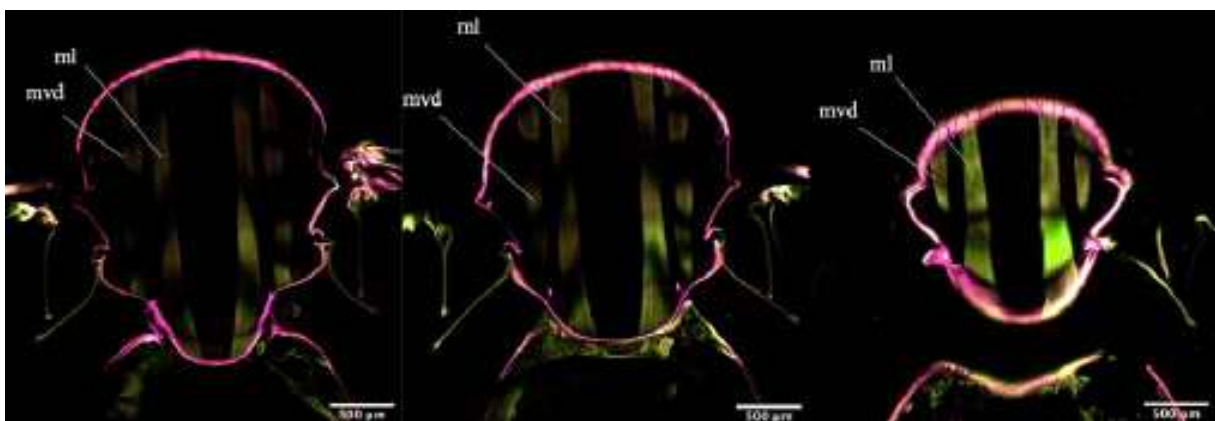


Illustration 32 – Coupes sagittales du thorax de *Stomoxys calcitrans* allant du plus ventral (à gauche) au plus dorsal (à droite) au microscope confocal

(ml : Muscles longitudinaux, mvd : Muscle dorso-ventraux)

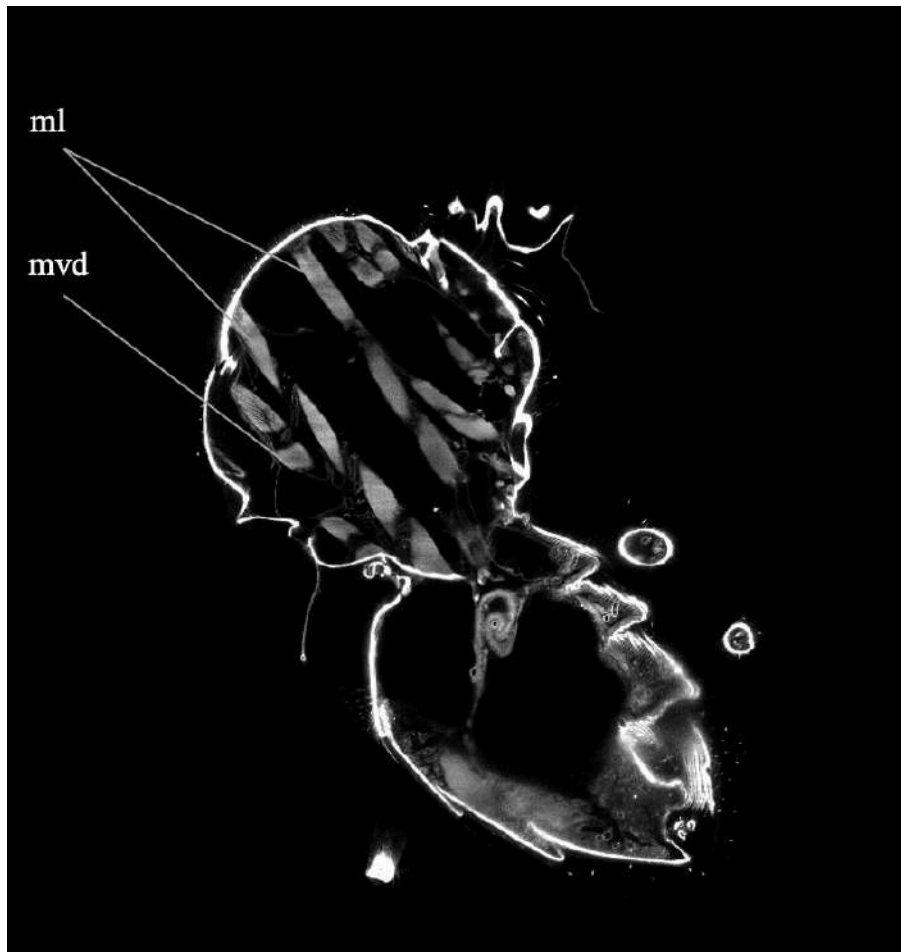


Illustration 33 – Acquisition de Stomoxys calcitrans (J8, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence des différents types de muscles thoraciques

(ml : Muscles longitudinaux, vd : Muscles ventro-dorsaux)

2 – L'appareil reproducteur femelle

Chez la femelle, on va retrouver deux ovaires (Illustration n°34) composés chacun d'une soixantaine d'ovarioles (Figure n° 23) (tubes ovigères), qui seront arrangés en sphère autour du centre de l'ovaire. Chaque ovariole possède un filament terminal à leur extrémité distale, et un pédicelle à leur extrémité proximale, qui se rejoignent tous pour former le calice.

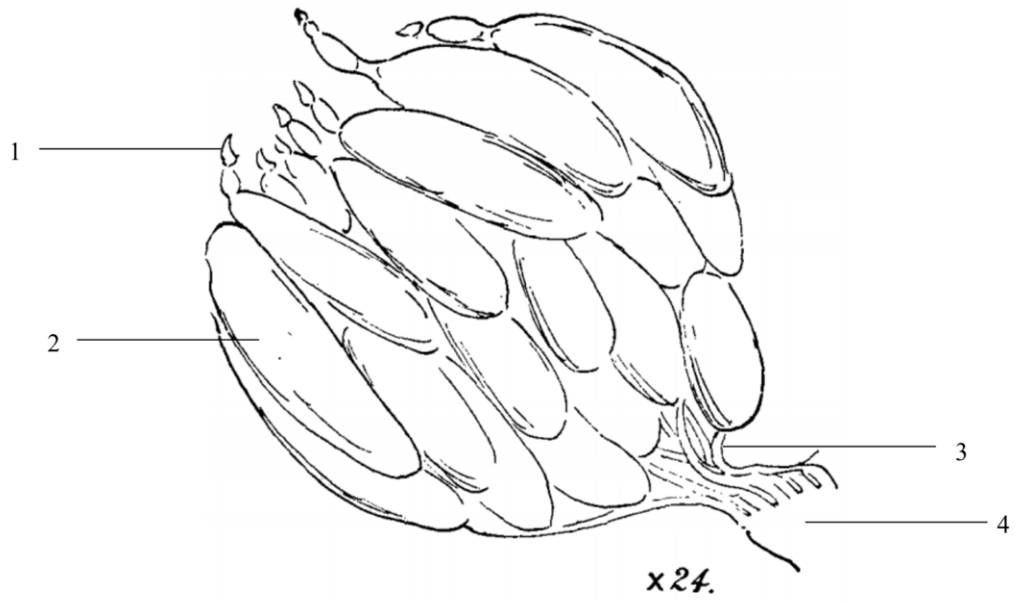


Figure 23 - Ovaire de *Stomoxys calcitrans* (d'après (Tulloch 1906)

(1 : Filament terminal, 2 : Ovariole, 3 : Pédicelle, 4 : Calice)

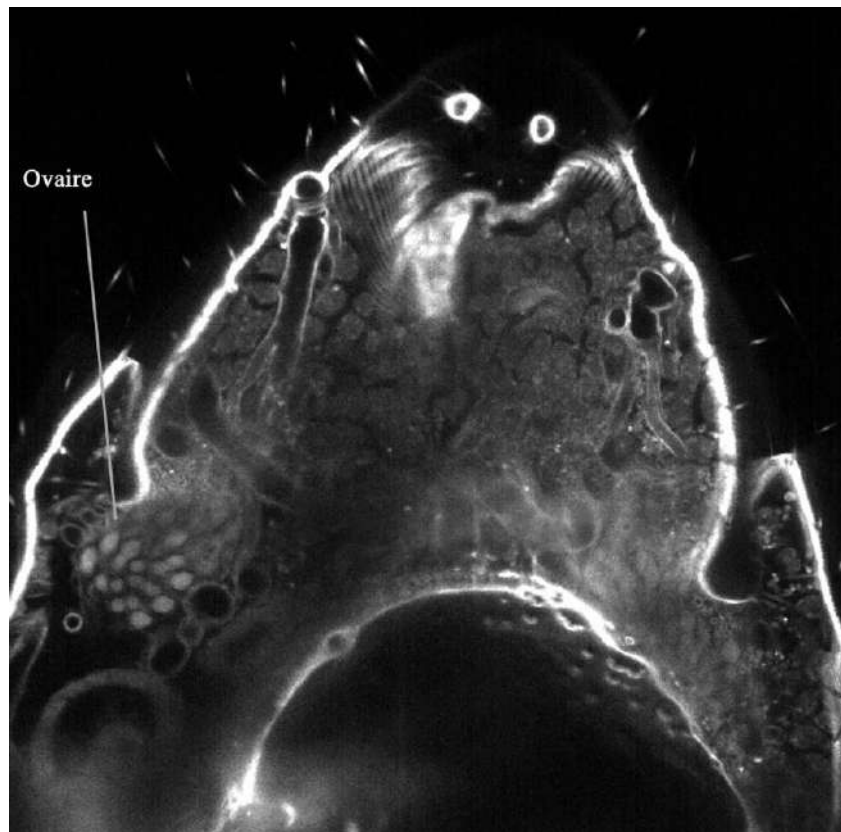


Illustration 34 - Coupe sagittale de l'abdomen de *Stomoxys calcitrans* (J12, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence d'un ovaire

3 – Le système nerveux central

Le cerveau (Illustration n°35), composé du ganglion sous-oesophagien et du ganglion thoraco-abdominal, est situé au niveau de la tête en position dorsale. Il se compose principalement de trois régions : le *protocerebrum* ou cerveau antérieur, le *deutocerebrum* ou cerveau moyen, et le *tritocerebrum* ou cerveau postérieur (Figure n°24). Le cerveau présente un axe de symétrie antéro-postérieur, et la liaison entre les deux lobes est assurée par des faisceaux appelées commissures (Chapman et al. 2013 ; Dajoz, 2010) . Le *protocerebrum* est la région la plus volumineuse, et tient principalement le rôle de centre optique chez le stomoxe. Il est formé de deux lobes qui se prolongent jusqu'aux lobes optiques en s'y insérant latéralement. Au centre de ces lobes se situe une région appelée *pars intercerebralis*, région d'où partent les nerfs ocellaires. Le *deutocerebrum* est formé de deux lobes antennaires qui contiennent les centres sensitifs et moteurs des antennes. La taille de ce lobe est fonction du nombre de sensilles sur les antennes. Enfin les lobes du *tritocerebrum* sont de taille plus petite et séparés par l'oesophage. Ils innervent les palpes maxillaires, le labium et les glandes salivaires.

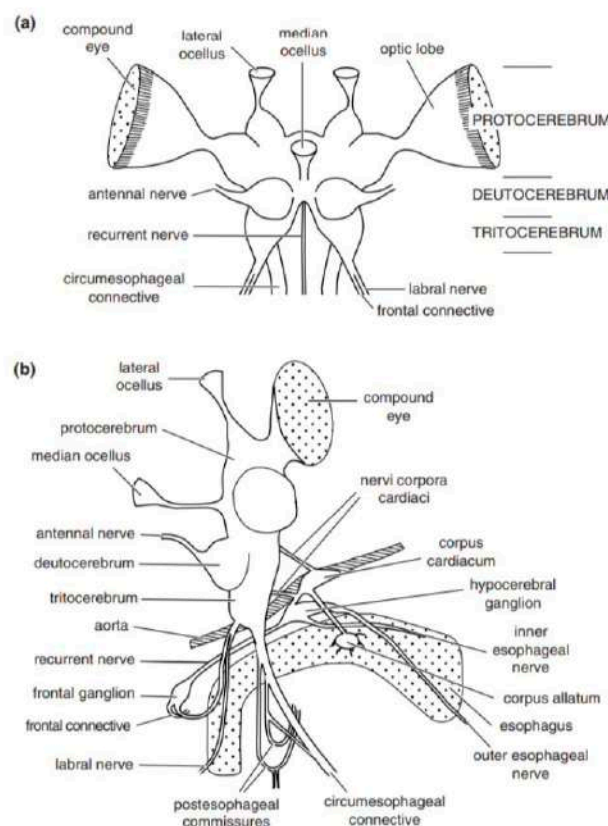


Figure 24 - Cerveau d'insecte (a) = Vue antérieure ; (b) = Vue latérale gauche (d'après Chapman et al. 2013)

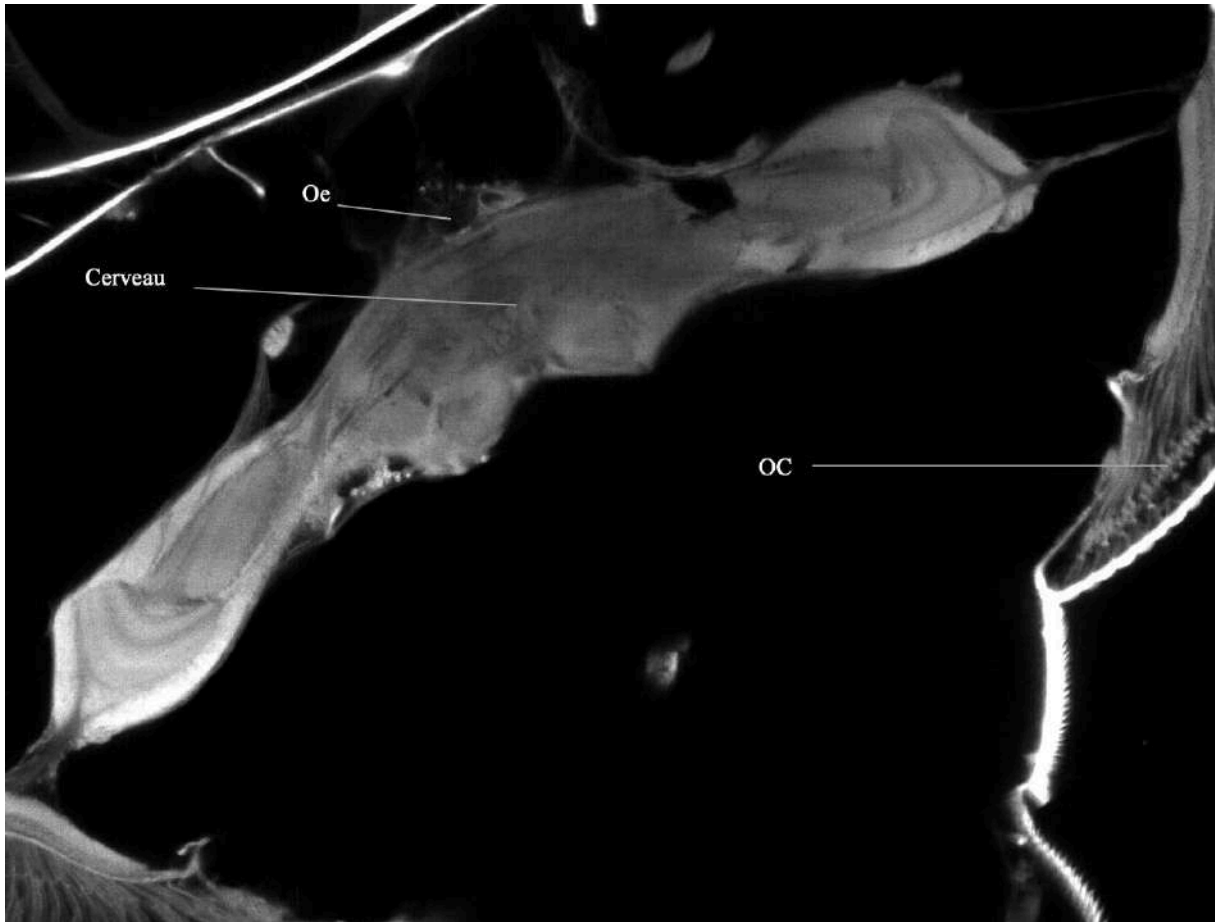


Illustration 35 - Coupe sagittale de la tête de Stomoxys calcitrans, (J15, gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence du cerveau

(Oe : Œsophage, OC : Œil composé)

4 – Le système digestif

Les glandes salivaires

Le stomoxe possède deux glandes salivaires (Figure n°25), de structure tubulaire, qui s'étendent du thorax à l'abdomen. Elles se localisent ventralement, et crânialement par rapport au jabot. A l'entrée de la tête, à la base du cerveau on distingue le canal salivaire unique, qui se divise ensuite dans la partie crâniale du thorax en deux tubes de diamètre constant sur toute leur longueur, et qui se terminent en deux culs de sac (Illustrations n° 36, 37).

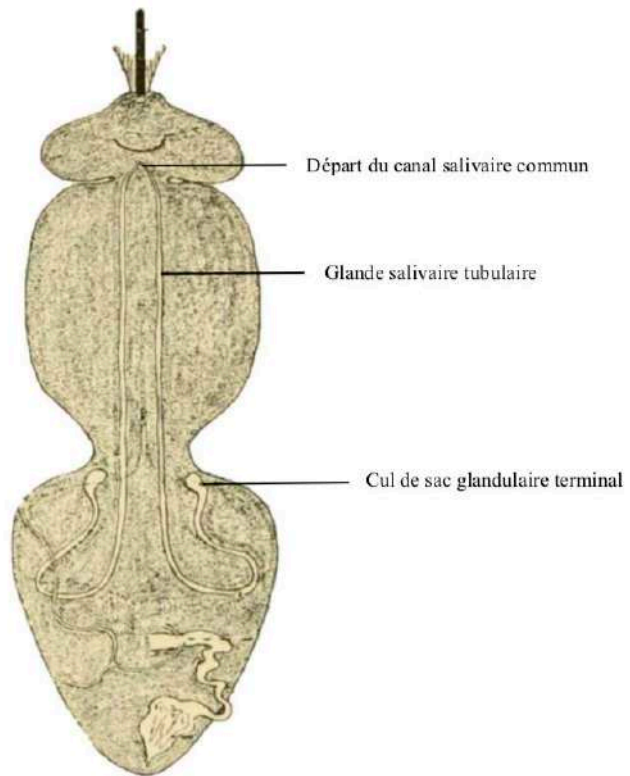


Figure 25 – Position anatomique des glandes salivaires de *Stomoxys calcitrans*
 (d'après Entomological Society of America, 1908)

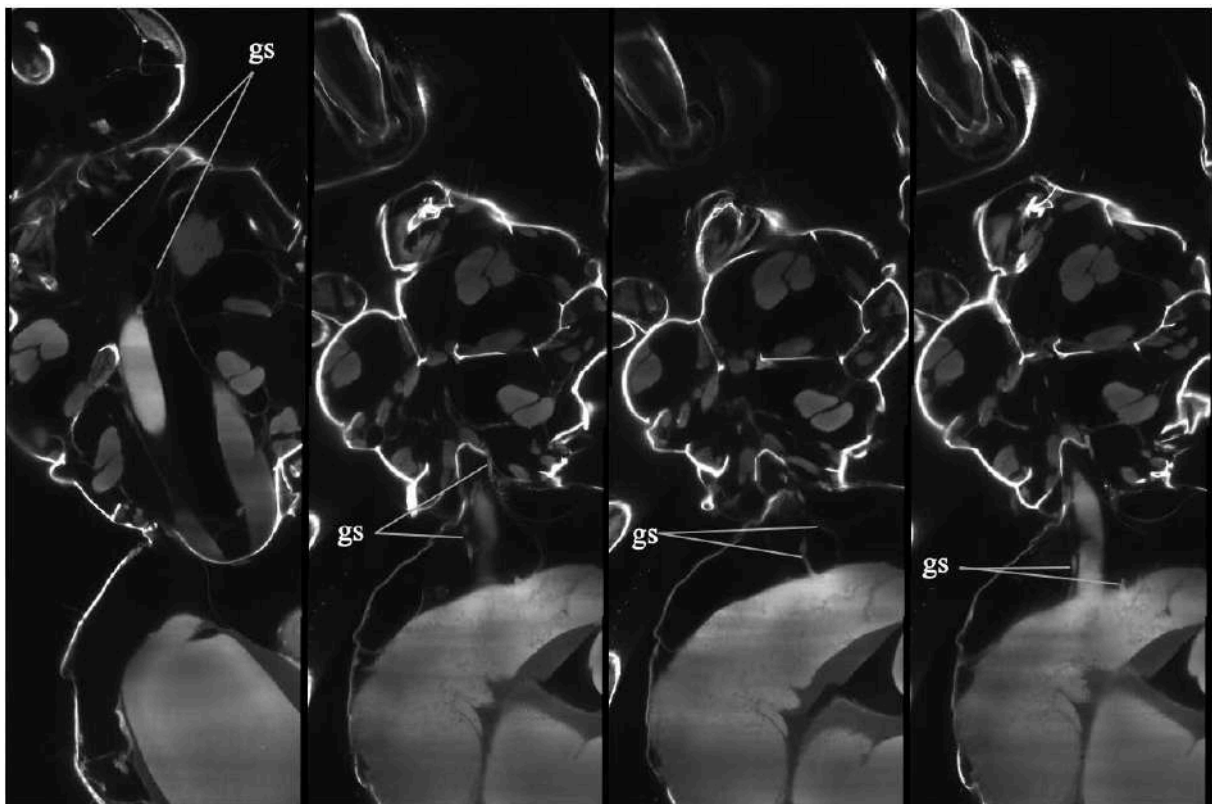


Illustration 36 – Acquisitions de *Stomoxys calcitrans* (J15, gorgé) au microscope à feuilles de lumière avec mise en évidence des glandes salivaires (gs) (plusieurs coupes transversales de la plus ventrale à gauche à la plus dorsale à droite)



Illustration 37 - Coupe sagittale de l'abdomen de *Stomoxys calcitrans* (J15, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence des glandes salivaires

Le système intestinal

Le système digestif (Figure n°26) comprend trois segments, limités par une seule couche de cellules : le segment antérieur est le *stomodeum* ou intestin antérieur ; le segment médian est le mésentéron ou intestin moyen ; le segment postérieur est le *proctodeum* ou intestin postérieur.

L'intestin antérieur est divisé en plusieurs régions : la région buccale, le pharynx, l'œsophage, le jabot et le proventricule ou gésier. Le jabot est une poche servant à stocker la nourriture. Le proventricule ou gésier est peu développé chez les stomoxes, ne possédant pas de pièces buccales de type broyeur mais piqueur. L'intestin moyen (Figure n°27), composé d'un unique organe tubulaire appelé *ventriculus*, est le lieu de l'assimilation des nutriments. L'intestin postérieur, composé du pylore, du côlon et du rectum, lui, est le lieu de stockage et de l'absorption de l'eau.

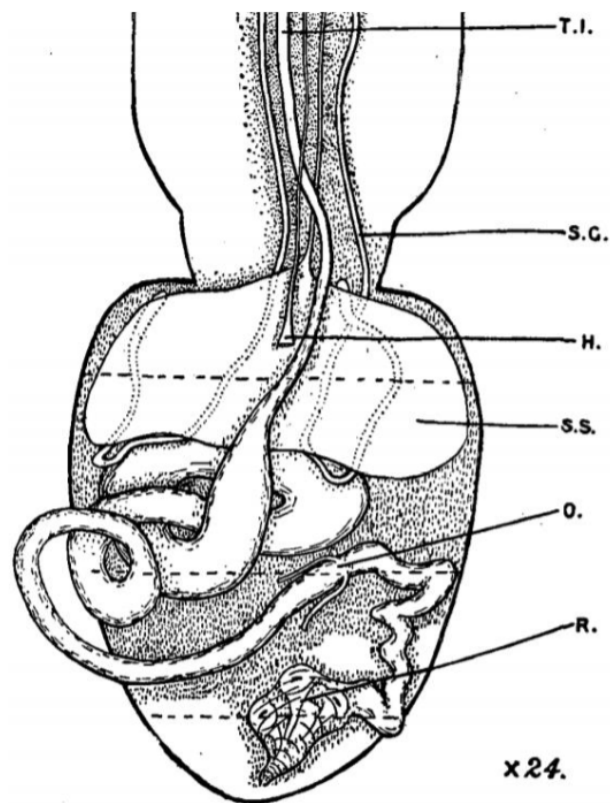


Figure 26 - Anatomie de l'intestin moyen de *Stomoxys calcitrans* (d'après Tulloch, 1906)

(TI = Intestin moyen thoracique ; SG = Glande salivaire ; H = Vaisseau dorsal ; SS = Jabot ; O = Pylore ; R = Ampoule rectale)

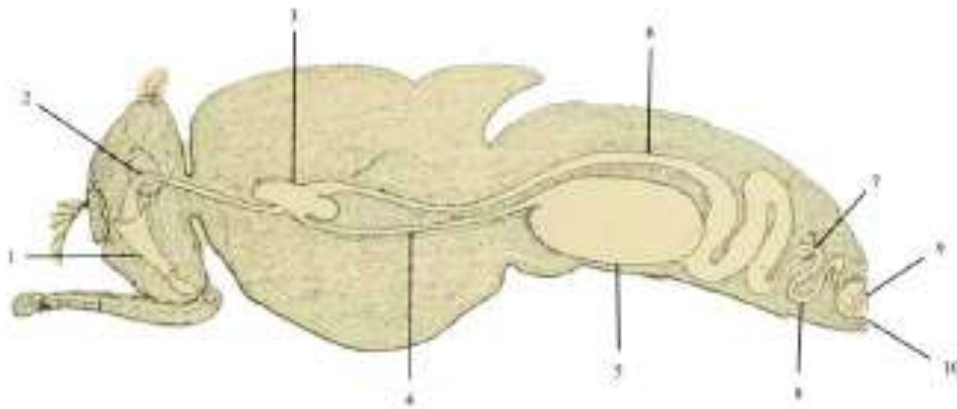


Figure 27 - Système digestif de *Stomoxys calcitrans* (d'après Entomological Society of America, 1908)

(1 : Pharynx ; 2 : Œsophage ; 3 : Proventricule ; 4 : Conduit du jabot ; 5 : Jabot ; 6 : Intestin moyen ; 7 : Pylore ; 8 : Iléon ; 9 : Ampoule rectale ; 10 : Anus)

L'intestin antérieur

La juxtaposition du labre et de la gouttière labiale constitue le canal alimentaire (Illustration n°38). Il se prolonge dans la capsule céphalique par le pharynx, qui possède une forme grossièrement triangulaire (Illustration n°39). L'œsophage émergeant du pharynx est large et aplati, puis devient progressivement plus étroit et adopte une forme cylindrique bien définie (Illustration n°40). Il finit sa course dans le tiers antérieur du thorax en entrant dans le proventricule au niveau de sa face. L'intestin s'abouche sur sa face dorsale, et le jabot sur sa face ventrale.

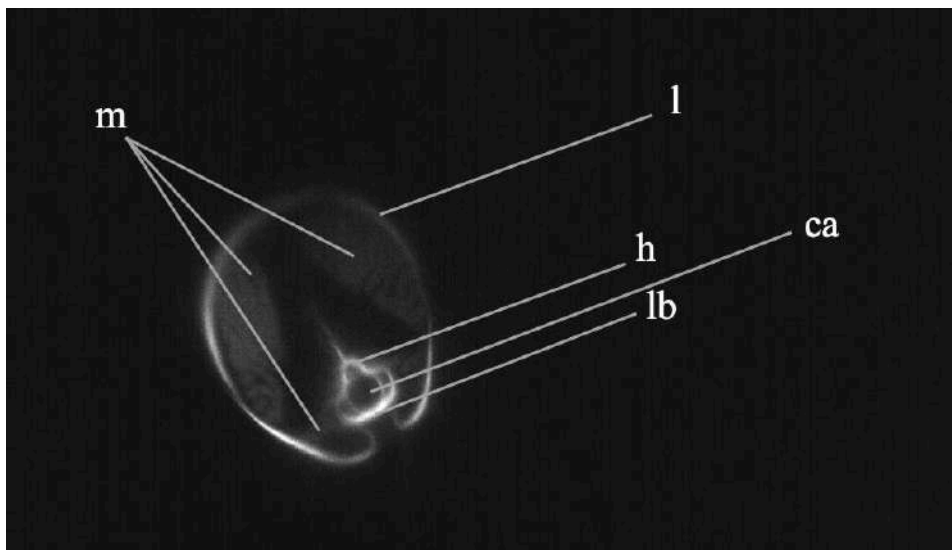


Illustration 38 - Coupe transversale des pièces buccales de *Stomoxys calcitrans* (J12, non gorgé) au microscope à feuille de lumière

(m : Muscles, l : Labre, h : Hypopharynx, lb : Labium, ca : Canal alimentaire)

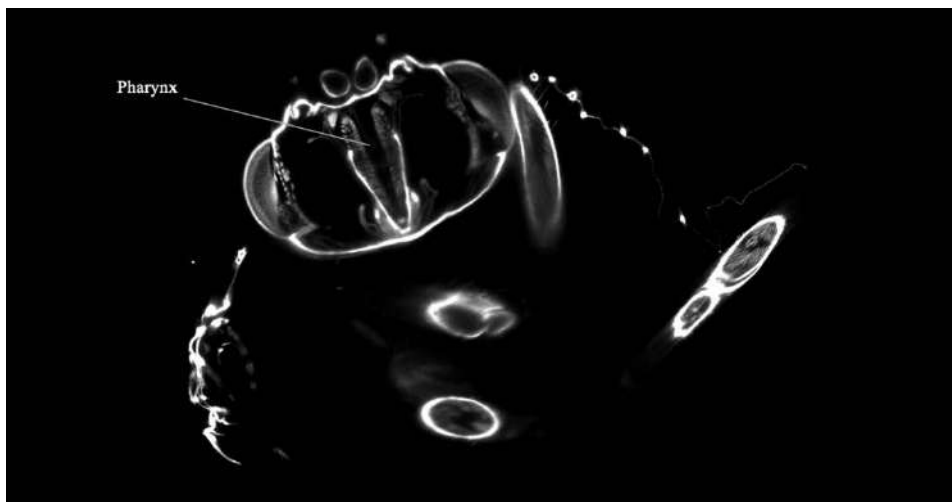


Illustration 39 - Coupe sagittale de la tête de *Stomoxys calcitrans* (J8, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence du pharynx

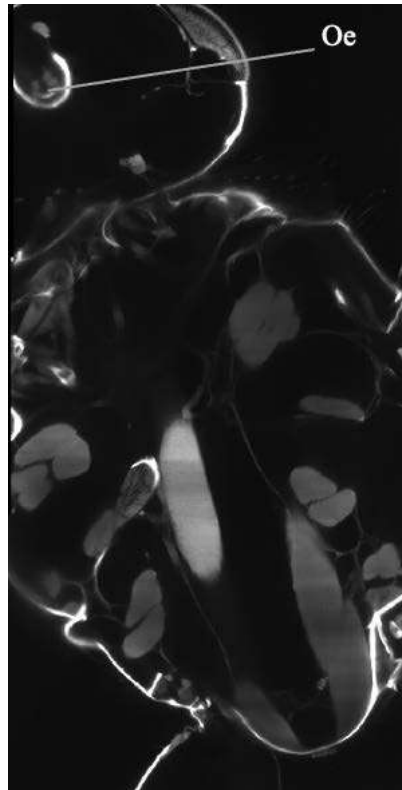


Illustration 40 - Coupe sagittale de Stomoxys calcitrans (J15, gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence de l'œsophage (Oe)

Le proventricule se situe au niveau du tiers antérieur du thorax. Il a la forme « d'un chapeau de champignon » dont la partie ventrale est concave et la partie dorsale convexe (Illustration n°41). Comme vu précédemment, au niveau de la partie ventrale concave s'abouche l'œsophage et s'insère le conduit du jabot. L'intestin moyen débute sur sa face dorsale convexe.

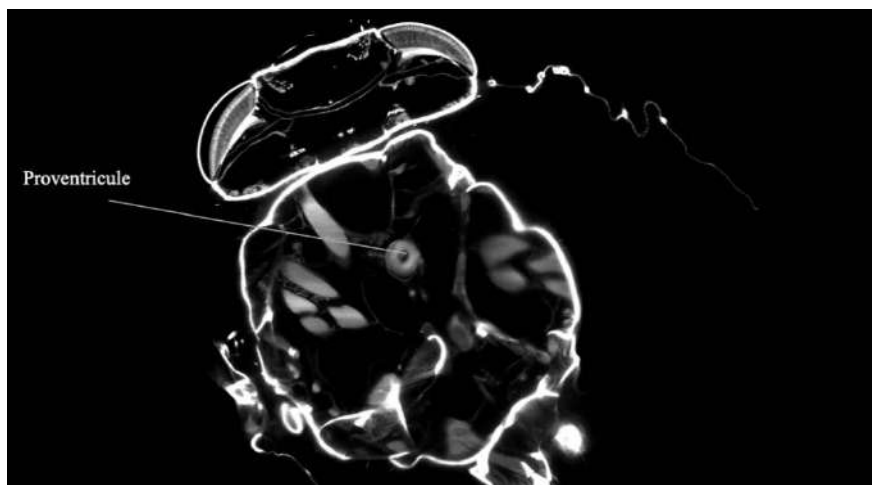


Illustration 41 - Coupe sagittale au microscope à feuille de lumière de la tête et du thorax de Stomoxys calcitrans (J8, non gorgé) avec mise en évidence du proventricule

Le jabot se situe au tiers antérieur de l'abdomen, au-dessous de l'intestin moyen, mais lorsqu'il est rempli après un repas de sang il peut occuper la quasi-totalité de la cavité abdominale. Immédiatement après le repas, le sang est stocké dans le jabot, augmentant considérablement le volume abdominal du stomoxe et lui donnant une couleur rougeâtre. Il se vide dans les cinq à trente minutes qui suivent le repas de sang (Figure n°29). Le sang passe par la suite en sens inverse dans le conduit du jabot pour arriver dans le proventricule et transiter vers l'intestin moyen où il sera digérée.

Intestin moyen

L'intestin moyen mesure environ trois fois la longueur du stomoxe, et se divise en plusieurs parties (Figure n°28). On retrouve la portion thoracique, la zone réservoir (zone qui réalise trois spires dans l'abdomen), et enfin la portion terminale, composée par la zone opaque et la zone lipoïde. C'est dans la zone réservoir que le sang va être stocké (Illustration n°44) puis déshydraté, constituant la première zone d'absorption de l'eau. Ensuite, la grande majorité de la sécrétion enzymatique a lieu au sein de la zone opaque, et enfin la zone lipoïde est la dernière zone d'absorption des nutriments (Illustrations n°42, 43).

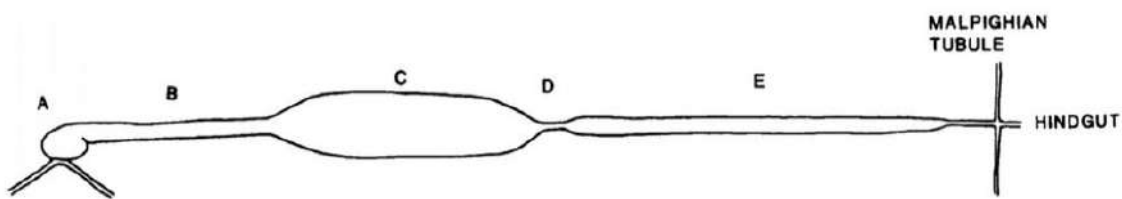


Figure 28 - Régions de l'intestin moyen de *Stomoxys calcitrans* (d'après Jordão et al. 1996)

(A : Proventricule, B : Portion thoracique, C : Zone réservoir abdominale, D + E : Portion étroite terminale : Zone opaque + Zone lipoïde)

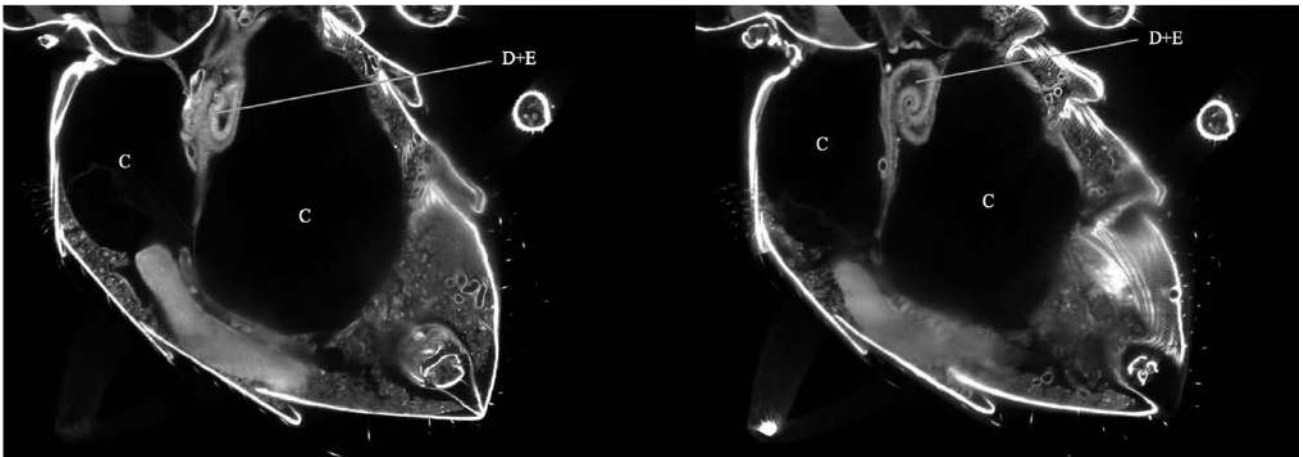
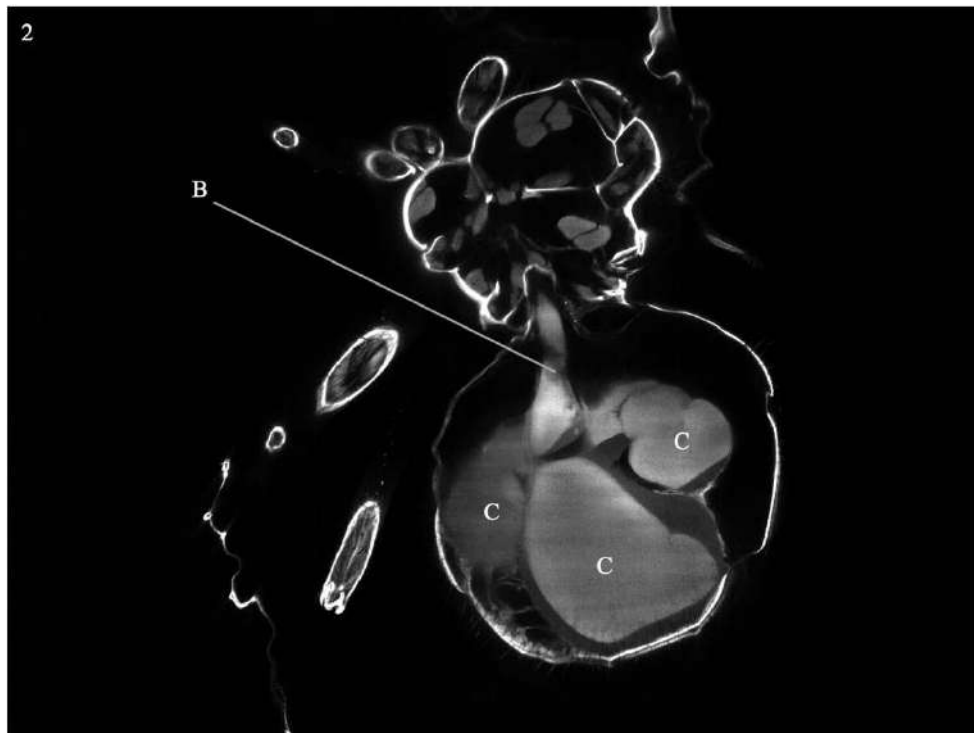
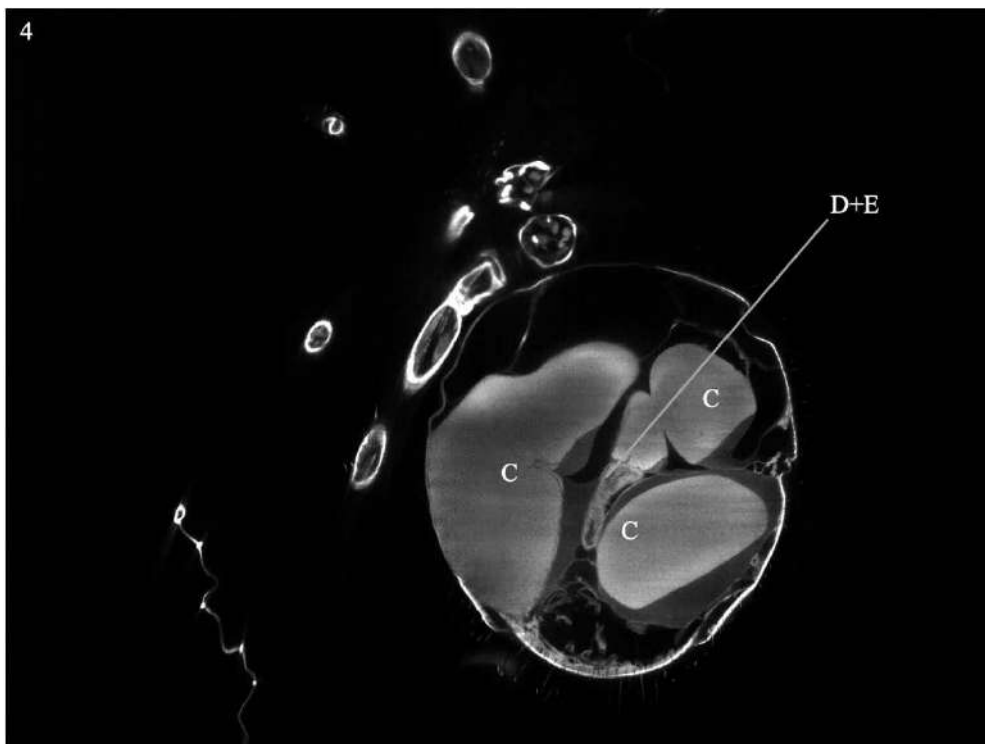
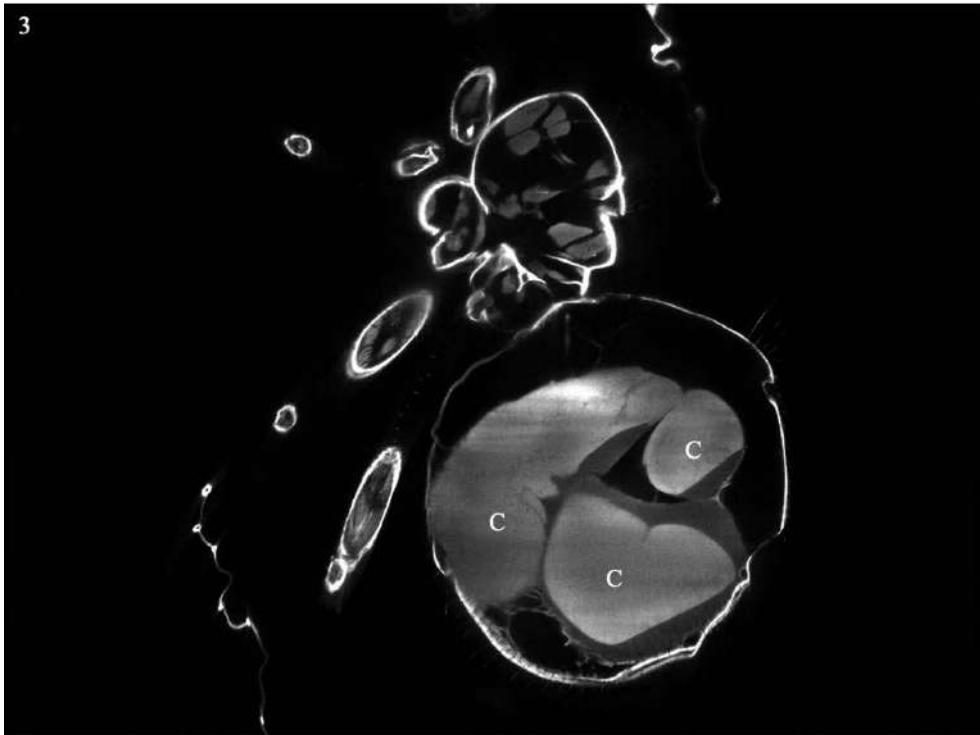


Illustration 42 - Coupes sagittales de l'abdomen de *Stomoxys calcitrans* (J8, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence de l'intestin moyen

(C : Zone réservoir, D+E : Portion étroite terminale)





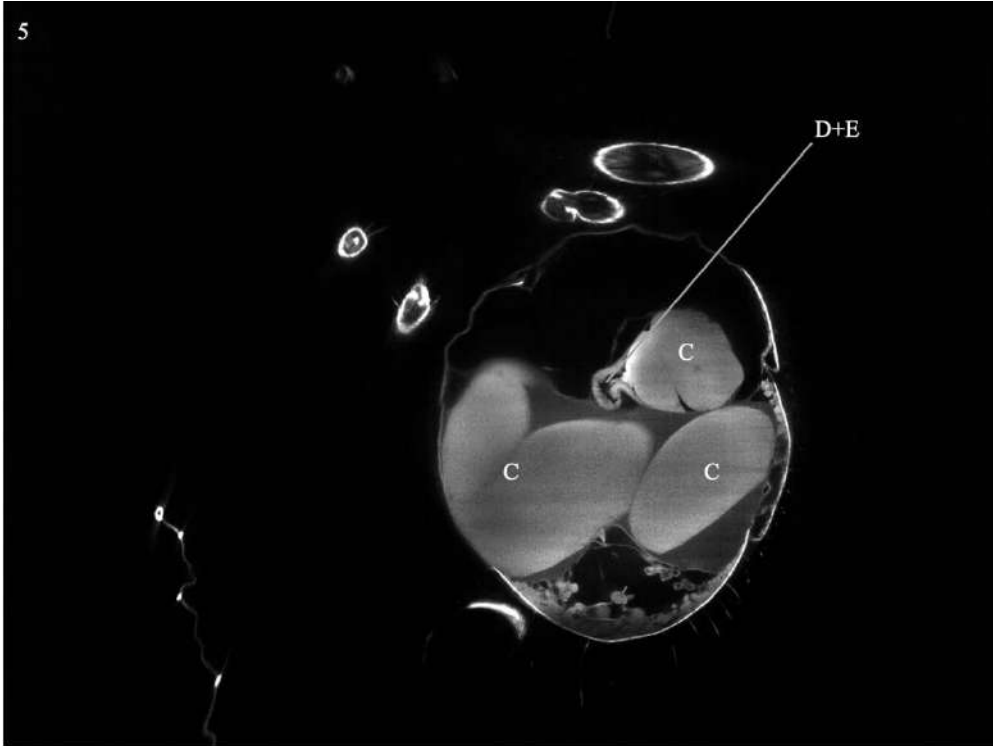


Illustration 43 - Coupes sagittales de l'abdomen de *Stomoxys calcitrans* (J15, gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence de l'intestin moyen

(B : Portion thoracique, C : Zone réservoir, D+E : Portion étroite terminale, allant de 1, la plus dorsale à 5, la plus ventrale)

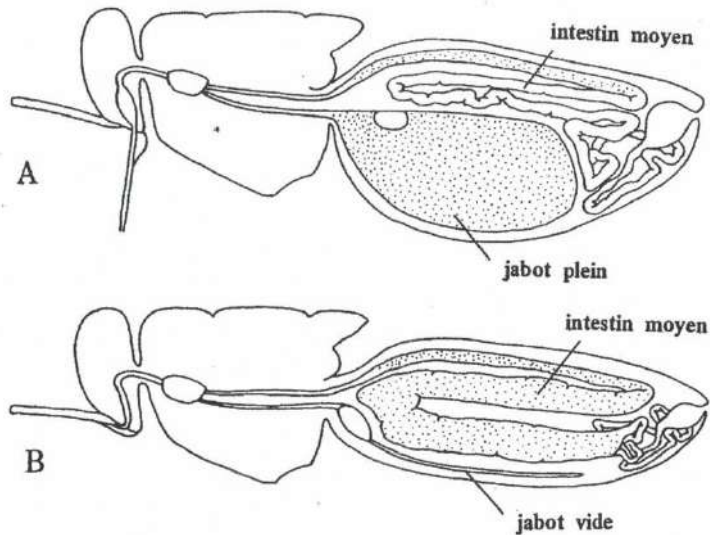


Figure 29 - Représentation schématique du jabot et de l'intestin moyen au cours de la digestion (A, immédiatement après le repas de sang; B, quelques heures plus tard, d'après www.fao.org)

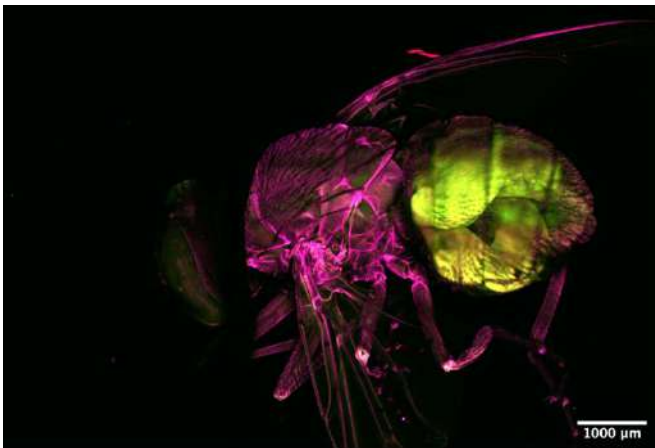


Illustration 44 - Intestin moyen de Stomoxys calcitrans gorgé au microscope confocal

Le jabot n'a pas pu être visualisé sur aucune de nos acquisitions. Une des hypothèses probables est qu'il soit beaucoup trop fin pour apparaître sur les plans que nous avons, quand il n'est pas gorgé.

Intestin postérieur

Le pylore est constitué de fibres musculaires circulaires lui permettant d'agir comme un sphincter ; il contrôle ainsi le passage du bol alimentaire de l'intestin moyen vers l'intestin postérieur et empêche les reflux (Chapman et al. 2013). Le côlon possède un diamètre constant, réalise plusieurs courbures au sein de l'abdomen postérieur. Le rectum (Figure n°30) se dilate en forme de poire, d'où le nom d'ampoule rectale (Illustration n°45). Cette dernière contient quatre longues papilles rectales ayant la forme de cônes qui se fixent à l'anus par des extrémités étroites (Illustrations n°46).

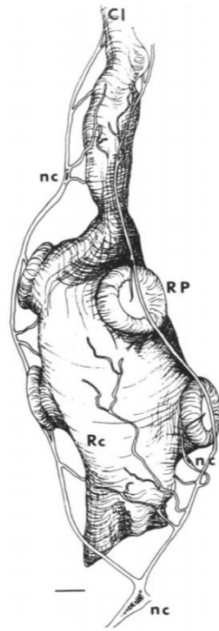


Figure 30 - Rectum et papilles rectales de *Stomoxys calcitrans* (d'après Cook et al. 1991)

(CI : Côlon, Rc : Rectum, RP : Papille rectale, nc : Nerf proctodéal)

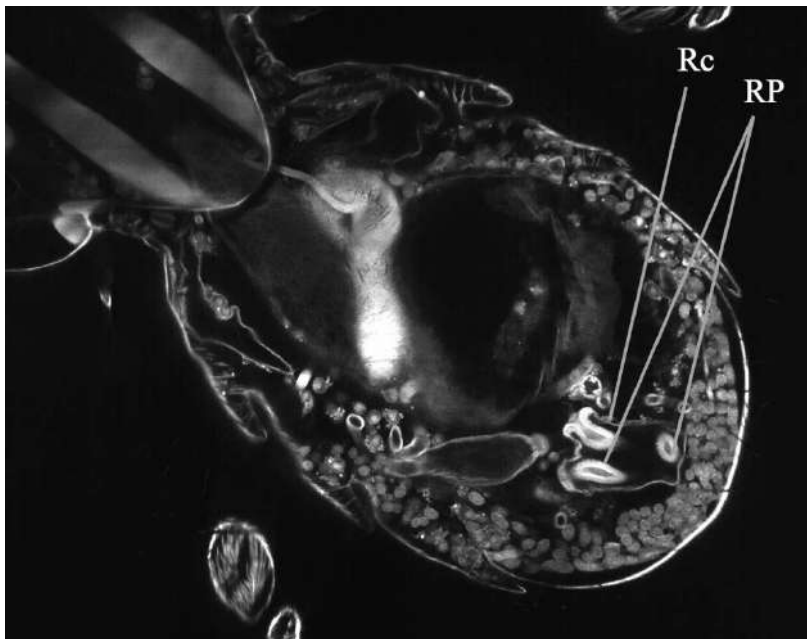


Illustration 45 - Coupe sagittale de l'abdomen de *Stomoxys calcitrans* (J15, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence de l'intestin postérieur

(RC : Rectum, RP : Ampoule rectale)

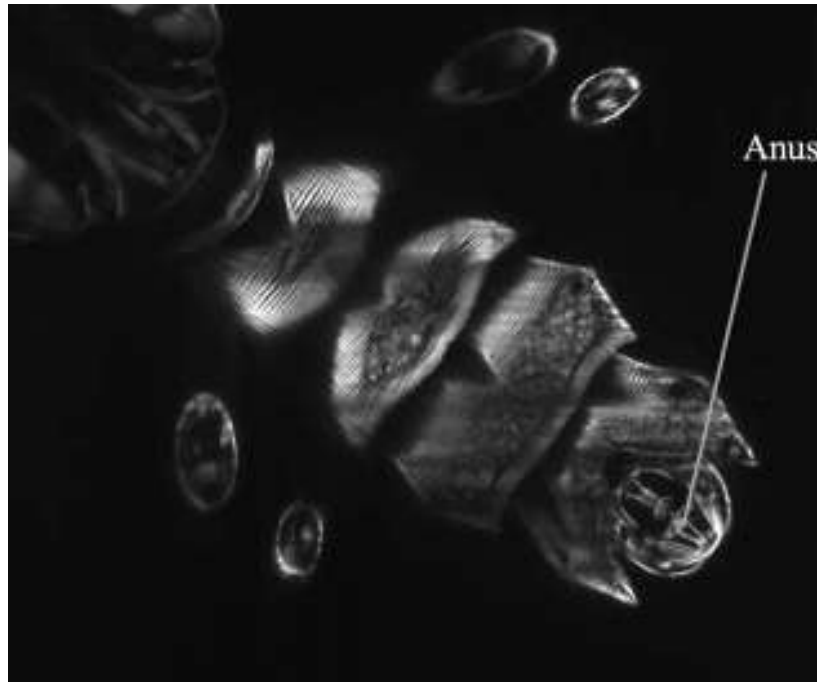


Illustration 46 - Coupe sagittale de l'abdomen de Stomoxys calcitrans (J15, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence de l'anus

Les tubes de Malpighi

Stomoxys calcitrans possède quatre tubes de Malpighi. Ils sont arrangés en deux paires, et s'insèrent via un conduit commun de part et d'autre du pylore. Enfin de ses deux tubes partant du pylore partent deux longs tubules fins se terminant en culs de sac, baignant dans la cavité abdominale (Illustration n°47,48) (Dajoz 2010). Chaque tube mesure environ 15 mm mais la largeur peut varier entre les deux paires (Figure n°31). En effet, la paire se situant dorsalement aux organes abdominaux possède une extrémité distale fortement élargie alors que la paire ventrale garde le même diamètre sur sa longueur. Ces organes sont les principaux organes d'excrétion des déchets de l'hémolymphe et ils réabsorbent également une partie de l'eau filtrée. On peut les comparer aux reins pour les mammifères. Ils vont s'occuper de produire l'urine primitive, dont les composés principaux sont l'ammoniac, l'urée et l'acide urique comme pour les vertébrés, ainsi que le calcium, le chlorure et le phosphate. Ces déchets arrivent ensuite au pylore puis sont éliminés par voie rectale. En plus de leur rôle d'excrétion et de réabsorption, les tubes de Malpighi sont également impliqués dans la régulation de l'homéostasie, du pH intestinal et de l'immunité.

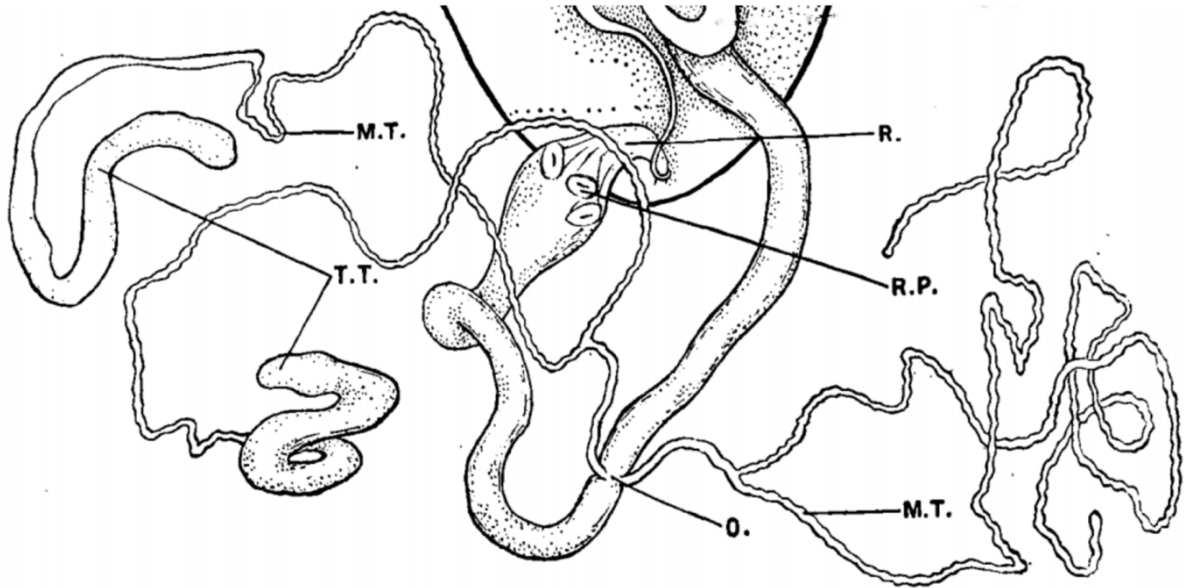


Figure 31 - Tubes de Malpighi de *Stomoxys calcitrans* (Tulloch 1906)

(MT = Tube de Malpighi ; TT = Terminaison épaisse de la paire dorsale ; O = Pylore, origine des conduits communs ;
 RP = Papilles rectales ; R = Rectum)

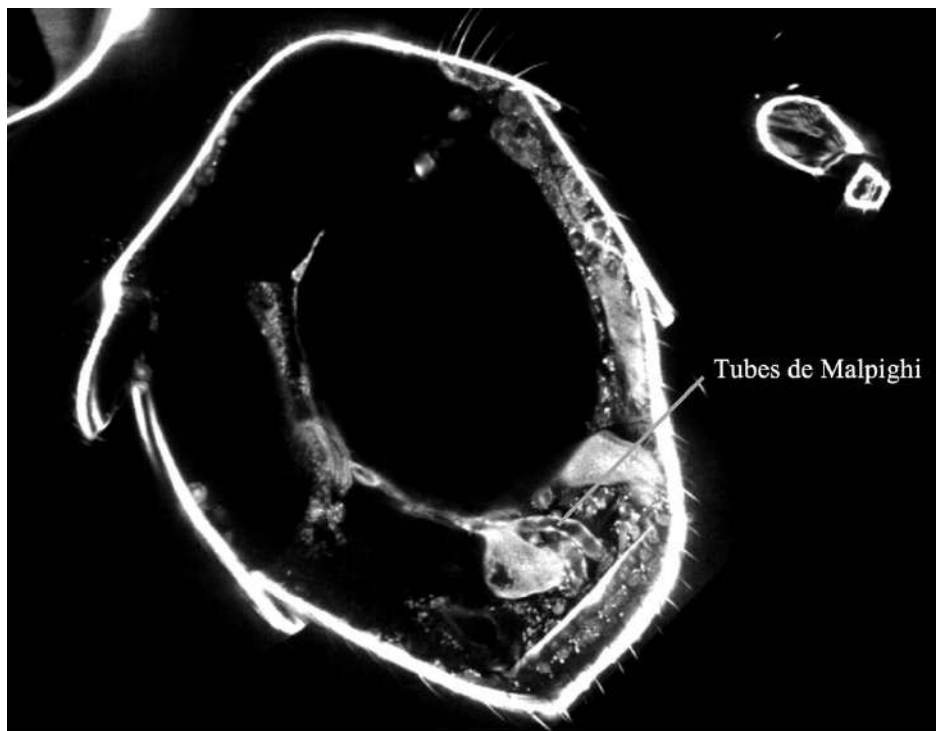


Illustration 47 - Coupe sagittale de l'abdomen de *Stomoxys calcitrans* (J8, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence des tubes de Malpighi

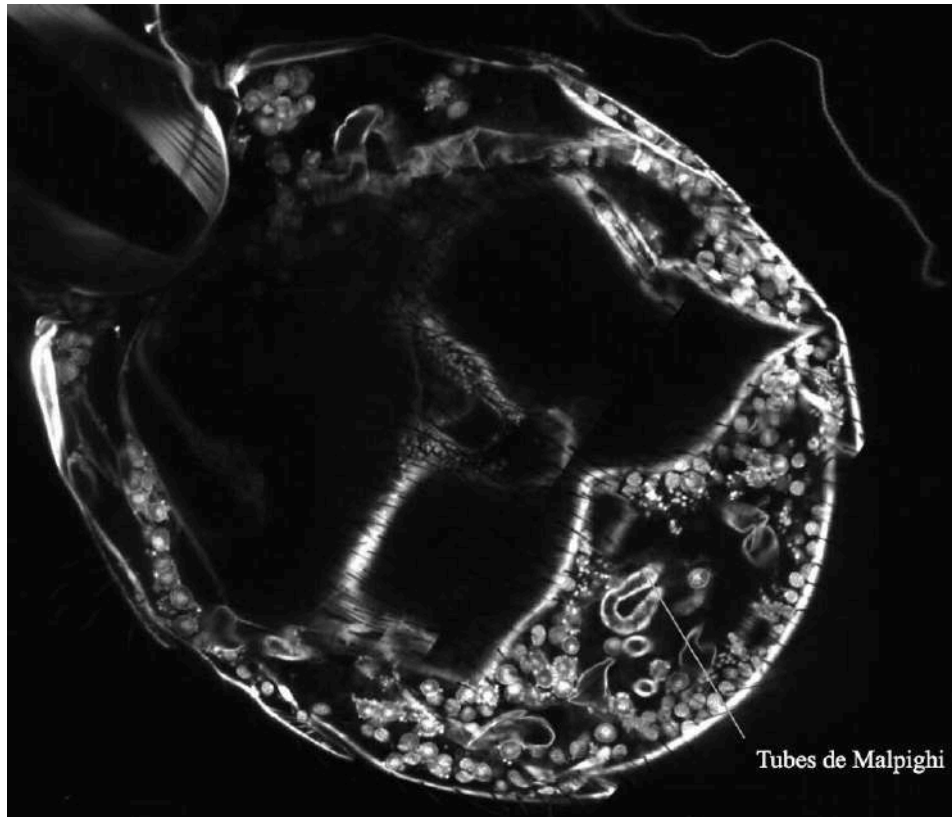


Illustration 48 - Coupe sagittale de l'abdomen de *Stomoxys calcitrans* (J15, non gorgé) au microscope à feuille de lumière avec mise en évidence des tubes de Malpighi

5 – Le système respiratoire

Chez les insectes, la respiration se fait par un système de trachées (Figure n°33) qui se développe au cours de la vie embryonnaire à partir d'invagination ectodermique disposées métamériquement sur les côtés du corps. Ces orifices deviendront des stigmates. Ainsi le système trachéal s'ouvre à l'extérieur via ces stigmates qu'on retrouve sur le thorax et l'abdomen. Chez *Stomoxys calcitrans*, on retrouve deux paires de stigmates sur le thorax, une placée en avant de l'épistérne et l'autre sous les cuillerons, on retrouve également quatre paires au niveau de l'abdomen, à chaque jonction entre tergite et sternite, sur chaque segment.

Les stigmates sont les ouvertures des trachées au niveau de la cuticule (Illustration n°49), dont l'orifice débouche sur une chambre nommée atrium au niveau de laquelle la trachée s'insère. On retrouve au niveau de cet atrium des extensions cuticulaires servant de filtre, en plus de valves sous commande musculaire séparant la chambre et la trachée. Cet ensemble sert principalement à empêcher la poussière, les micro-organismes et l'eau d'entrer. A l'inverse, il empêche aussi la dessiccation de l'insecte.



Illustration 49 - Abdomen de Stomoxys calcitrans en vue ventro-dorsale au microscope confocal

On distingue deux gros troncs trachéens appelés troncs trachéaux longitudinaux, qui s'étendent de chaque côté du corps du stomoxe. Ils se ramifient ensuite de manière indépendante, réduisant ainsi le diamètre des trachées, pour finir sur les trachéoles où se réalisent les échanges gazeux (Illustration n°51,52).

Les trachées étant des invaginations ectodermiques tubulaires recouvertes à l'intérieur par une fine cuticule en continuité avec celle de l'exosquelette, elles apparaissent sur les projections de haute intensité et sur les reconstructions 3D du microscope confocal (Illustration n°50) de la même couleur que l'exosquelette du stomoxe (rose).

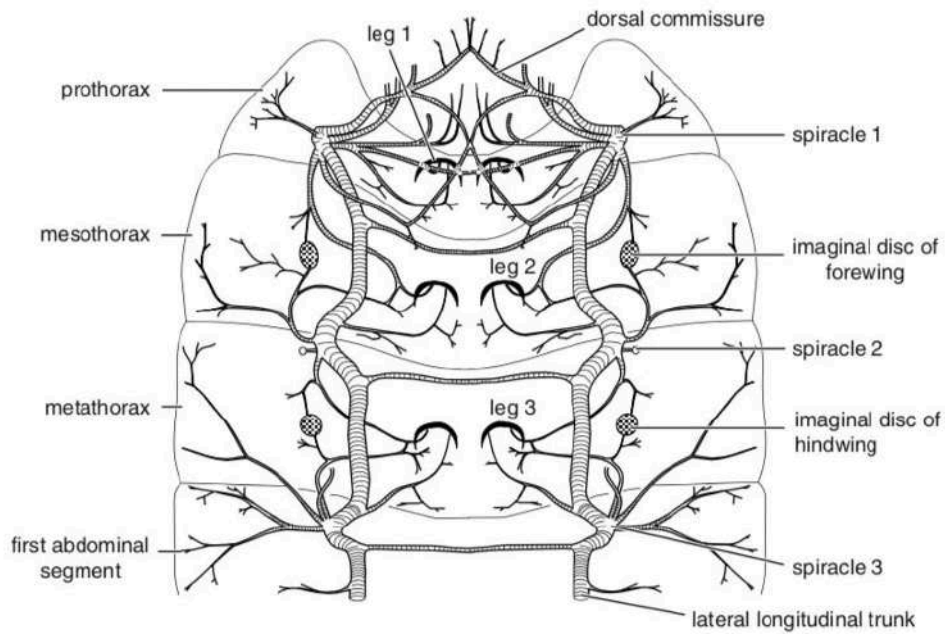


Figure 32 - Organisation du système trachéen d'un diptère (d'après Chapman et al. 2013)

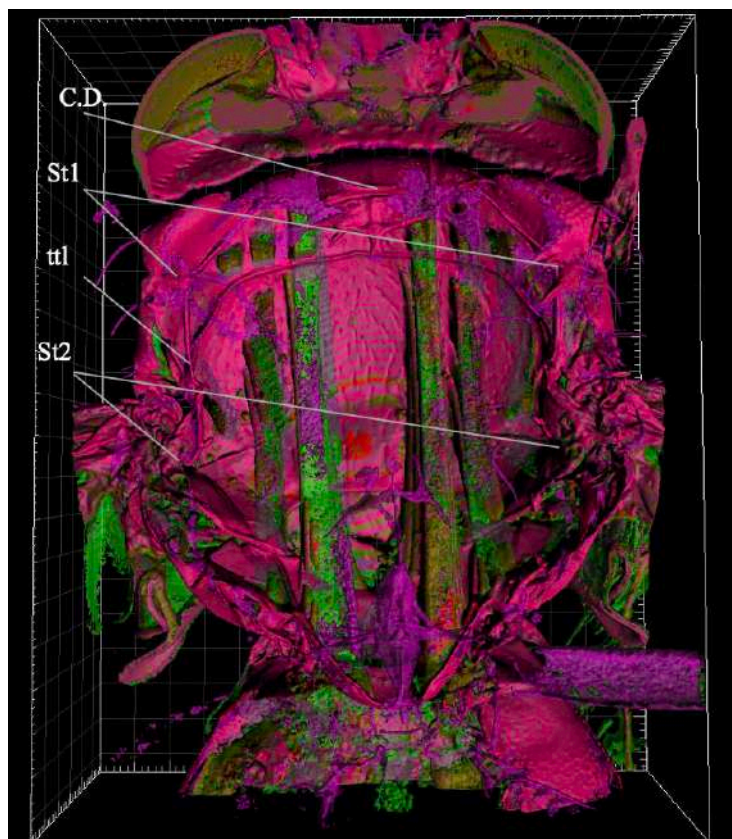


Illustration 50 - représentation 3D du thorax de *Stomoxys calcitrans*, en vue ventro-dorsale au microscope confocal, avec son système trachéal

(C.D.: Commissure dorsale, St1 : Stigmate 1, St2 : Stigmate 2, ttl : Tronc trachéal longitudinal)

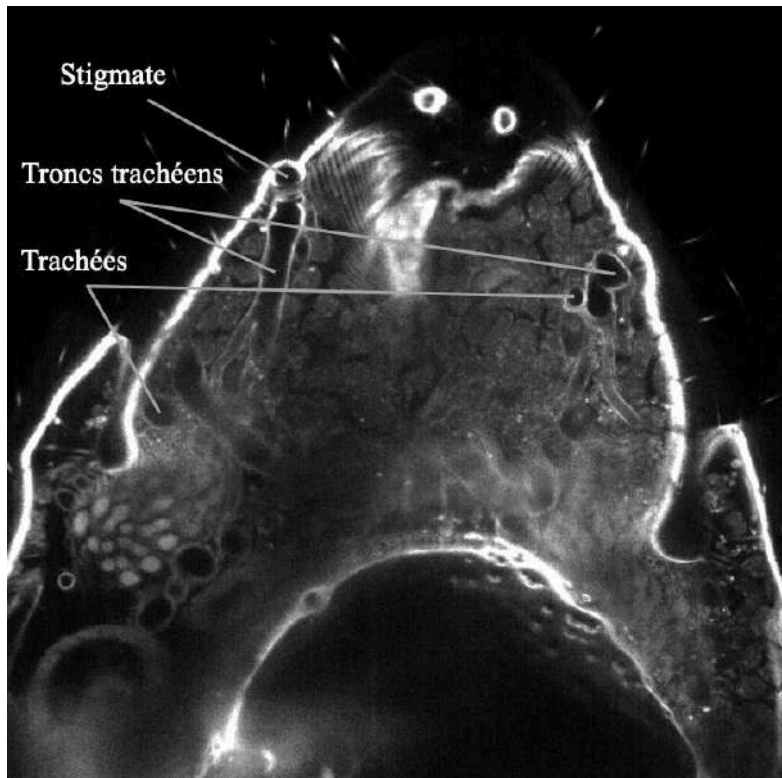


Illustration 51 - Coupe sagittale de l'abdomen de Stomoxys calcitrans (J12, non gorgé) au microscope à feuille de lumière et mise en évidence de son système respiratoire

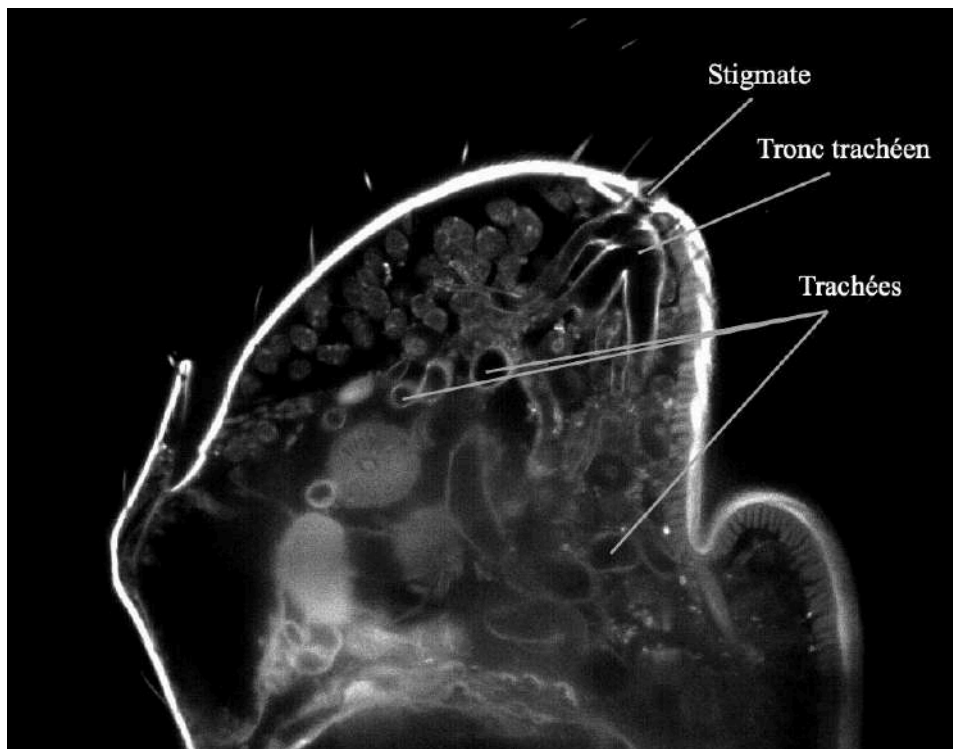


Illustration 52 - Coupe médiane de l'abdomen de Stomoxys calcitrans (J12, non gorgé) au microscope à feuille de lumière et mise en évidence de son système respiratoire

IV – Discussion

Cette thèse met en avant une méthode aujourd'hui encore très peu utilisée pour l'étude anatomique des insectes. En effet, la microscopie par fluorescence est une méthode récente, moderne et innovante.

De ce fait, la première partie bibliographique reprenant point par point le principe de la fluorescence et la description des trois microscopes utilisés aujourd'hui avait pour objectif avant tout de décrire la méthode d'imagerie par fluorescence, pour mieux en comprendre les modalités et mieux appréhender les acquisitions présentées dans ce manuscrit, mais également pour exposer le panel d'outils à notre disposition (reconstruction 3D, détail de visualisation des organes, mode multivues...). Le manuscrit restreint les possibilités de démonstrations de résultats, qui sont plus intéressants à interpréter en vidéo, ou en manipulant une image en trois dimensions. Par exemple, nous avons utilisé le mode multivues du microscope à feuille de lumière pour l'illustration n°52, afin de basculer d'une coupe sagittale de l'abdomen du stomoxe à une coupe médiane. Cela expose un point de vue totalement différent, et donc plus d'outils dans l'exploration anatomique de *Stomoxys calcitrans*.

À la suite de cette présentation, s'en est suivi la mise au point d'un protocole de transparenciation standardisé et adapté à la morphologie des stomoxes, en comparant plusieurs temps d'incubation dans les bains servant au blanchiment. L'objectif de ce travail de thèse était également d'apporter des images inédites et innovantes de la morphologie de l'imago du stomoxe, en utilisant deux types de microscopie : la microscopie confocale, qui s'est avérée appropriée à l'observation de l'anatomie externe du stomoxe, et le microscope à feuille de lumière, qui a permis d'observer les organes internes.

Le microscope confocal a été le premier microscope utilisé dans cette étude. Toutes les acquisitions réalisées avec ce microscope offrent de vrais détails sur l'anatomie externe de l'imago du stomoxe, et des illustrations inédites. Cependant ce microscope présente quelques inconvénients. Ce microscope est adapté aux échantillons de l'ordre du micromètre, car il réalise des acquisitions point par point, et non plan par plan.

Ainsi, pour acquérir des images sur des échantillons de gros volume, comme l'ensemble du corps des stomoxes, plusieurs heures ont été nécessaires (en moyenne 2 ou 3 heures par acquisition). Par ailleurs, l'observation des organes internes ne s'est avérée par suffisamment

satisfaisante, et nous avons donc complété notre travail et nos observations en utilisant le microscope à feuille de lumière.

Les acquisitions réalisées avec ce microscope se sont faites en une vingtaine de minutes pour une mouche entière. De plus, les mouches seulement blanchies de 8 jours donnent des résultats tout à fait satisfaisants sur ce microscope. Outre ce critère de rapidité, le microscope à feuille de lumière étant plus adapté pour les échantillons de l'ordre du centimètre, il nous a été possible de scanner l'entièreté du corps du stomoxe, et ainsi de pouvoir observer les organes internes, sous différents angles (en coupe sagittale, longitudinale et transversale). Par exemple il a été possible d'observer sur toute leur longueur les glandes salivaires, les tubes de Malpighi ou encore toute la longueur du tractus digestif, du canal alimentaire à l'anus. Ainsi l'utilisation des deux microscopes nous permet d'avoir une véritable complémentarité sur les images acquises.

Il est cependant important de noter certaines limites dans la préparation des mouches, qui concernent surtout l'étape de blanchiment et de transpiration. Pendant les bains, certains échantillons se sont détériorés (par l'agitation des bains, ou la fragilité des structures avec les multiples manipulations), ce qu'on peut retrouver sur l'illustration n°15 (partie de l'exosquelette du thorax qui s'est détériorée) ou encore sur l'illustration n°22 où il n'a pas été possible d'observer l'*empodium*. Une autre étape délicate est l'inclusion en agarose. Le risque est en effet de piéger des bulles d'air qui empêchent par la suite l'acquisition de certaines zones comme observé sur l'illustration 51 (qui est la zone totalement noire, de forme arrondie sur la partie du bas).

V – Conclusion

Ce travail utilise pour la première fois des techniques de microscopie innovante, la microscopie confocale et à feuille de lumière sur les stomoxes, ce qui a permis d'obtenir des images originales de l'anatomie interne et externe de ces insectes, avec des visualisations inédites de certains organes. Ce travail de thèse offre de nombreuses perspectives pour de travaux de recherche ultérieurs sur ce vecteur, notamment sur son rôle dans la transmission de nombreux agents pathogènes. Ces méthodes de microscopie pourront par la suite être élargies à d'autres vecteurs d'intérêt médical et vétérinaire.

Bibliographie

- ALAYARI, Nakissa N., VOGLER, Georg, TAGHLI-LAMALLEM, Ouarda, OCORR, Karen, BODMER, Rolf et CAMMARATO, Anthony, 2009. Fluorescent Labeling of Drosophila Heart Structures. In : *Journal of Visualized Experiments*. 13 octobre 2009. n° 32, pp. 1423. DOI 10.3791/1423.
- ALLAIRE, Andréa, PICARD-JEAN, Frédéric et BISAILLON, Martin, 2015. Immunofluorescence to Monitor the Cellular Uptake of Human Lactoferrin and its Associated Antiviral Activity Against the Hepatitis C Virus. In : *Journal of Visualized Experiments*. 1 octobre 2015. n° 104, pp. 53053. DOI 10.3791/53053.
- BALDACCHINO, Frédéric, MUENWORN, Vithee, DESQUESNES, Marc, DESOLI, Florian, CHAROENVIRIYAPHAP, Theeraphap et DUVALLET, Gérard, 2013. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. In : *Parasite*. 2013. Vol. 20, pp. 26. DOI 10.1051/parasite/2013026.
- BARBARAY Guillaume, 2019. *Élaboration d'un atlas histologique et anatomique du stade adulte de la puce du chat Ctenocephalides felis*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 202 p.
- BERRY et CAMPBELL, 1983. Populations and Economic Impacts of Stable Flies on Cattle. In : *Transactions of the ASAE*. 1983. Vol. 26, n° 3, pp. 0873-0877. DOI 10.13031/2013.34038.
- BORLINGHAUS, Rolf, 2012. The white confocal. In : *The European Physical Journal Plus*. 1 octobre 2012. Vol. 127. DOI 10.1140/epjp/i2012-12131-x.
- BRAKENHOFF, G. J., MULLER, M. et GHAUHARALI, R. I., 1996. Analysis of efficiency of two-photon versus single-photon absorption for fluorescence generation in biological objects. In : *Journal of Microscopy*. janvier 1996. Vol. 183, n° 2, pp. 140-144. DOI 10.1046/j.1365-2818.1996.870647.x.
- BROWN, Spencer et POUJOL, Christel, 2013. Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie. In : . S.l. : s.n. pp. 53-73.
- BRUCE, W. N. et DECKER, George C., 1958. The Relationship of Stable Fly Abundance to Milk Production in Dairy Cattle. In : *Journal of Economic Entomology*. 1 juin 1958. Vol. 51, n° 3, pp. 269-274. DOI 10.1093/jee/51.3.269.
- CAMPBELL, J. B., WHITE, R. G., WRIGHT, J. E., CROOKSHANK, R. et CLANTON, D. C., 1977. Effects of Stable Flies on Weight Gains and Feed Efficiency of Calves on Growing or Finishing Rations. In : *Journal of Economic Entomology*. 1 octobre 1977. Vol. 70, n° 5, pp. 592-594. DOI 10.1093/jee/70.5.592.
- CENTONZE, Victoria E. et WHITE, John G., 1998. Multiphoton Excitation Provides Optical Sections from Deeper within Scattering Specimens than Confocal Imaging. In : *Biophysical Journal*. octobre 1998. Vol. 75, n° 4, pp. 2015-2024. DOI 10.1016/S0006-3495(98)77643-X.
- CHAPMAN, R. F., SIMPSON, Stephen J. et DOUGLAS, A. E., 2013. *The insects: structure and function*. Fifth edition. New York : Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-11389-2. QL463 .C48 2013
- CHUNG, Kwanghun, WALLACE, Jenelle, KIM, Sung-Yon, KALYANASUNDARAM, Sandhiya, ANDALMAN, Aaron S., DAVIDSON, Thomas J., MIRZABEKOV, Julie J., ZALOCUSKY, Kelly A., MATTIS, Joanna, DENISIN, Aleksandra K., PAK, Sally, BERNSTEIN, Hannah, RAMAKRISHNAN, Charu, GROSENICK, Logan, GRADINARU,

- Viviana et DEISSEROTH, Karl, 2013. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. In : *Nature*. 16 mai 2013. Vol. 497, n° 7449, pp. 332-337. DOI 10.1038/nature12107.
- COCHARD, Philippe, 2014. LA MICROSCOPIE CONFOCALE. In : . pp. 13.
- COCHARD, Philippe, 2014. L'IMAGERIE DANS L'INFRA-ROUGE. In : . pp. 6.
- COOK, B.J., WAGNER, R.M. et PETERSON, T.L., 1991. The hindgut muscularis of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*: Some of its structural, motile and pharmacological properties. In : *Journal of Insect Physiology*. janvier 1991. Vol. 37, n° 9, pp. 635-645. DOI 10.1016/0022-1910(91)90040-7.
- DAJOZ, R., 2010. *Dictionnaire d'entomologie: anatomie, systématique, biologie*. Paris : Editions Tec & doc. ISBN 978-2-7430-1230-4. 595.7(03) DAJ, 595.7 DAJ, P.03.00-DAJ-D
- DENK, W., STRICKLER, J. H. et WEBB, W. W., 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. In : *Science*. 6 avril 1990. Vol. 248, n° 4951, pp. 73-76. DOI 10.1126/science.2321027.
- DICKINSON, M. H., 2005. The Initiation and Control of Rapid Flight Maneuvers in Fruit Flies. In : *Integrative and Comparative Biology*. 1 avril 2005. Vol. 45, n° 2, pp. 274-281. DOI 10.1093/icb/45.2.274.
- DICKINSON, Michael H et TU, Michael S, 1997. The Function of Dipteran Flight Muscle. In : *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. mars 1997. Vol. 116, n° 3, pp. 223-238. DOI 10.1016/S0300-9629(96)00162-4.
- DODT, Hans-Ulrich, LEISCHNER, Ulrich, SCHIERLOH, Anja, JÄHRLING, Nina, MAUCH, Christoph Peter, DEININGER, Katrin, DEUSSING, Jan Michael, EDER, Matthias, ZIEGLGÄNSBERGER, Walter et BECKER, Klaus, 2007. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. In : *Nature Methods*. avril 2007. Vol. 4, n° 4, pp. 331-336. DOI 10.1038/nmeth1036.
- DUFOUR, Pascal, DUFOUR, Suzie, CASTONGUAY, Annie, MCCARTHY, Nathalie et DE KONINCK, Yves, 2006. Microscopie à deux photons pour l'imagerie cellulaire fonctionnelle : avantages et enjeux ou Un photon c'est bien... mais deux c'est mieux ! In : *médecine/sciences*. octobre 2006. Vol. 22, n° 10, pp. 837-844. DOI 10.1051/medsci/20062210837.
- DUVALLET, G., ROBERT, V. et FONTENILLE, D., 2017. *Entomologie médicale et vétérinaire*. Marseille Versailles : IRD Éditions Éditions Quae. ISBN 978-2-7592-2677-1.
- ECK, Michael, 2014. *Performance enhancement of hybrid nanocrystal-polymer bulk heterojunction solar cells : aspects of device efficiency, reproducibility, and stability*. S.l. : s.n.
- GALASSI, Diana, LAURENTIS, P. et GIAMMATTEO, M., 1998. Integumental morphology in copepods: Assessment by confocal laser scanning microscopy (CLSM). In : *Fragmenta Entomologica (Roma)*. 1 janvier 1998. Vol. 30, pp. 79-92.
- GALASSI, Diana M. P., 1997a. Little Known Harpacticoid Copepods From Italy, and Description of *Parastenocaris Crenobia* N. Sp. (Copepoda, Harpacticoida). In : *Crustaceana*. 1 janvier 1997. Vol. 70, n° 6, pp. 694-709. DOI 10.1163/156854097X00131.
- GALASSI, Diana M. P., 1997b. The genus *Pseudectinosoma* KUNZ, 1935: an update, and description of *Pseudectinosoma kunzi* sp. n. from Italy (Crustacea: Copepoda: Ectinosomatidae). In : *Archiv für Hydrobiologie*. 5 mai 1997. pp. 277-287. DOI 10.1127/archiv-hydrobiol/139/1997/277.
- GEORGET, V, NICOLAS, Jc et SULTAN, C, 1999. La green fluorescent protein : application

- à la dynamique intracellulaire des récepteurs stéroïdiens. In : *médecine/sciences*. 1999. Vol. 15, n° 1, pp. 45. DOI 10.4267/10608/1195.
- GIRARD, Philippe P. et FORGET, Benoît C., 2011. Microscopie de fluorescence à feuille de lumière: La face cachée de l'échantillon enfin dévoilée. In : *médecine/sciences*. août 2011. Vol. 27, n° 8-9, pp. 753-762. DOI 10.1051/medsci/2011278018.
- GRADINARU, Viviana, TREWEEK, Jennifer, OVERTON, Kristin et DEISSEROTH, Karl, 2018. Hydrogel-Tissue Chemistry: Principles and Applications. In : *Annual Review of Biophysics*. 2018. Vol. 47, n° 1, pp. 355-376. DOI 10.1146/annurev-biophys-070317-032905.
- GREGER, K., SWOGER, J. et STELZER, E. H. K., 2007. Basic building units and properties of a fluorescence single plane illumination microscope. In : *Review of Scientific Instruments*. 1 février 2007. Vol. 78, n° 2, pp. 023705. DOI 10.1063/1.2428277.
- GRISI, Laerte, LEITE, Romário Cerqueira, MARTINS, João Ricardo de Souza, BARROS, Antonio Thadeu Medeiros de, ANDREOTTI, Renato, CANÇADO, Paulo Henrique Duarte, LEÓN, Adalberto Angel Pérez de, PEREIRA, Jairo Barros et VILLELA, Humberto Silva, 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. In : *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. juin 2014. Vol. 23, n° 2, pp. 150-156. DOI 10.1590/S1984-29612014042.
- GROSJEAN LEH, Barbara, 2011. Autofluorescence characterization of tumourous brain tissue : measurements on phantoms and rats. In : . 3 octobre 2011.
- GUIOT, Elvire, 2001. *microscopie de fluorescence par excitation à deux photons : application à des études de corrélations et de déclins de fluorescence en milieu biologique* [en ligne]. phdthesis. S.l. : Université Paris Sud - Paris XI. [Consulté le 30 septembre 2021]. Disponible à l'adresse : <https://pastel.archives-ouvertes.fr/tel-00010025>.
- HAWES, Chris et SATIAT-JEUNEMAITRE, Béatrice, 2001. *Plant Cell Biology: A Practical Approach*. S.l. : Oxford University Press. ISBN 978-0-19-963865-9.
- HUYART, Pierre-Louis, 2020. *Élaboration d'un atlas anatomique et histologique de la mouche des étables stomoxys calcitrans*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2020, 222 p.
- K, König, U, Simon et KJ, Halbhuber, 1996. 3D resolved two-photon fluorescence microscopy of living cells using a modified confocal laser scanning microscope. In : *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*. 1 décembre 1996. Vol. 42, n° 8, pp. 1181-1194.
- KELLER, Philipp J, PAMPALONI, Francesco et STELZER, Ernst H K, 2007. Three-dimensional preparation and imaging reveal intrinsic microtubule properties. In : *Nature Methods*. octobre 2007. Vol. 4, n° 10, pp. 843-846. DOI 10.1038/nmeth1087.
- KLAUS, Angela V. et SCHAWAROCH, Valerie, 2006. Novel methodology utilizing confocal laser scanning microscopy for systematic analysis in arthropods (Insecta). In : *Integrative and Comparative Biology*. 1 avril 2006. Vol. 46, n° 2, pp. 207-214. DOI 10.1093/icb/icj015.
- LEE, Sangmi, BROWN, Richard L. et MONROE, William, 2009. Use of confocal laser scanning microscopy in systematics of insects with a comparison of fluorescence from different stains. In : *Systematic Entomology*. 2009. Vol. 34, n° 1, pp. 10-14. DOI 10.1111/j.1365-3113.2008.00451.x.
- MCGURK, Leeanne, MORRISON, Harris, KEEGAN, Liam P., SHARPE, James et O'CONNELL, Mary A., 2007. Three-Dimensional Imaging of *Drosophila melanogaster*. In : RUTHERFORD, Suzannah (éd.), *PLoS ONE*. 5 septembre 2007. Vol. 2, n° 9, pp. e834. DOI 10.1371/journal.pone.0000834.

MICHELS, J. et GORB, S.N., 2012. Detailed three-dimensional visualization of resilin in the exoskeleton of arthropods using confocal laser scanning microscopy: DETAILED THREE-DIMENSIONAL VISUALIZATION OF RESILIN. In : *Journal of Microscopy*. janvier 2012. Vol. 245, n° 1, pp. 1-16. DOI 10.1111/j.1365-2818.2011.03523.x.

MINSKY, Marvin, unknown. Memoir on inventing the confocal scanning microscope,. In : . unknown.

PANCHBHAI, [sans date]. Wilhelm Conrad Röntgen and the discovery of X-rays: Revisited after centennial. In : [en ligne]. [Consulté le 30 septembre 2021]. Disponible à l'adresse : <https://www.jiaomr.in/article.asp?issn=0972-1363;year=2015;volume=27;issue=1;spage=90;epage=95;aulast=Panchbhai>.

PASLARU, Anca I., VERHULST, Niels O., MAURER, Lena M., BRENDLE, Alexandra, PAULI, Nicole, VÖGTLIN, Andrea, RENZULLO, Sandra, RUEDIN, Yelena, HOFFMANN, Bernd, TORGERSON, Paul R., MATHIS, Alexander et VERONESI, Eva, 2021. Potential mechanical transmission of Lumpy skin disease virus (LSDV) by the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) through regurgitation and defecation. In : *Current Research in Insect Science*. 1 janvier 2021. Vol. 1, pp. 100007. DOI 10.1016/j.cris.2020.100007.

RICHARDSON, Douglas S. et LICHTMAN, Jeff W., 2015. Clarifying Tissue Clearing. In : *Cell*. 16 juillet 2015. Vol. 162, n° 2, pp. 246-257. DOI 10.1016/j.cell.2015.06.067.

RODRÍGUEZ-VIVAS, Roger Iván, GRISI, Laerte, PÉREZ DE LEÓN, Adalberto Angel, SILVA VILLELA, Humberto, TORRES-ACOSTA, Juan Felipe de Jesús, FRAGOSO SÁNCHEZ, Hugo, ROMERO SALAS, Dora, ROSARIO CRUZ, Rodrigo, SALDIERNA, Fabián et GARCÍA CARRASCO, Dionisio, 2017. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. In : *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 8 janvier 2017. Vol. 8, n° 1, pp. 61. DOI 10.22319/rmcp.v8i1.4305.

ROTH, M., 1974. *Initiation à la morphologie, la systématique et la biologie des insectes* - [en ligne]. IRD ORSTOM. S.l. : s.n. [Consulté le 23 mars 2020]. ISBN 2-7099-0327-X. Disponible à l'adresse : <https://www.decitre.fr/livres/initiation-a-la-morphologie-la-systematique-et-la-biologie-des-insectes-9782709903271.html>.

SCHWINGHAMMER, K. A., KNAPP, F. W. et BOLING, J. A., 1987. Physiological and Nutritional Response of Beef Steers to Combined Infestations of Horn Fly and Stable Fly (Diptera: Muscidae). In : *Journal of Economic Entomology*. 1 février 1987. Vol. 80, n° 1, pp. 120-125. DOI 10.1093/jee/80.1.120.

SHARIF, Shukri, 2018. *Stomoxys calcitrans : évaluation du rôle dans la transmission de Besnoitia besnoiti et nouveaux moyens de contrôle* [en ligne]. phd. S.l. : s.n. [Consulté le 1 octobre 2021]. Disponible à l'adresse : <https://oatao.univ-toulouse.fr/25205/>.

TAINAKA, Kazuki, MURAKAMI, Tatsuya C., SUSAKI, Etsuo A., SHIMIZU, Chika, SAITO, Rie, TAKAHASHI, Kei, HAYASHI-TAKAGI, Akiko, SEKIYA, Hiroshi, ARIMA, Yasunobu, NOJIMA, Satoshi, IKEMURA, Masako, USHIKU, Tetsuo, SHIMIZU, Yoshihiro, MURAKAMI, Masaaki, TANAKA, Kenji F., IINO, Masamitsu, KASAI, Haruo, SASAOKA, Toshikuni, KOBAYASHI, Kazuto, MIYAZONO, Kohei, MORII, Eiichi, ISA, Tadashi, FUKAYAMA, Masashi, KAKITA, Akiyoshi et UEDA, Hiroki R., 2018. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. In : *Cell Reports*. 21 août 2018. Vol. 24, n° 8, pp. 2196- 2210.e9. DOI 10.1016/j.celrep.2018.07.056.

TAYLOR, David B. et BERKEBILE, Dennis, 2006. Comparative Efficiency of Six Stable Fly (Diptera: Muscidae) Traps. In : *Journal of Economic Entomology*. 1 août 2006. Vol. 99, n° 4, pp. 1415-1419. DOI 10.1093/jee/99.4.1415.

TAYLOR, David B., MOON, Roger D. et MARK, Darrell R., 2012. Economic Impact of Stable Flies (Diptera: Muscidae) on Dairy and Beef Cattle Production. In : *Journal of Medical Entomology*. 1 janvier 2012. Vol. 49, n° 1, pp. 198-209. DOI 10.1603/ME10050.

TULLOCH, F. M. G., 1906. The Internal Anatomy of Stomoxys. In : *BMJ Military Health*. 1 août 1906. Vol. 7, n° 2, pp. 154-162. DOI 10.1136/jramc-07-02-08.

VALDECASAS, Antonio G. et ABAD, Angela, 2011. Morphological Confocal Microscopy in Arthropods and the Enhancement of Autofluorescence after Proteinase K Extraction. In : *Microscopy and Microanalysis*. février 2011. Vol. 17, n° 1, pp. 109-113. DOI 10.1017/S1431927610094213.

VROOM, Jurrien M., DE GRAUW, Kees J., GERRITSEN, Hans C., BRADSHAW, David J., MARSH, Philip D., WATSON, G. Keith, BIRMINGHAM, John J. et ALLISON, Clive, 1999. Depth Penetration and Detection of pH Gradients in Biofilms by Two-Photon Excitation Microscopy. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1 août 1999. Vol. 65, n° 8, pp. 3502-3511. DOI 10.1128/AEM.65.8.3502-3511.1999.

ZUMPT, Fritz, 1973. *The Stomoxyine biting flies of the world: Diptera, Muscidae taxonomy, biology, economic importance and control measures*, [en ligne]. Stuttgart : Fischer. [Consulté le 23 mars 2020]. Disponible à l'adresse : <http://books.google.com/books?id=sri1AAAAIAAJ>.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

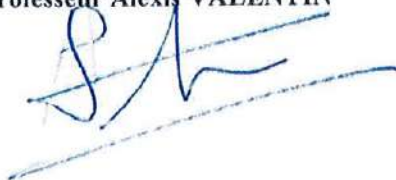
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Emilie BOUHSIRA, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directrice de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **LEROY Margaux** intitulée « **UTILISATION DE LA MICROSCOPIE CONFOCALE ET A FEUILLE DE LUMIERE EN 3D DANS L'ETUDE DE L'ANATOMIE DE LA MOUCHE D'ETABLE, STOMOXYS CALCITRANS** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 04/10/2021
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Docteure Emilie BOUHSIRA



Vu :
Le Président du jury
Professeur Alexis VALENTIN



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul
Sabatier
Monsieur Jean-Marc BROTO
Par délégation, le Doyen de la faculté de
Médecine de Toulouse-Rangueil
Monsieur Elie SERRANO



Mme LEROY Margaux
a été admise sur concours en : 2016
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 06/07/2020
a validé son année d'approfondissement le : 01/07/2021
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AUTEUR : Margaux LEROY

TITRE : « Utilisation de la microscopie confocale et à feuille de lumière en 3D dans l'étude de l'anatomie de la mouche d'étable, *Stomoxys calcitrans* »

RÉSUMÉ :

Les stomoxes (*Stomoxys calcitrans*), mouches piqueuses cosmopolites piquant Homme et animal, font partie des principaux ectoparasites des bovins. Ces mouches sont des agents de nuisance majeure en élevage engendrant des pertes économiques notables pour l'éleveur, et sont également vecteurs, le plus souvent mécaniques, confirmés ou supposés de nombreux agents pathogènes (virus, bactéries, parasites). Cependant les modalités précises du portage et de la transmission mécanique par les stomoxes ne sont pas parfaitement connues et certains paramètres nécessitent d'être confirmés (rôle du jabot dans le stockage d'un agent pathogène, rôle des glandes salivaires, caractère infectieux de l'agent pathogène transmis). Ainsi, il est fondamental de préciser les structures anatomiques impliquées dans le stockage de l'agent pathogène et de sa cinétique chez le stomoxe, afin de mieux maîtriser les modalités de vectorisation mécanique, encore méconnues. Une bonne connaissance de l'anatomie de ces vecteurs est donc nécessaire. Ainsi dans ce travail de thèse, nous proposons pour la première fois chez ce vecteur, l'utilisation de la microscopie en 3D (microscopie confocale et à feuille de lumière) afin de décrire avec précision ses structures anatomiques.

Cette thèse a eu également pour objectif la standardisation d'un protocole de transparence, étape indispensable à l'observation microscopique des tissus, et l'apport d'images de références sur l'anatomie interne des stomoxes. L'utilisation de la microscopie en 3D sur stomoxes transparents pourra être envisagée dans l'étude de la transmission d'agents pathogènes, et étendue par la suite à d'autres vecteurs d'intérêt médical et vétérinaire.

MOTS CLES : Stomoxes, *Stomoxys calcitrans*, transparence, microscopie 3D, microscopie confocale, microscopie à feuille de lumière, vecteur, entomologie médicale

TITLE : "Use of 3D confocal and selective plane illumination microscopy in the study of the anatomy of the stable fly *Stomoxys calcitrans*"

ABSTRACT:

The stable flies, *Stomoxys calcitrans*, are cosmopolitan biting flies harassing humans and animals, and are amongst the main ectoparasites of cattle. These flies are of major nuisance concerns in cattle breeding as they induce significant economic losses for the breeder, and are vectors, most often mechanical, confirmed or suspected of many pathogens (viruses, bacteria, parasites). However, the mechanical transmission of pathogens by the stable flies is not properly described and some parameters need to be confirmed (role of the crop in the storage of a pathogen, role of the salivary glands, infectious nature of the transmitted pathogen). Thus, it is essential to specify the anatomical structures involved in the storage of the pathogen and its kinetics in the flies, in order to better understand the methods of mechanical vectorisation, which are still poorly understood. A good knowledge of the anatomy of these vectors is therefore necessary. Thus in this thesis, we propose, the use of 3D microscopy (confocal and selective plane illumination microscopy) for the first time in this vector in order to describe accurately its anatomical structures.

The objective of this thesis was also the standardization of a clarification process, an essential step for the microscopic observation of tissues, and the provision of reference images on the internal anatomy of stomoxes. The use of 3D microscopy on transparent stomoxes may be considered in the study of the transmission of pathogenic agents, and subsequently extended to other vectors of medical and veterinary interest.

KEY WORDS: Stable flies, *Stomoxys calcitrans*, clarification, 3D microscopy, confocal microscopy, selective plane illumination microscopy, arthropod vector, veterinary entomology