

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université 08 Mai 45 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre
et de l'Univers
Département de : Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie
Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire
Option : Immunologie Approfondie

Thème

*Caractérisation immunologique de l'extrait
brut des Chironomidae (Diptera :Insecta)*

Présenté par :

ARZIOUKAT Aicha

REGGAM Rawiya

Devant le jury composé de :

PROMOTEUR : Mme. ZERGUINE K.

M.C. Univ de Guelma

PRESIDENT: Mr. BOUDEN I.

M.A. Univ de Guelma

EXAMINATRICE : Mme. KAIDI S.

M.A. Univ de Guelma

CO-ENCADREUR: Melle. BENSAXHRI Z.

Doctorante. Univ de Guelma

Juin 2013

REMERCIEMENTS

Louange à notre seigneur « ALLAH » qui nous a dotées de la merveilleuse faculté de raisonnement. Louange à notre créateur qui nous a incitées à acquérir le savoir. C'est à lui que nous adressons toute notre gratitude.

A Mr. BOUDEN Ismaïl notre président de jury, pour l'honneur qu'il nous fait d'avoir bien voulu présider notre jury.

A Meme. KAIDI Souad d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous présentons nos plus chers remerciements à notre encadreur Mme ZERGUINE pour sa disponibilité, son soutien continu et sa patience et ses conseils et ses encouragements tout au long de notre recherche.

Nos remerciements vont également le professeur Mme BENDJEDOU, Mme KHALF, et Mme MACHIA à l'université du skikda et tous les Enseignants qui nous ont beaucoup encouragé et soutenu depuis le début de nos premiers cycles d'étude jusqu'à la fin de deuxième année master Universitaire.

Grand remerciement à Melle BENSAKHRI ZINETTE qui a bien voulu nous diriger et nous orienter tous le long de la réalisation de notre travail.

Nous remercions également :

** L'ingénieur Mme. BOULTIF ASSIA et Doctorant BEN HAYAHEM ALI de laboratoire de recherche chimie appliquée.*

** Directeur de l'institut de formation paramédicale*

Nos sincères gratitudes vont également à tous nos collègues et amis (es) de la promotion 2012-2013 et à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour la réalisation de ce modeste travail.

MERCI

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur l'hypersensibilité.

1.1.	Définition de l'allergie.....	3
1.2.	Classification des réactions allergiques.....	3
1.2.1.	Classification de Gell et Coombs.....	3
1.2.2.	Classification actuelle de Johansson.....	4
1.3.	Les types d'allergie selon la classification de Gell et Coombs.....	5
1.3.1.	Réaction d'hypersensibilité immédiate ou anaphylactique.....	5
1.3.2.	L'hypersensibilité cytotoxique de type II.....	7
1.3.3.	L'hypersensibilité liée aux complexes immuns	8
1.3.4.	L'hypersensibilité retardée de type IV	8
1.4.	Les facteurs étiologiques.....	10
1.4.1.	Les facteurs prédisposants.....	10
1.4.2.	Les facteurs favorisants.....	11

Chapitre II : L'hypersensibilité aux Chironomidae.

2.1.	Historique de l'allergie aux Chironomidae.....	13
2.2.	Description de l'allergène.....	13
2.2.1.	Les Chironomidae (Biologie et écologie).....	13
2.2.2.	L'hémoglobine larvaire.....	15
2.2.3	Les espèces allergéniques.....	16
2.3	Facteurs de risque allergique.....	17
2.4.	Réaction croisée	18
2.5.	Mécanisme d'allergie aux Chironomidae.....	19
2.6.	Les aspects cliniques d'allergie.....	19
2.6.1.	L'asthme.....	19

2.6.2.	La rhinite allergique.....	20
2.6.3.	Conjonctivite allergique.....	21
2.6.4.	Dermatite de contact.....	21

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthodes.

3.1.	Matériel	23
3.1.1.	Matériel biologique.....	23
3.1.2.	Enceinte d'élevage.....	23
3.1.3.	Condition d'élevage.....	24
3.1.4.	Extrait brut.....	24
3.2.	Protocole expérimental.....	25
3.2.1.	Préparation de l'extrait brut.....	25
3.2.2.	Plan de travail.....	29
3.3.	Traitement des souris.....	29
3.4.	Lavage nasal.....	30
3.5.	Lavage broncho-alvéolaire.....	31
3.6.	Les frottis des liquides nasaux et broncho-alvéolaires.....	32
3.7.	La numérotation cellulaire.....	33
3.8.	Prélèvement sanguin.....	33
3.9.	Prélèvement des organes.....	34
3.10	Isolement des splénocytes.....	34

Chapitre IV : Résultats et discussion.

4.1.	Effet de l'extrait larvaire de Chironomidae sur le nombre de leucocytes.....	36
4.1.1.	Variation du taux des globules blancs, des lymphocytes et neutrophiles.....	36
4.1.2.	Variation du taux des monocytes, éosinophiles et des basophiles.....	36
4.1.3.	Variation du taux des plaquettes.....	38
4.2.	Effet de l'extrait larvaire des Chironomidae sur le nombre des cellules des liquides nasaux et broncho-alvéolaires.....	39
4.2.1.	Comptage cellulaire.....	39

4.2.2.	Frottis.....	40
4.3.	Effet de l'extrait larvaire des Chironomidae sur le nombre de splénocytes.....	41
4.3.1.	Comptage cellulaire.....	41
4.4.	Effet de l'extrait larvaire des Chironomidae sur le poids des organes.....	42
4.5.	Etudes histologique.....	43
	Conclusion et perspectives.....	44

Références bibliographiques

Résumé

Annexe

Liste des abréviations

ABO	Système des groupes sanguins
AC	Anticorps
Ag	Antigène
Ca⁺	Calcium
CD4	Classes de différenciation
Cells	Cellules
Cm	Centimètre
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de type II
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
C5a	Convertase
CSF	Stem Cell factor
C°	Cursus
ECP	Eosinophil cationic protein
E .D .T .A	Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique
F	Facteur de dilution
FCεRI	Récepteur du FC
FNS	Formule numérique sanguine
G	Gramme
GB	Globule blanc
HS	Hypersensibilité
HSR	Hypersensibilité Retardée
Ig	Immunoglobuline (G, M ,E)
IFNγ	Interférons γ
IL-4	Interleukine-4

KD	Kilo Dalton
LB	Lymphocyte B
MBP	Major basic potein
MGG	May-Grûnwald-Giemsa
ml	Mililitre
mn	Minute
µg	Microgramme.
µl	Microlitre
µm	Micromètre
N	Nombre de cellules par litre
n	Nombre de cellules comptées
NK	Naturel Killer (cellules)
PBS	Phosphate Buffered saline
PPD	Dérivé protéique purifié
PAF	Platelet Activating Factor
RANTS	Regulated on Activation, Normal T expressed and Secreted
RAST	Radio Allergo Sorbent Test
RHD	Rhésus D
Rpm	Rotation par minute
RFCε	Radio Frequency conducted interference
Th	T helper
TNF-α	Tumorne crosis factor α
USA	United States of America
V	Volume de comptage en litre
%	Pourcentage

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Classification actuelle de Johansson.	4
2	Induction et mécanisme effecteur de l'hypersensibilité de type I.	6
3	Les phases de l'hypersensibilité immédiate.	6
4	L'hypersensibilité de type II.	7
5	L'hypersensibilité a complexe immuns	8
6	L'hypersensibilité de type IV.	9
7	L'hypersensibilité de type tuberculinique.	10
8	Stade adulte du Chironomidae.	14
9	Stade larvaire du Chironomidae.	14
10	Les stades de développement des Chironomidae.	15
11	L'hémoglobine d'une larve de <i>C. thummi</i> .	16
12	Mécanisme de l'asthme allergique.	20
13	Mécanisme de la dermatite de contact.	22
14	Souris blanche.	23
15	Enceinte d'élevage.	24
16	Conditions d'élevage.	24
17	Larve des Chironomidae.	25
18	Station de l'échantillonnage.	25
19	Le dégraissage.	26
20	Le séchage.	26
21	L'extraction par PBS.	27
22	L'homogénéisation.	27
23	La centrifugation.	28
24	La filtration.	28
25	La lyophilisation.	29
26	Le protocole expérimental.	30
27	Traitement nasal des souris.	30
28	Lavage nasal.	31
29	Lavage broncho-alvéolaire.	32
30	Préparation des frottis.	33

31	Les tubes EDTA.	34
32	La dilacération.	35
33	Variation du taux des globules blancs.	36
34	Variation du taux des lymphocytes.	36
35	Variation du taux des neutrophiles.	37
36	Variation du taux des éosinophiles.	38
37	Variation du taux des monocytes.	38
38	Variation du taux des plaquettes.	39
39	Variation du nombre des cellules du liquide nasal.	40
40	Variation du nombre des cellules du liquide broncho-alvéolaire.	40
41	Frottis du lavage broncho-alvéolaire.	40
42	Frottis du lavage nasal.	41
43	Variation du nombre des splénocytes.	41
44	Variation du poids des poumons.	42
45	Variation du poids de la rate.	43
46	Coupe histologique des poumons des souris témoins et traitées.	43

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Classification de Gell et Coombs (1963) des phénomènes allergiques	4

Introduction

Certaines molécules inoffensives déclenchent une réponse immunitaire adaptative et le développement de mémoire immunologique chez les sujets prédisposés. A la suite de l'exposition successive à ces antigènes la mémoire immunitaire produit une inflammation et des lésions tissulaires. Ces réactions immunitaires excessives sont appelées : réaction d'hypersensibilité ou réaction allergique. Les antigènes qui déclenchent ces réactions sont appelés : Allergènes, l'un de ces derniers se trouvent sous forme inhalées, ce sont les pneumallergènes.

Les Chironomidae sont des insectes Diptères, ils constituent une famille d'insectes très diversifiée et qui contient le nombre d'individus le plus abondant dans les écosystèmes aquatiques (**Zerguine, 2010**). Ces insectes possèdent dans leurs sang (ou hémolymph) de l'hémoglobine. Il a été confirmé par plusieurs travaux dans certains pays comme le Japon, le Soudan et les Etats Unis, que les Chironomidae sont l'un des plus allergènes communs par inhalation, causant souvent des rhino-conjonctivites et l'asthme (**Suzuki et al., 1995**).

Malgré qu'il existe plusieurs travaux internationaux sur les effets allergiques des Chironomidae, en Algérie aucune étude n'est aujourd'hui réalisée.

L'objectif recherché par ce travail est d'étudier l'effet allergique de l'extrait brut des larves de Chironomidae sur le système immunitaire. Pour cela, nous avons structuré ce travail en quatre chapitres :

- Le premier est consacré à donner des idées générales sur l'hypersensibilité.
- Le deuxième chapitre, nous l'avons réservé à la détermination des propriétés de l'allergène Chironomidien et l'explication de leur effet allergique chez les sujets exposés.
- Au troisième chapitre, nous présentons les matériels et méthodes utilisés pour la réalisation du présent travail.
- Le dernier chapitre, constitue l'essentiel de ce mémoire, lequel porte résultats et discussions, celui-ci est composé de :
 - 1- Une étude de l'effet allergique de l'extrait larvaire sur la formule leucocytaire.

- 2- Comptage des cellules immunitaires et observation des frottis des différents liquides nasaux et broncho-alvéolaires.
- 3- Comptage cellulaire des splénocytes.
- 4- Une étude histologique des poumons.

Enfin, le mémoire se termine par une conclusion.

1.1. Définition de l'allergie

Le terme d'allergie est utilisé pour la première fois par Von Pirquet en 1906. Mais, il faut attendre jusqu'au 1911 pour que la maladie allergique soit décrite par Coca et Cooke comme une réaction exagérée de l'organisme, en réponse à l'introduction de certaines substances étrangères à l'organisme : « l'allergène ». (Et ceci selon des modalités de présentation diverses (contact, inhalation, ingestion ou injection) (**Galli et al, 2008**).

La définition de la maladie allergique introduit donc les notions de « réactivité exagérée de certains sujets » et de « spécificité de la cause (**Johansson et al., 2001**).

En effet, l'allergie est la capacité pour un organisme sensibilisé à une substance exogène de réagir spécifiquement, et ce d'une façon « altérée » lors de la réintroduction de cette substance. Ce terme impliquait indifféremment un état d'immunité ou d'hypersensibilité avec comme conséquence une réaction inflammatoire nocive pour l'organisme (**Johansson et al., 2001**).

1.2. Classification des réactions allergiques

1.2.1. Classification de Gell et Coombs

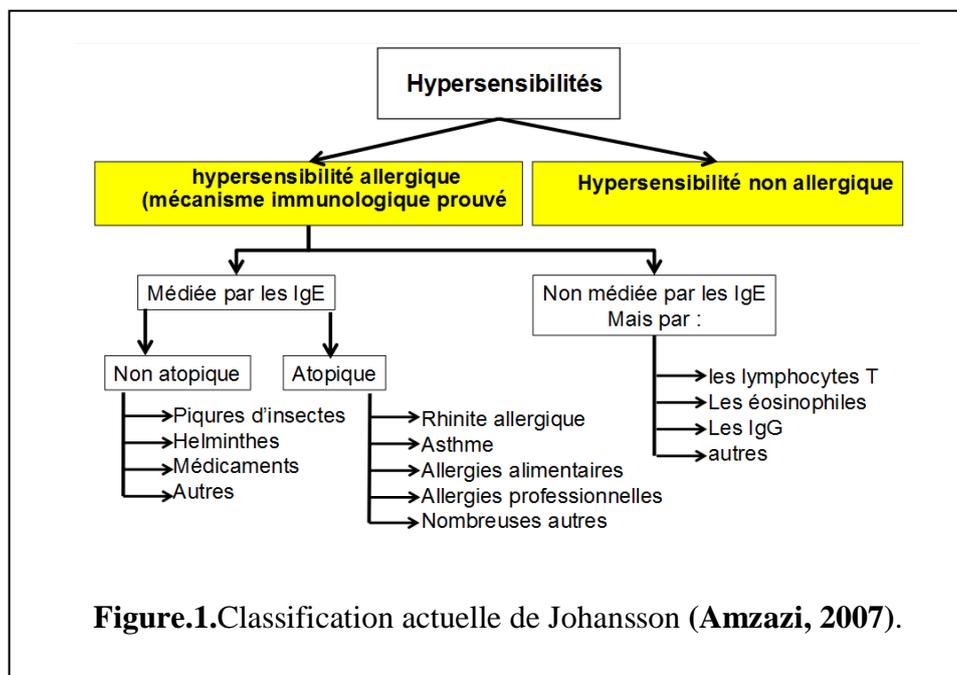
En 1945, deux immunologistes britanniques Gell et Coombs, ont classifié les réactions d'hypersensibilité (HS) en quatre grands types, selon la forme d'action et le temps de réponse (**Gérald, 2011**). Après réintroduction de l'antigène et en fonction des médiateurs impliqués. Mais en clinique les mécanismes sont intriqués (**Tableau 1**) (**Entringer, 2009**). Cette classification reste cependant majoritairement admise en dépit de modifications proposées, notamment par l'addition d'une nouvelle classe (**Mondoulet, 2005**). Cette classification bien qu'ancienne fait encore référence (**Gérald, 2011**).

Tableau 1 : Classification de Gell et Coombs (1963) des phénomènes allergiques (Mondoulet, 2005).

Type d'hypersensibilité	I	II	III	IV
Type de réactions	Médiée par les IgE	Cytotoxique	Complexes immuns	Cellulaire
Délai de déclenchement	Immédiat	Semi-retardé (4 à 8 heures)	Semi-retardé (quelques heures)	Retardé (1 à 3 j.)
Maladies et phénomènes courants	Anaphylaxie, asthme, rhinite, eczéma atopique, choc anaphylactique	Destruction des cellules sanguines par allergie médicamenteuse	Maladie sérique, pneumopathies à précipines	Dermatites, eczéma de contact, allergie microbienne, rejet de greffes
Effecteurs	IgE, mastocytes, basophiles	IgG ou IgM, cellules K	IgG, IgM	Lymphocytes T, macrophages
Médiateurs	Histamine, leucotriènes, Platelet Activating Factor (PAF)	Protéines du complément	Anticorps, complément, plaquettes, neutrophiles	Lymphokines

1.2.2. Classification actuelle de Johansson

Une nouvelle nomenclature proposée par un groupe d'experts précis, aux vues des données immunologiques récentes (Johansson *et al.*, 2001) (Figure 1).

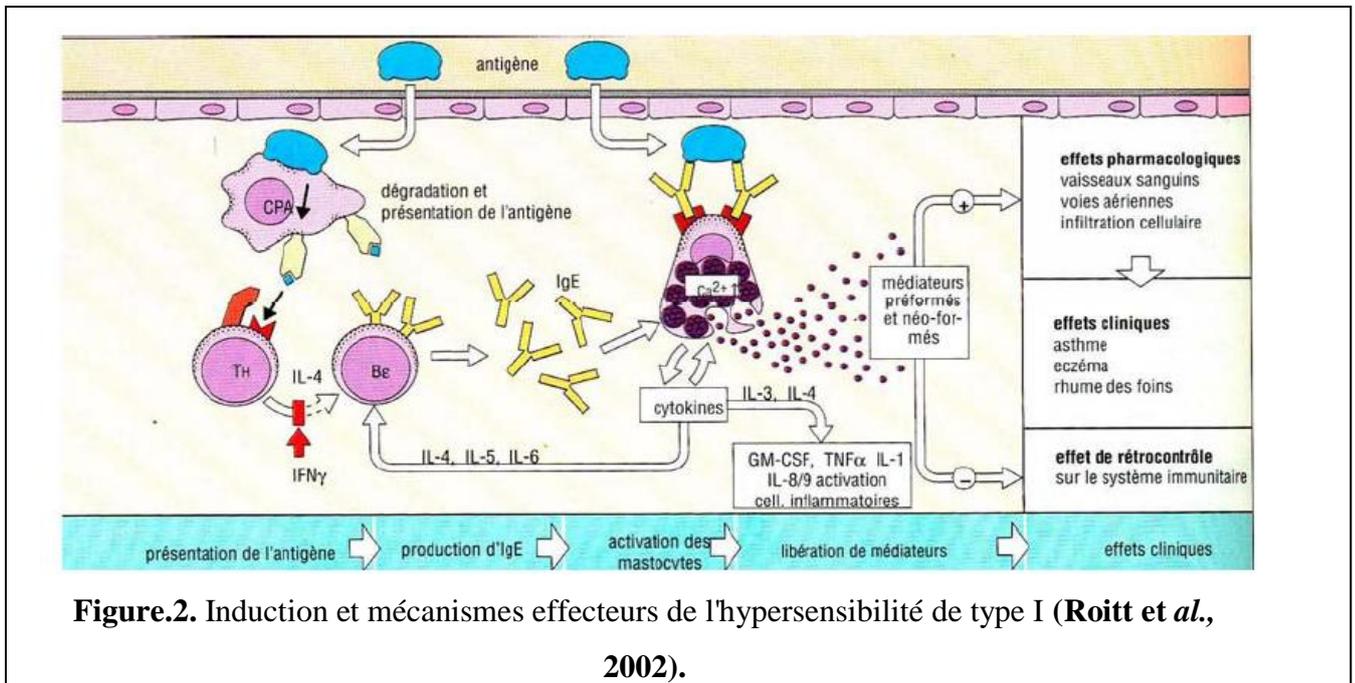


1.3. Les types d'allergie selon la classification de Gell et Coombs

Ces réactions classées en quatre types I, II et III dépendent des anticorps, seuls ou avec le complément, et parce qu'elles sont évidentes en quelques minutes, ces réactions sont appelées hypersensibilité immédiate. Le type IV est médié par les cellules T et par les cytokines qu'elles produisent lorsqu'elles sont activées. Comme cette réponse prend au moins un jour pour se développer, elle est appelée hypersensibilité retardée (**Parham et al., 2003**).

1.3.1. Réaction d'hypersensibilité immédiate ou anaphylactique (IgE): (de type I selon la classification de Gell et Coombs)

Ce type d'hypersensibilité regroupe tous les phénomènes de l'anaphylaxie expérimentale décrite par Richet et Portier (1902), ainsi que les manifestations cliniques observées chez l'homme lors d'un choc anaphylactique et au cours d'affections respiratoires, oculaires, cutanées et digestives. Il existe cependant une distinction entre le choc anaphylactique, expression systémique de l'hypersensibilité immédiate qui survient après pénétration de substances étrangères (sérum xénogénique, venin d'hyménoptères, aliments, médicaments) et les affections survenant après exposition naturelle à l'antigène (par inhalation, par ingestion ou parfois par effraction cutanée) comme par exemple : l'asthme, les rhinites saisonnières (rhume des foins). Le point commun de toutes ces formes « d'allergie » est la production d'immunoglobulines E spécifiques (IgE) par un « antigène (Ag) » ou allergène » (**David et al., 1996**).



Le mécanisme de la réaction allergique immédiate IgE-dépendante s'effectue classiquement en deux étapes : une phase de sensibilisation suivie de la dégranulation du mastocyte proprement dite (Entringer, 2009) (Figure 3).

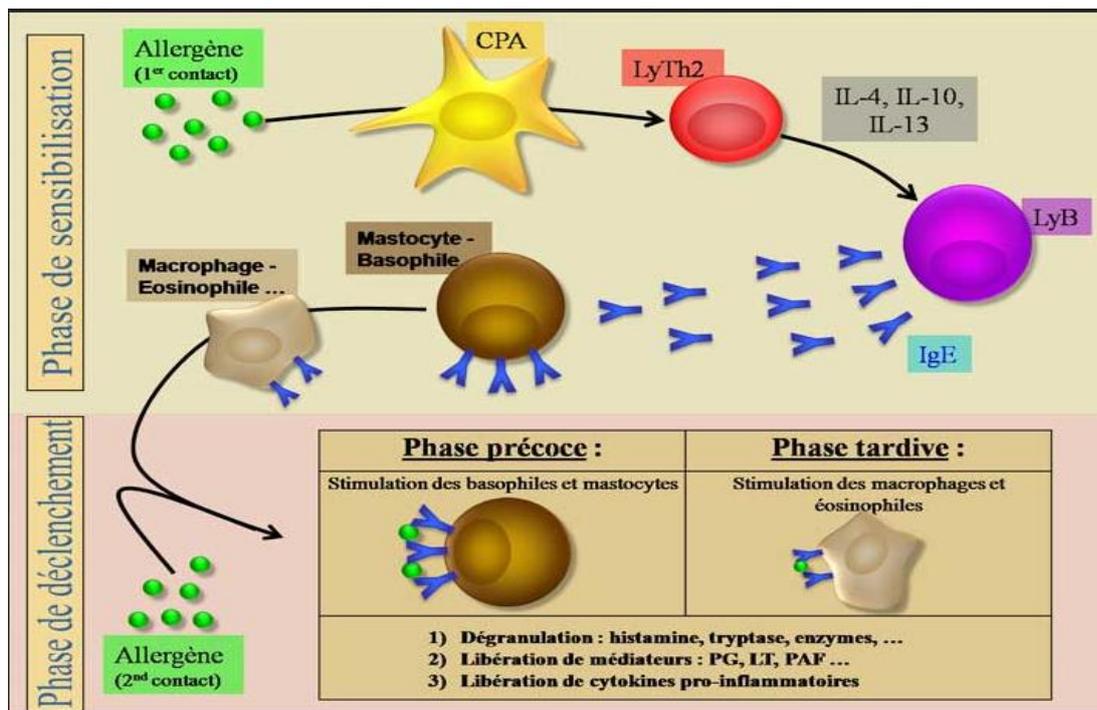


Figure.3. Les phases de l'hypersensibilité immédiate [1].

a. Phase de sensibilisation

La sensibilisation à un antigène particulier dépend de la stimulation de la production de l'anticorps IgE. Elle requiert des cellules Th2 CD4 pour provoquer la commutation de la classe de cellule B à antigène spécifique et à sécréter IL4 nécessaire pour la croissance et la différenciation de la cellule B (Lydyard *et al.*, 2002).

b. Phase effectrice (dégranulation des mastocytes médiée par les IgE)

Les anticorps IgE produits après le contact initial avec un Antigène spécifique, se lient aux récepteurs d'IgE sur les mastocytes et les basophiles. La liaison croisée d'antigène de l'IgE et les récepteurs avec lesquels il est associé conduit à la dégranulation rapide et à la libération de médiateurs inflammatoires (Histamine) provoquant une inflammation locale (Lydyard *et al.*, 2002).

1.3.2. L'hypersensibilité cytotoxique de type II

Elle est liée à des anticorps (IgM, IgG) qui se fixent sur des antigènes exprimés constitutivement ou absorbés passivement sur la membrane des cellules de l'organisme. Ces anticorps induisent la destruction des cellules en activant le système du complément et/ou par l'opsonisation des phagocytes (Baudry et Brezeltec, 2006) (Figure 4).

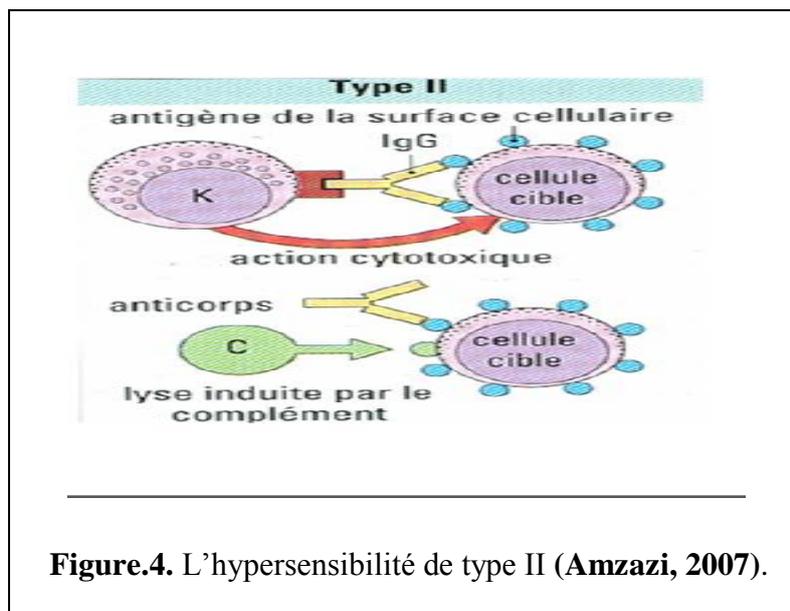


Figure.4. L'hypersensibilité de type II (Amzazi, 2007).

Elle est représentée surtout par l'incompatibilité fœto-maternelle (la maladie hémolytique du nouveau-né), ou dans le cas des réactions de transfusion et dans les réactions d'hypersensibilité de type II auto-immunes.

1.3.3. L'hypersensibilité liée aux complexes immuns (de type III ou semi-retardée)

Ce type d'hypersensibilité correspond précisément à certains effets provoqués par l'accumulation de complexes immuns induits quelques heures après introduction de l'Ag (réaction d'Arthus), ou après dépôt de complexes antigènes-anticorps déjà présents dans la circulation. Le dépôt de ces complexes immuns dans les tissus ou dans les organes entraîne alors un processus inflammatoire avec intervention du complément. Les anticorps (Ac) responsables de ce type d'hypersensibilité sont les IgG et les IgM (David et al., 1996) (Figure 5).

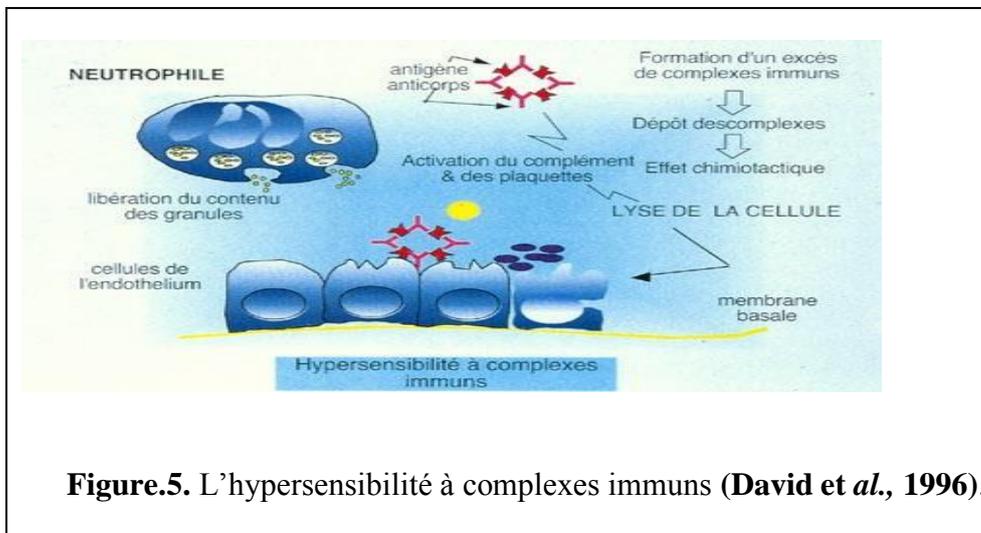
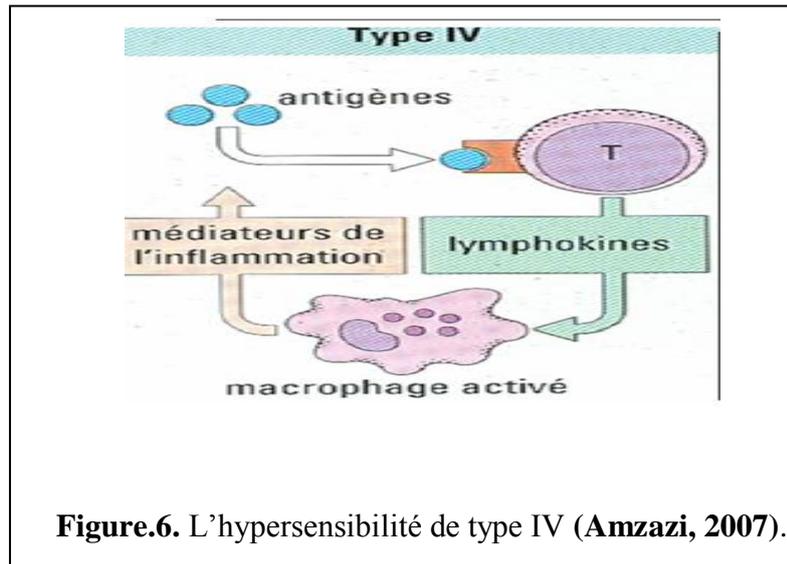


Figure.5. L'hypersensibilité à complexes immuns (David et al., 1996).

1.3.4. L'hypersensibilité retardée de type IV

Les réactions de type IV désignent un ensemble de réactions qui prennent plus de 12 heures pour se développer et qui mettent en jeu des réactions à médiation cellulaire (lymphocytes T) plutôt que des anticorps (Revallard, 2001).

A la différence des autres formes d'hypersensibilité, les réactions de type IV ne peuvent être transmises d'un animal à l'autre par le sérum mais bien par les lymphocytes T, particulièrement les cellules Th1 CD4 chez la souris (Roitt et al., 2002) (Figure 6).



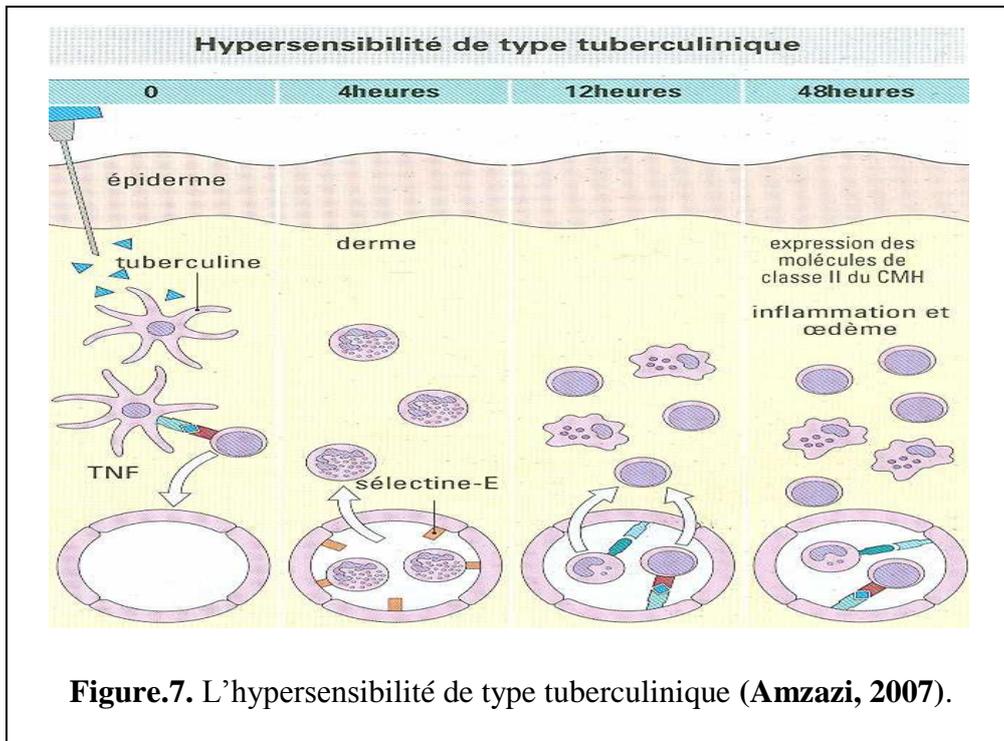
On connaît trois variantes de la réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) :

a. Hypersensibilité de contact

Elle est caractérisée cliniquement par l'apparition d'une lésion eczémateuse au niveau du site de contact avec l'allergène 48 heures après. La lésion est caractérisée par une infiltration par les cellules mononucléaires apparaissant aux 6^{ème} - 8^{ème} heure puis atteignant un maximum à 12-15 heures. Puis l'œdème prend place avec la formation de microvésicules. Il faut noter l'absence de neutrophiles. La réaction est accompagnée d'une infiltration par un grand nombre de leucocytes dans le derme [2]. On l'observe souvent à la suite de contact avec des agents comme le nickel, les sels de chrome et certains catalyseurs de caoutchouc (Roitt et al., 2002).

b. Hypersensibilité de type tuberculinique

L'hypersensibilité retardée vis-à-vis de la tuberculine est le meilleur modèle expérimental et clinique de HSR. Elle peut être induite par une tuberculose (Bach et Lesavre, 1986) (Figure 7).



c. Hypersensibilité granulomateuse

L'hypersensibilité granulomateuse est la principale forme clinique de HSR. Elle est à l'origine de la plus part des effets pathologiques observés dans les maladies impliquant l'immunité à médiation cellulaire T. Elle résulte en général de la persistance, dans les macrophages, des micro-organismes ou de particules que la cellule est incapable de détruire. Elle peut être provoquée également par la persistance de complexes immuns, comme par exemple dans l'alvéolite allergique. Ce processus aboutit à la formation de granulome à cellule épithéloïdes (Roitt *et al.*, 2002).

1.4. Les facteurs étiologiques

1.4.1. Les facteurs prédisposants : Facteurs génétiques (atopique)

Les maladies de type allergique sont souvent familiales. Le terme atopie désigne une tendance à l'hyperproduction d'anticorps de type IgE contre des allergènes communs de l'environnement. Environ 80 % des individus atopiques ont des antécédents familiaux d'allergie contre 20% seulement dans la population normale (Chapel *et al.*, 2004).

Le taux global des IgE sériques, la production des IgE spécifiques et la réactivité bronchique excessive dépendent tous trois d'un contrôle génétique. Des gènes situés sur le

chromosome 5 (le groupe dit du gène de l'IL-4) sont impliqués dans la régulation de la production d'IgE. et des gènes situés sur le bras long du chromosome 11 contrôlent le phénotype atopique. Bien que la susceptibilité génétique soit un facteur important dans l'allergie (**Chapel et al., 2004**).

Le rôle des IgE à l'origine de l'atopie est bien établi. Ces IgE se fixent dans les tissus et entraînent, en présence de l'allergène, la dégranulation des basophiles et des mastocytes. Les cellules produisant les IgE sont surtout localisées dans les formations lymphoïdes des muqueuses du nez, de la trachée, des bronches et de l'intestin (**Bach et Lesavre, 1986**).

Les facteurs génétiques de susceptibilité pour l'atopie ont été mis en évidence par des études familiales démontrant un taux de concordance supérieur chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes (**Association des Collèges des Enseignants d'Immunologie des Universités de Langue française, 2011**).

Deux types d'approches sont utilisés pour identifier ces gènes. L'approche des gènes candidats recherche si le polymorphisme connu des gènes impliqués dans la réponse immune allergique est lié à la pathologie. L'approche du clonage positionnel recherche dans les familles si des marqueurs de différentes régions chromosomiques sont liés à la maladie (**Association des Collèges des Enseignants d'Immunologie des Universités de Langue française, 2011**).

1.4.2. Facteurs favorisants

a. Les allergènes

Les allergènes sont des antigènes présents à la surface de particules ou substances étrangères. Chez des personnes prédisposées (on parle d'atopie), les allergènes sont responsables des phénomènes allergiques alors qu'ils sont inoffensifs et sans conséquence pour quelqu'un de non atopique [3].

Les allergènes peuvent pénétrer par ingestion (allergie alimentaire), par inspiration de l'air (allergie au pollen, aux poils d'animaux...), par piqûre (allergie aux hyménoptères...) ou par contact épidermique (allergie de contact) [3].

- **Les pneumallergènes**

Les pneumallergènes ou allergènes aéroportés ou allergènes respiratoire sont présents dans nos environnements extérieur et intérieur, personnel ou professionnel. Leur taille, mesurée selon leur diamètre aérodynamique, est très importante car les particules se déposent au niveau des fosses nasales, de l'arbre trachéo-bronchique ou des alvéoles en fonction de leur taille, les pneumallergènes sont très souvent impliqués dans la genèse des, rhinite, conjonctivite et asthme. On les classe en allergènes perannuels (acariens de la poussière de maison, moisissures et phanères d'animaux) et allergènes saisonniers (pollens et moisissures dans certaines régions) (**Demoly, 2005**).

- **Les trophallergènes**

Les trophallergènes, dont la pénétration se fait par voie digestive et que l'on rencontre dans les produits laitiers, les viandes, les poissons, les oeufs et même certains fruits et légumes. Le terme trophallergènes (grec trophê : nourriture et allergène) désigne l'antigène qui est absorbé par le tractus digestif (l'appareil digestif) et qui possède la capacité de déclencher une réaction immunologique [4].

- **Les allergènes de contacts**

Ils sont très nombreux responsables d'eczéma et de dermatite souvent professionnelles. Le latex, certes un allergène de contact, et beaucoup plus un aéro-allergène, inclus dans de fines particules en suspension dans l'air (comme les allergènes du chat) : d'où son ubiquité et sa nocivité (**Dutau ,2006**).

- **Allergènes injectés**

Les allergènes de venins d'hyménoptères (guêpe, abeille, frelon) pouvant être à l'origine de chocs anaphylactiques mortels (**Gharnouge et Saadna, 2012**).

2.1. Historique de l'allergie aux Chironomidae

L'hypersensibilité aux Chironomidae (moucheron non piqueurs) a été un problème dans le nord du Soudan depuis environ 1927 et est probablement due à l'exploitation de barrages (Kay *et al.*, 1978). Ainsi que durant les années 1950, des réactions d'hypersensibilité aux Chironomidae ont été rapportés, principalement au Japon, les États-Unis et l'Égypte. Ce sont des pays où, dans certaines régions, les Chironomidae sont l'un des plus allergènes communs par inhalation, causant souvent des rhino-conjonctivites et l'asthme (Suzuki *et al.*, 1995).

En 1985, Eriksson et ses collaborateurs ont démontré que les sensibilisations simultanées aux Chironomidae et les Moustiques (*Aedes*) sont communs. Dans une étude ultérieure (Erikson et ses collaborateurs 1989), par l'intermédiaire des techniques d'inhibition : RAST (Radio Allergo Sorbent Test), ils ont conclu qu'il existe une réaction croisée entre les Chironomidae (allergènes par inhalation) et les crevettes (allergènes par la consommation) (Cabrerizo Ballesteros *et al.*, 2006).

En Europe, l'allergie aux Chironomidae a parfois été observée chez les personnes qui manipulent des aliments pour poissons en raison des aquariums, ou dans le lieu de travail, même si Erikson et ses collaborateurs (1989) ont décrit des cas d'allergie environnementale en Suède dans les zones rurales à proximité des lacs et des rivières où l'espèce est abondante (Liebers *et al.*, 1993, 1994).

En Espagne, un cas d'urticaire et œdème de Quincke a été signalé à cause du contact avec des larves de Chironomidae (*Chironomus thummi thummi*) chez un patient atteint d'allergie au pollen. Cette dernière s'est aggravée six mois après que le patient a commencé à travailler dans un magasin pour animaux de compagnie, où le test de la piqûre pour les larves de Chironomidae était positif (Komase *et al.*, 1997).

2.2. Description de l'allergène

2.2.1. Les Chironomidae (biologie et écologie)

La famille des Chironomidae est un groupe d'insectes Diptères du sous ordre des Nématocères. Les membres de cette famille sont appelés communément « les moucheron non piqueurs » ou « Non Biting Midges des anglophones » au stade adulte et « blood worms » au

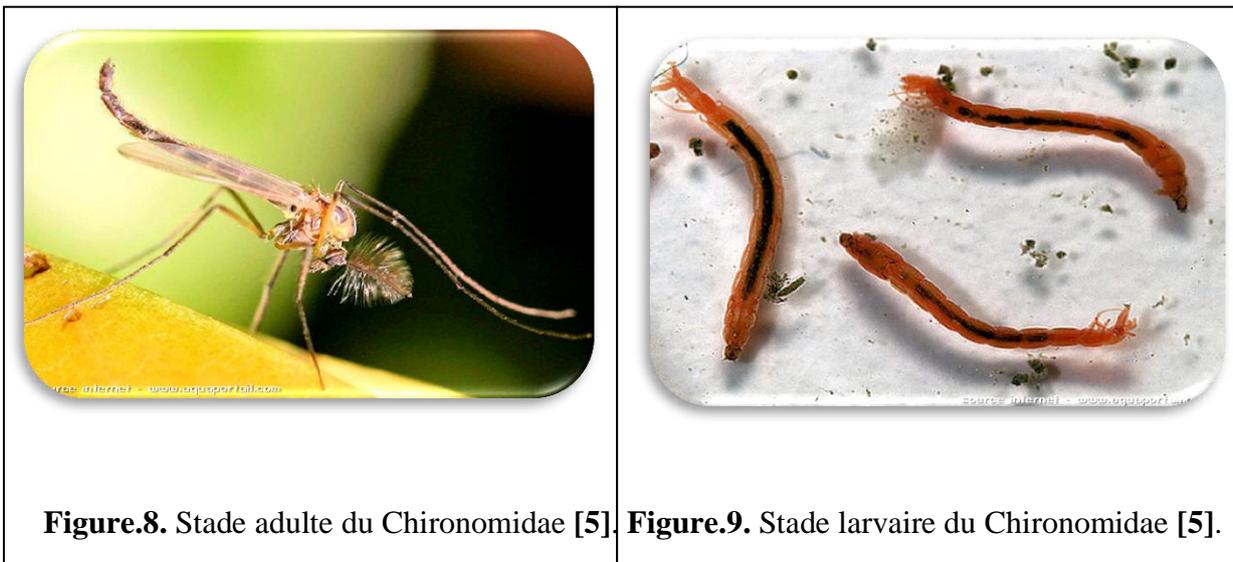
stade larvaire. Les larves des Chironomidae sont également bien connues sous le nom de : « ver de vase » (**Armitage et al., 1995**).

Les Chironomidae sont souvent le groupe de macroinvertébrés le plus abondant, en nombre d'espèces et individus, rencontrés dans tous les milieux aquatiques d'eaux douces. De même les Chironomidae se présentent dans tous les continents (**Kohchima, 1984**).

Les Chironomidae sont des Diptères faisant partie du groupe morphologique des culiciformes c'est-à-dire que leur aspect général est celui d'un moustique (**Zerguine, 2010**).

Les Chironomidae sont parmi les insectes aquatiques les plus tolérants à la température de l'eau et de l'air. Ce sont des insectes holométaboles, leurs larves, nymphes et adultes forment une part intégrale de la chaîne trophique servant de nourriture pour d'autres invertébrés, poissons, oiseaux et amphibiens (**Ali, 1991, Armitage et al., 1995**). Leur cycle de développement comporte trois états morphologiquement très différents qui, tous en ayant un aspect général identique d'une sous-famille à l'autre, présentent des variations anatomiques qui constituent des bases essentielles de la systématique (**Zerguine, 2010**).

La famille des Chironomidae comprend des espèces caractérisées au stade adulte, nymphes et larves généralement pourvues d'hémoglobine et colorées en rouge (**Zerguine, 2010**) (**Figures 8,9 et 10**).



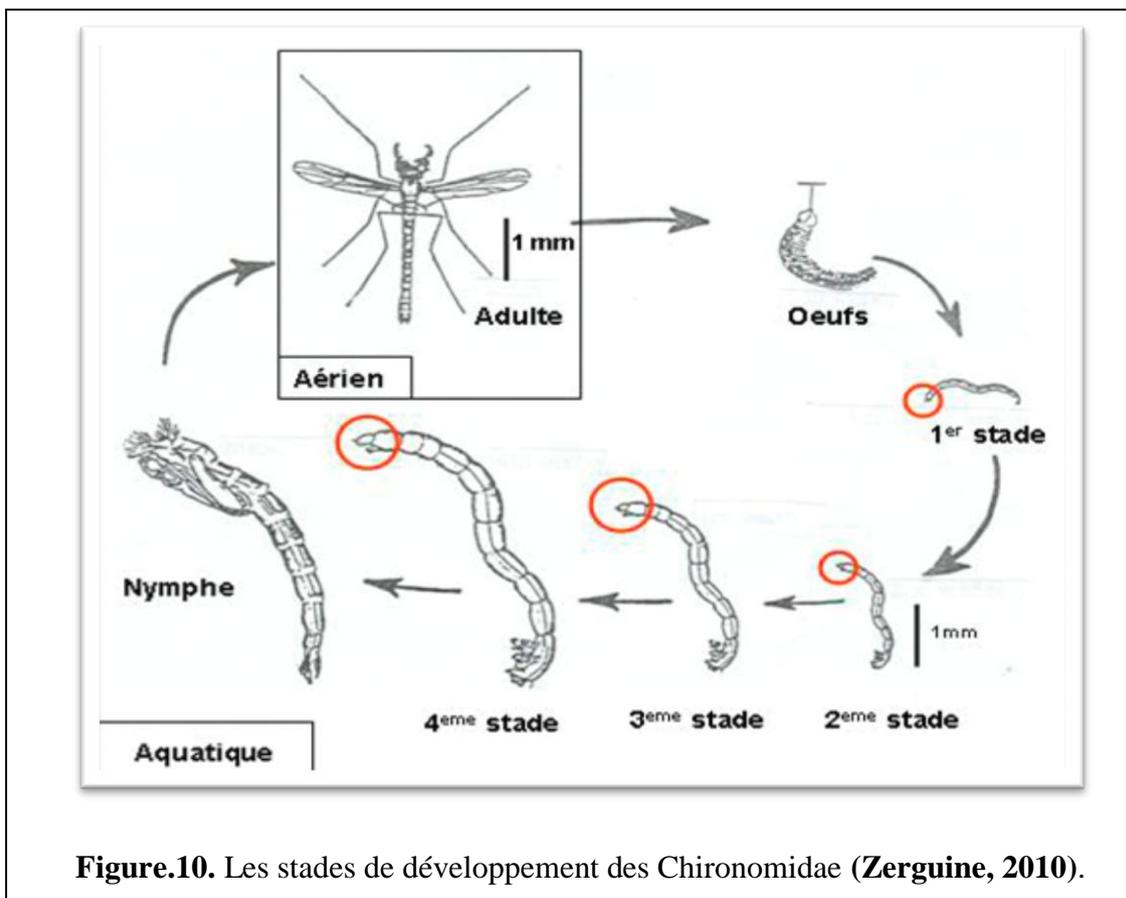


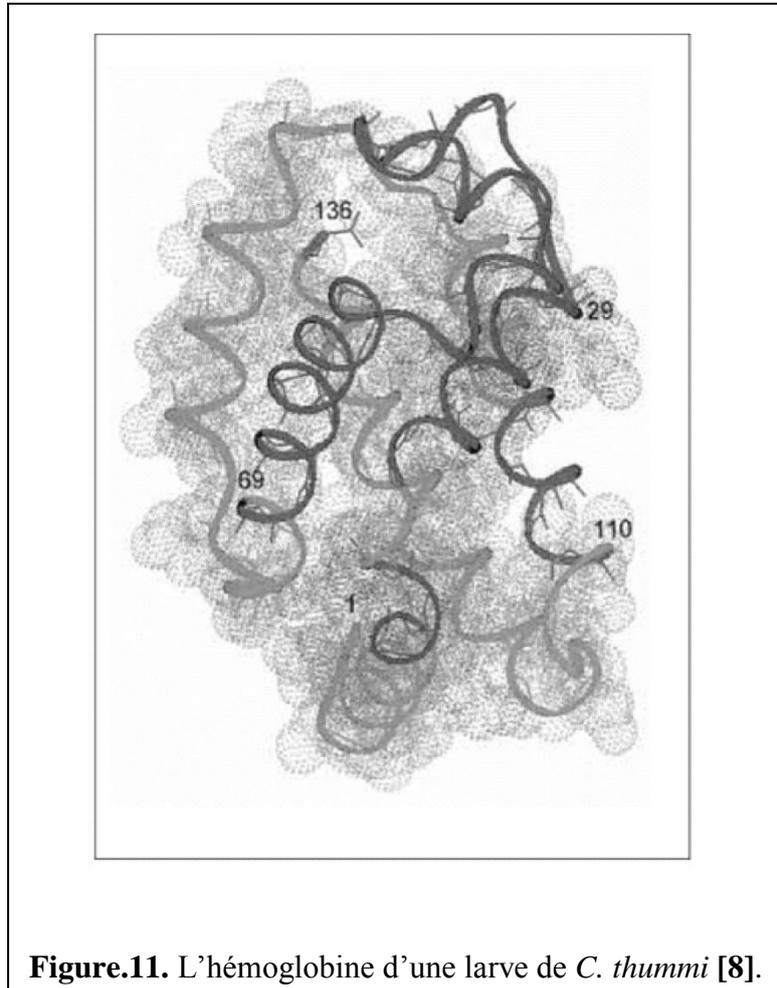
Figure.10. Les stades de développement des Chironomidae (Zerguine, 2010).

2.2.2. L'hémoglobine larvaire

L'hémolymphe de Chironomidae contient des molécules d'hémoglobine qui ont un haut degré de polymorphisme en fonction de l'environnement et de l'état de développement de l'insecte (Matsuoka *et al.*, 1990), où le nombre maximum se trouve au stade larvaire et diminue progressivement, pour atteindre le minimum à l'état adulte (Cabrerizo Ballesteros *et al.*, 2006). Ces hémoglobines sont des allergènes puissants qui peuvent sensibiliser et provoquer la maladie allergique [6].

L'hémoglobine est en fait un mélange de plusieurs protéines synthétisées et sécrétées par la graisse du corps larvaire [7]. Des études ont été menées pour caractériser les allergènes du point de vue chimique. Ces études indiquent que les principaux allergènes appartiennent à un groupe des acides peptidiques avec une forte corrélation et des poids moléculaires qui sont situés entre environ 15 et 20 Kilo Dalton (KD) (Cabrerizo Ballesteros *et al.*, 2006). Contrairement aux hémoglobines des vertébrés tétramériques, l'hémoglobine des Chironomidae ne montrent pas de liaison coopérative d'oxygène, existant soit en tant que monomères ou homo-dimères [7].

D'autre part, la comparaison de la structure tridimensionnelle d'une hémoglobine de Chironomidae monomère (déterminée par cristallographie aux rayons X) avec celle des globines des vertébrés révèle de nombreuses caractéristiques structurales communes, y compris l'organisation en hélice et une poche de l'hème hydrophobe caractéristique. Les différences dans la structure primaire entre globines d'organismes très différents reflètent l'adaptation aux besoins en oxygène spécifique aux espèces sur de longues périodes évolutives [7] (Figure 11).



2.2.3. Les espèces allergéniques

Les Chironomidae représentent la famille d'insecte la plus abondante et la plus diversifiée. Le nombre total de toutes les espèces étant estimées à environ 10.000 espèces distribuées dans le monde (Yong et al., 1999).

Plusieurs travaux ont montré que quelques espèces Chironomidiennes peuvent provoquer des réactions allergiques, parmi lesquelles :

Cladotanytarsus lewisi (Kay et al., 1978, Cranstan et al., 1981 et Baur et al., 1983), *Chironomus thummi* (Baur et al., 1983, Leibers et al., 1993 et Cabrerizo Ballesteros et al., 2006), *C. plumosus* (Baur et al., 1983, Kim et Park, 1994 et Teranishi et al., 1995), *C. Bernensis* (Baur et al., 1983), *C. annularius* (Baur et al., 1983), *C. tepperi* (Baur et al., 1983), *C. tentans* (Baur et al., 1983), *C. moratensis* (Baur et al., 1983), *C. holomelas* (Baur et al., 1983), *C. luridus* (Baur et al., 1983), *C. dorsalis* (Baur et al., 1983), *C. piger* (Baur et al., 1983), *Einfeldia sp* (Baur et al., 1983), *Glyptotendipes pallens* (Baur et al., 1983), *C. yoshimatsui* (Matsuoka et al., 1988, Edahiro et al., 1989, Matsuoka et al., 1990 et Komase et al., 1997), *Cricotopus sylvestris* (Kampen et al., 1994), *Tokunagayusurika akamusi* (Kim et Park, 1994), *Polypedilum nubifer* (Kawai et Muraguchi, 1998) et *C. kiiensis* (Yong et al., 1999 ; Jeong et al., 2004).

Un grand nombre de patients sont susceptibles de se trouver dans le voisinage des eaux stagnantes où les moucheron de Chironomidae émergent en grand nombre. Des niveaux élevés des antigènes de ces insectes, dans l'air et le sol ont été démontrées, et avec une variation saisonnière qui atteint un pic unique dans l'automne a également été examinée (Jeong et al., 2004).

Dans la nature, les allergènes des larves mortes et sèches sont exposés à l'Homme. Une fois les larves sont devenues sèches, elles se sont détruites en toutes petites particules. Donc les antigènes exposés à l'Homme et qui se trouvent dans les larves sèches doivent être différents et uniquement une sorte bien limitée des allergènes qui peuvent être inhaler par les gens Chironomidae-sensitifs (Yong et al., 1999).

2.3. Facteurs de risque allergique

- **Atopie**

L'association de manifestations cliniques d'hypersensibilité et de la production excessive d'IgE représente sans doute la définition la plus sûre du concept d'atopie, encore que l'IgE soit une immunoglobuline normale du sérum et que des IgE spécifiques soient produites chez la plupart des sujets normaux après une stimulation antigénique adéquate. Le terme « atopie » était surtout appliqué autrefois aux manifestations allergiques de type immédiat vis-à-vis des substances de notre environnement (pollen, poussières,...), associées à une notion de « terrain » (David et al., 1996).

On peut appliquer actuellement ce terme proposé de l'hypersensibilité immédiate due aux substances naturelles inhalées ou ingérées et où l'on observe une régulation de la réponse à IgE transmise héréditairement (**David et al., 1996**).

En fonction de la source d'exposition, l'allergie aux Chironomidae peuvent être de différentes origines.

1) l'environnement: Dans les établissements à proximité des lacs tels qu'au Soudan, Venise et certaines régions du Japon (**Suzuki et al., 1995**).

2) Travail: Dans les questionnaires de nourriture pour poissons, dans le lieu de travail (usines de poisson de consommation, les pêcheurs, les animaleries...) comme dans certains pays européens (**Liebers et al., 1993**).

3) Liés aux loisirs: Dans les pays où les larves de Chironomidae sont commercialisés (*C. thummi thummi*) comme nourriture de poissons (**Aldunate et al., 1999**).

2.4. Réaction croisée (avec d'autres allergènes)

Les réactions croisées en allergie sont la conséquence de la présence dans des agents allergisants différents d'un ou de plusieurs allergènes croissants. Ce sont des allergènes, le plus souvent de nature polypeptidique, identiques ou qui présentent des analogies de structure (épitopes communs). On peut alors trouver dans le sérum des sujets sensibilisés à de tels agents, des anticorps IgE qui réagissent avec plusieurs agents allergisants : ce sérum présente une réactivité croisée (**David et al., 1996**).

La réactivité croisée entre les espèces de Chironomidae a été largement rendu compte. En outre, la réactivité croisée à d'autres allergènes, tels que les moustiques communs, mites, Acariens, crevettes, blattes ont été signalés [6].

Bien que les réactions croisées des allergènes sont présents, en particulier l'hémoglobine (un allergène majeur de réactivité croisée entre espèces de Chironomidae), d'autres panallergènes peuvent aussi être présents, ainsi que les allergènes spécifiques à l'espèce (**Baur et al., 1991, Komase et al., 1997**). En outre, l'allergénicité des Chironomidae change au cours de la métamorphose de la larve à l'adulte, et n'est pas fréquente chez toutes les espèces (**Matsuoka et al., 1988**). Ceci est illustré dans l'évaluation de la réactivité croisée immunologique entre 14 espèces de Chironomidae provenant de différents continents, en utilisant la fraction d'hémoglobine *C. thummi thummi*, qui a révélé que la réactivité croisée est

au moins principalement à partir de composants de l'hémoglobine avec des déterminants antigéniques communs aux différentes espèces (Baur *et al.*, 1983).

2.5. Mécanisme d'allergie aux Chironomidae

Les Chironomidae devraient être considérés comme des allergènes environnementaux et professionnels importants. En effet l'hypersensibilité aux larves a été signalé à provoquer de l'urticaire, rhino-conjonctivite, asthme et même l'anaphylaxie (Kay *et al.*, 1978).

Les Chironomidae sont responsables des réactions d'hypersensibilité de type I (qui causent la rhino-conjonctivite, l'asthme, l'urticaire) et aussi des réactions de type IV (dermatite de contact) (Brasch *et al.*, 1992 in « Aldunate *et al.*, 1999 »). Ces insectes provoquent des maladies respiratoires allergiques dans les zones aquatiques du Soudan, de l'Égypte, Japon et l'U.S.A (Kino *et al.*, 1987, Hirabayashi *et al.*, 1997).

2.6. Les aspects cliniques d'allergie

2.6.1. L'Asthme

L'asthme est un syndrome caractérisé par une hyperréactivité bronchique et une inflammation des voies aériennes associée à une obstruction bronchique réversible avec ou sans traitement (Busse *et Lemanske*, 2001). C'est une maladie inflammatoire des bronches touchant à la fois la partie endoluminale (présence de polynucléaires) et la partie pariétale de la paroi des bronches (présence de polynucléaires éosinophiles, de lymphocytes et de mastocytes) (Sudre, 2009).

Au Japon, les Chironomidae en particulier *C. yoshimatsui*, sont considérés comme l'un des allergènes les plus importants de l'asthme. Dans une étude de près de 40% des patients souffrant d'asthme avait des taux élevés d'IgE spécifiques aux Chironomidae (Edahiro *et al.*, 1989). Des résultats similaires sont rapportés dans d'autres études (Ito *et al.*, 1989). Des patients atteints d'asthme vivant près d'un lac eutrophe, 12-21% étaient positifs au test IgE sériques de différentes espèces de Chironomidae (Hirabayashi *et al.*, 1997). De même, dans une communauté au bord du lac eutrophisé près d'Oxford au Royaume-Uni, où les Chironomidae ont été étudiés comme l'une des causes de l'asthme, environ 8% de l'ensemble de la communauté ont développé des anticorps IgE. Bien que l'incidence des réactions allergiques chez cette communauté était faible, IgE spécifique corrélé de façon significative avec les symptômes pertinents [6] (Figure 12).

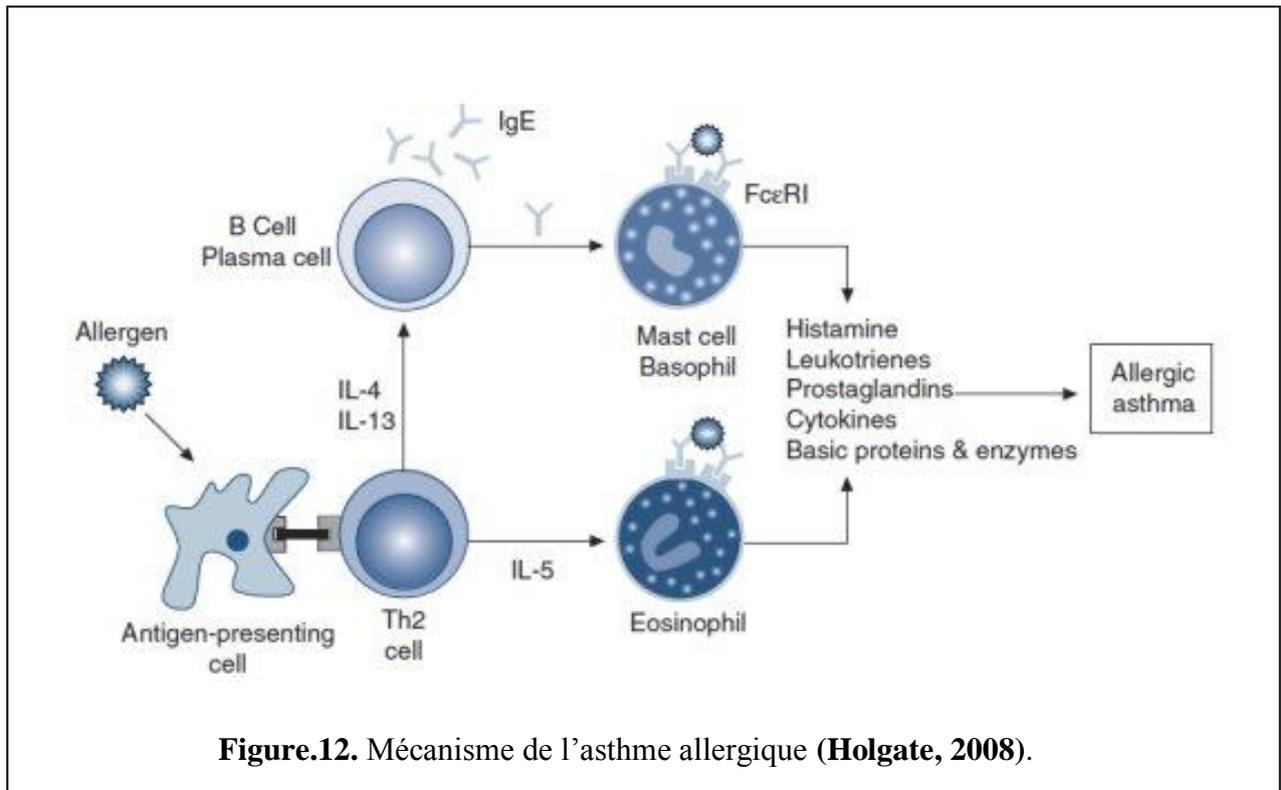


Figure.12. Mécanisme de l'asthme allergique (Holgate, 2008).

2.6.2. La rhinite allergique

La rhinite allergique se définit comme l'inflammation des voies aériennes supérieures chez une personne sensibilisée en présence d'un allergène. Les symptômes associent une rhinorrhée, des éternuements, une obstruction et un prurit nasal. On peut distinguer schématiquement deux entités cliniques IgE médiée : la rhinite allergique pollinique saisonnière (pollinose ou rhume des foins) associée à une conjonctivite et parfois à une crise d'asthme, et la rhinite allergique persistante qui peut être reliée à la sensibilisation aux allergènes domestiques (par exemple : acariens des poussières ou animaux) (Sudre, 2009).

Le mécanisme de la rhinite allergique se définit par la présence chez certains individus d'anticorps (IgE) qui reconnaissent un allergène. Lorsque l'anticorps est exposé à l'allergène, il s'y lie et cela mène à une réaction inflammatoire. La réaction inflammatoire se caractérise par la libération de plusieurs médiateurs inflammatoires (histamine, tryptase, leucotriènes...) qui mènent à l'apparition de signes et symptômes typiques de rhinite allergique [9].

L'asthme et la rhinite causée par une hypersensibilité aux Chironomidae a été un problème au Soudan depuis environ 1927 et semble être dû à une seule espèce de Chironomidae, *Cladotanytarsus lewisi* (Cranstan et al., 1981). Des recherches ultérieures

ont impliqué une série des autres Chironomidae, et en particulier *C. thummi*, comme des causes importantes de sensibilisation chez les personnes exposées à cet insecte (**Cabrerizo Ballesteros, 2006**).

2.6.3. Conjonctivite allergique

La conjonctivite allergique est une inflammation de la membrane qui recouvre la face antérieure de l'œil et l'intérieur des paupières (La conjonctive), la cornée n'est pas atteinte. Elle entraîne une rougeur du blanc de l'œil et de l'intérieur des paupières. La conjonctivite est fréquente et en général, sans danger pour la vision en l'absence de complication. Elle survient suite à un contact avec un allergène. Les yeux démangent, ils sont gonflés et larmoyants. Il faut rechercher les facteurs déclenchant l'allergie [10].

Selon les travaux de Kay et ces collaborateurs (1978) sur une espèce de Chironomidae (*Cladotanytarsus lewisi*), un état de rhino-conjonctivite a été signalé.

2.6.4. Dermatite de contact

La réaction à l'allergène est limitée au point de contact et représente une réaction d'hypersensibilité de type retardé (type IV). Le test épicutané est utilisé pour identifier l'allergène (**Burmester et al., 2000**).

Dermatite de contact aux protéines de *C. thummi thummia* été signalée. Une étude utilise des tests de patch a révélé une hypersensibilité de type retardé vis-à-vis quatre espèces différentes de Chironomidae (larves de *C. thummi*, *C. plumosus*, et deux espèces différentes de *Glyptotendipes*) comme la cause probable de la dermatite de contact du visage. En outre, l'allergie asymptomatique de type immédiat aux Chironomidae a été démontrée par des tests de grattage et d'IgE spécifique [9] (**Figure 13**).

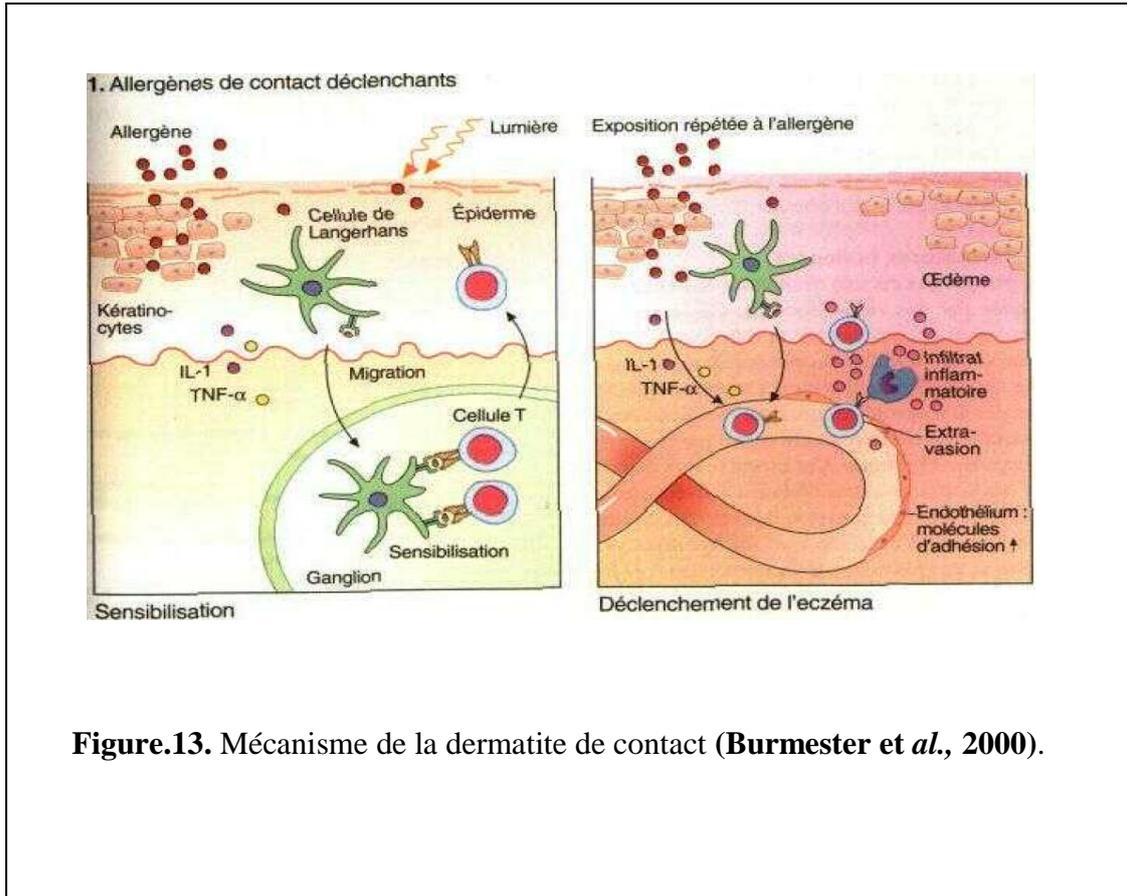


Figure.13. Mécanisme de la dermatite de contact (Burmester et al., 2000).

3.1. Matériel

3.1.1. Matériel biologique

Notre étude a porté sur les effets allergisants de l'extrait larvaire des Chironomidae (Diptera : Insecta) , en utilisant comme modèle animal des souris femelles blanches, âgées de quatre à huit semaines avec un système immunitaire mature, ces souris proviennent de l'animalerie de l'Institut de Pharmacie de Constantine,

Ces souris blanches (*Mus musculus*) sont des mammifères rongeurs de la famille des Muridés, de type végétariens à forte tendance omnivores. Ce sont de petite taille de 7 à 10 cm de long pour un poids de 20 à 50 g environ. Elles possèdent un museau pointu et une queue qui peut être aussi longue que son corps, celui-ci est totalement recouvert de poils [11] (Figure 14).



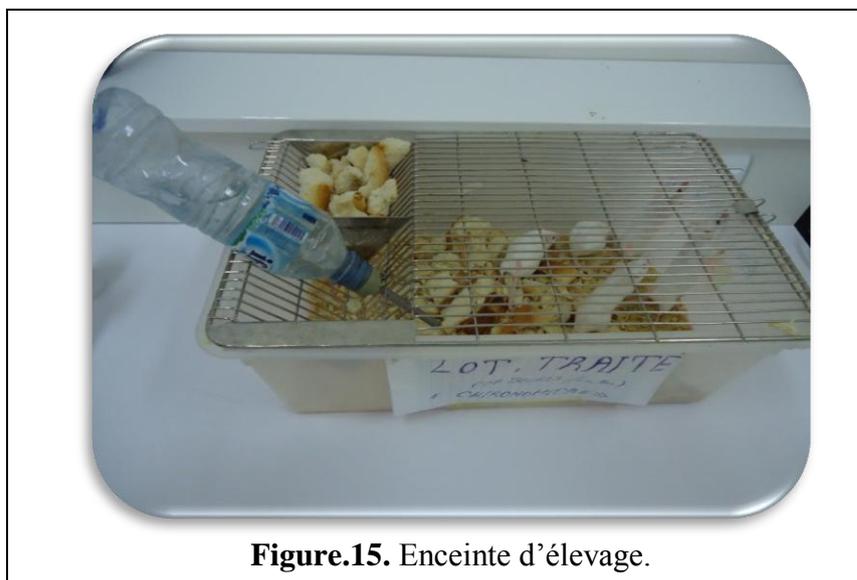
Figure.14. Souris blanche.

3.1.2. Enceinte d'élevage

Les souris sont élevées dans des cages en polypropylène avec grillage sur le dessus qui sont nettoyés régulièrement, la litière est constituée de copeaux de bois, elle est changée quotidiennement (Figure 15).

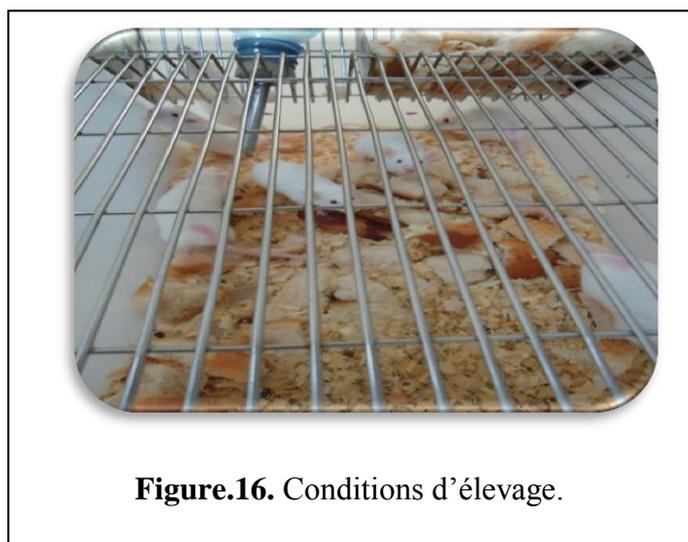
Les souris sont réparties d'une façon aléatoire en deux lots. Chaque lot contient quatre souris :

- ❖ Lot témoin.
- ❖ Lot traité par l'extrait brut de Chironomidae.



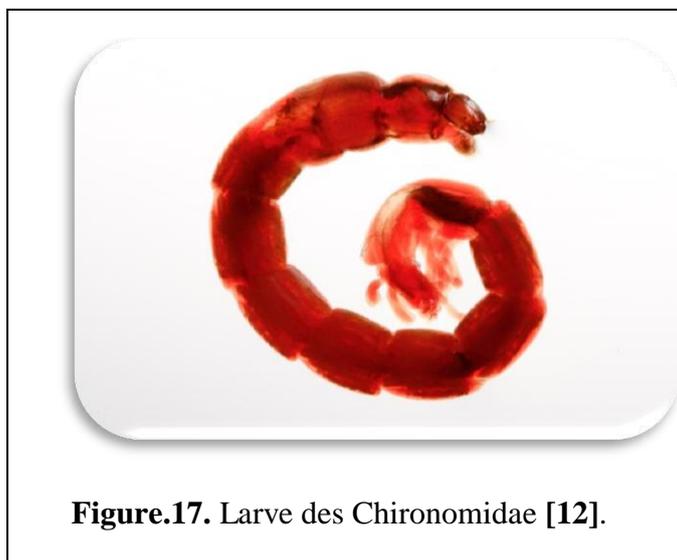
3.1.3. Conditions d'élevage

Les souris sont élevées dans l'animalerie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, et des sciences de la terre et l'Univers de l'université de 8 Mai 1945 de Guelma dans un environnement propre où les conditions d'hygiène sont respectées, le milieu d'élevage est caractérisé par une photopériode et une température naturelle, leurs besoins nutritionnels est assuré par le pain rassis et de l'eau (**Figure 16**).



3.1.4. Extrait brut

Dans notre étude on a travaillé sur l'extrait brut d'une espèce allergisante qui appartient à la famille de Chironomidae (**Figure 17**).

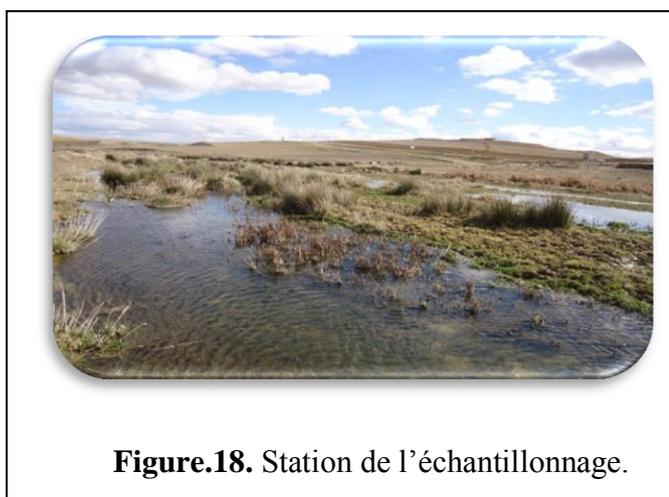


3.2. Protocole expérimental

3.2.1. Préparation de l'extrait brut

A. Récolte des échantillons

A partir d'une étude préliminaire qui nous a permis de choisir une station (rivière) typique qualitativement et quantitativement, c'est à dire qu'elle regroupe les espèces allergisantes d'une part, et d'autre part une quantité suffisante de ces espèces afin de préparer un extrait brut, on a récolté des larves de Chironomidae dépouillées, séchées et conservées à 4°C pour l'utiliser ultérieurement (**Figure 18**).



B. Extraction de l'allergène :

1. Dégraissage :

Après avoir décongelé nos échantillons larvaires pendant quatre heures à 4°C, on les met sur la paillasse pendant la même durée pour éviter tout choc ou dénaturation de l'échantillon. Le dégraissage est réalisé par l'Ether Di-éthylique ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$) dans un bécher pendant 24 heures et avec trois changements d'Ether (**Figure 19**).

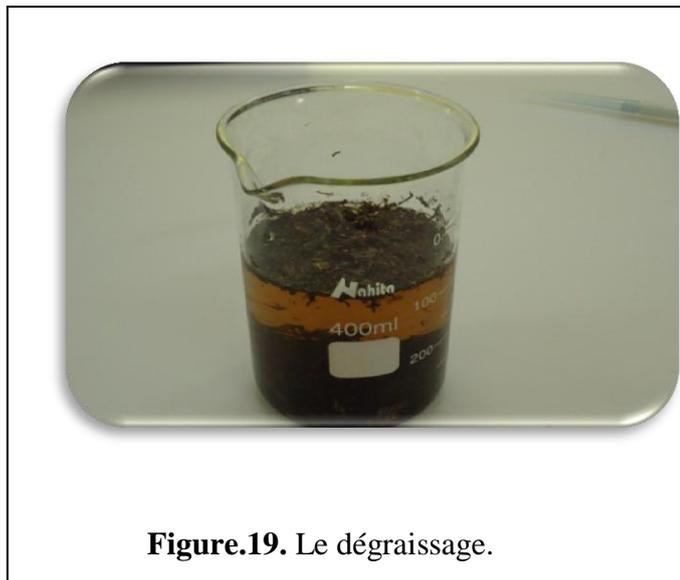


Figure.19. Le dégraissage.

2. Séchage

Il consiste à l'élimination de l'excès d'Ether par filtration, puis on laisse l'échantillon sécher à l'air pendant 48 heures (**Figure 20**).



Figure.20. Le séchage.

3. Extraction par le PBS

Après le séchage complet de l'échantillon, on met notre échantillon larvaire dans la solution de PBS ; pour chaque gramme de matière sèche on a 20 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline) (Voire annexe) (**Figure 21**).

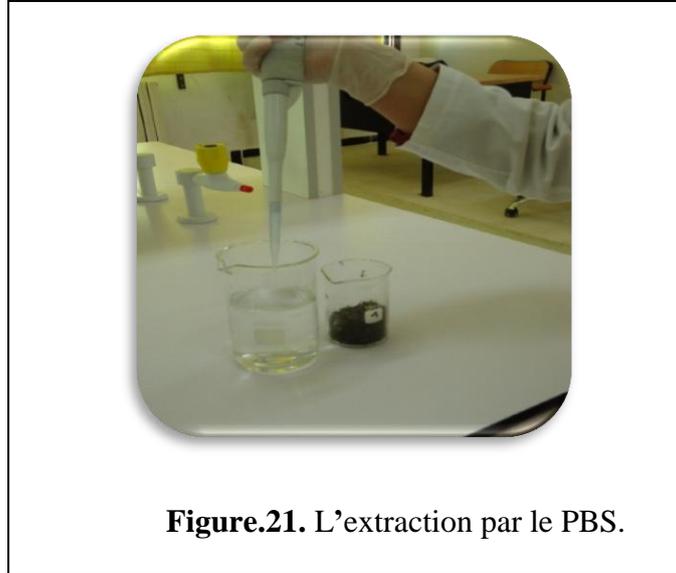


Figure.21. L'extraction par le PBS.

4. Homogénéisation et incubation :

A l'aide d'un broyeur avec mortier et piston en verre borosilicaté transparent avec un bec on réalise l'homogénéisation de la solution à 4°C (**Figure 22**).

Après, on incube cette solution à 4°C pendant 14 heures.



Figure.22. L'homogénéisation.

5. Centrifugation

La solution doit être centrifugée à 15000 rpm (Rotation par minute) pendant 15minutes pour récupérer les surnageants (**Figure 23**).



Figure.23. La centrifugation.

6. Filtration :

Les surnageants récupérés sont filtrés à travers des filtres millipores de 0.45 μ m de diamètre (**Figure 24**).



Figure.24. La filtration.

7. Lyophilisation

Le lyophilisateur est constitué d'une chambre transparente avec huit robinets livrés avec huit flacons de 75 ml de volume (**Figure 25**).

Notre échantillon doit être congelé 24 heures avant d'être lyophilisé.



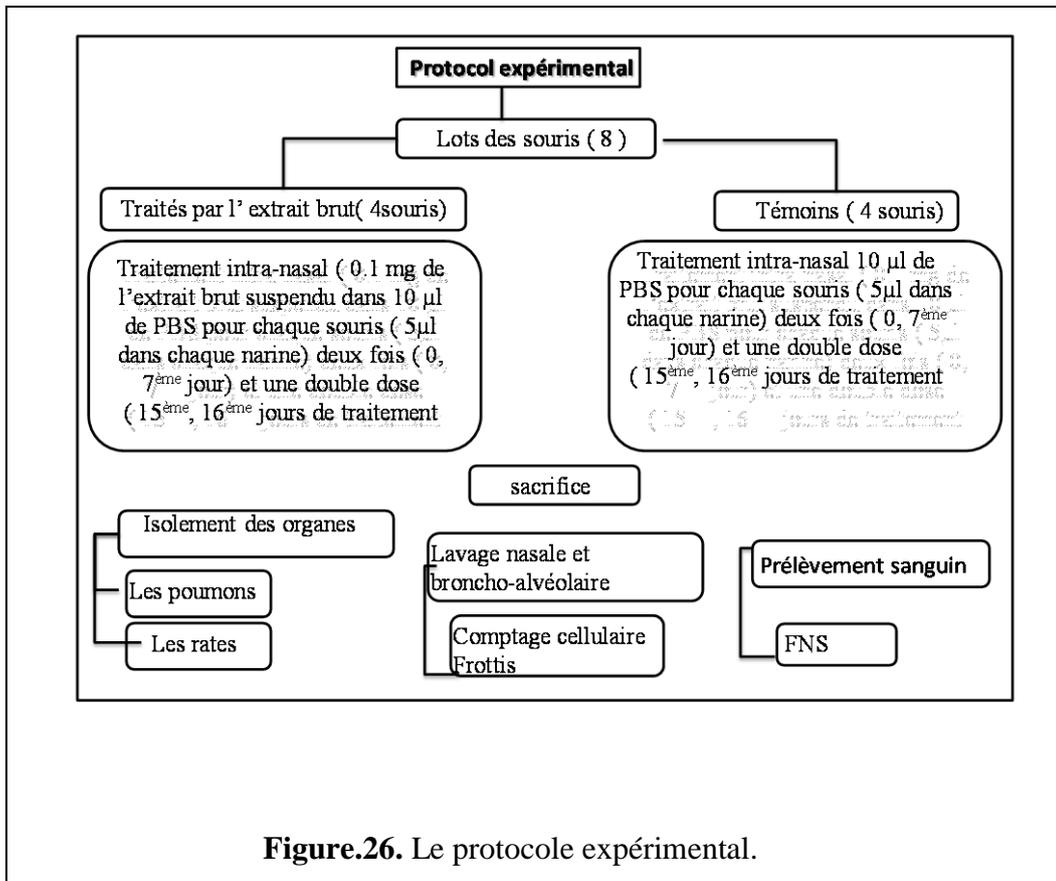
Figure.25. La lyophilisation.

3.2.2. Plan de travail

Les différentes étapes effectuées durant notre travail expérimental sont indiquées dans la (**Figure 26**).

3.3. Traitement des souris

Les souris ont été divisées en deux lots, chacun comprenant 4 souris, les souris du premier lot (témoins) ont reçu des instillations intranasales de PBS aux jours 0 et 7 en raison de 5 μ l dans chaque narine. Aux jours 15 et 16 du traitement, les souris sont traitées par une double dose de PBS (10 μ l dans chaque narine). Les souris du deuxième lot (les traitées) ont reçu des instillations intranasales de l'extrait larvaire en raison de 5 μ l dans chaque narine aux jours 0 et 7. Aux jours 15 et 16 du traitement, les souris sont traitées par une double dose de l'extrait larvaire. Le sacrifice a eu lieu au jour 17, soit 24 heures après la dernière injection et les différentes analyses « Lavage nasal, broncho-alvéolaire, comptage cellulaire (Splénocytes, cellules immunitaires des deux liquides de lavage des témoins et des traitées) d'étude histologique, des frottis et des prélèvements sanguins pour les deux lots » sont réalisées (**Romy et al., 2005**) (**Figure 27**).



3.4. Lavage nasal

Le lavage nasal a été réalisé sur des souris anesthésiées en instillant dans chaque narine 1,5 ml de tampon phosphate à 37°C (PBS) à l'aide d'une seringue (Urbain et al.,

1994). Le liquide récolté dans les deux cavités nasales a été centrifugé (800 g pendant 15 minutes). Chaque culot a été suspendu dans 0,9 ml de PBS (Urbain *et al.*, 1997) (Figure 28).

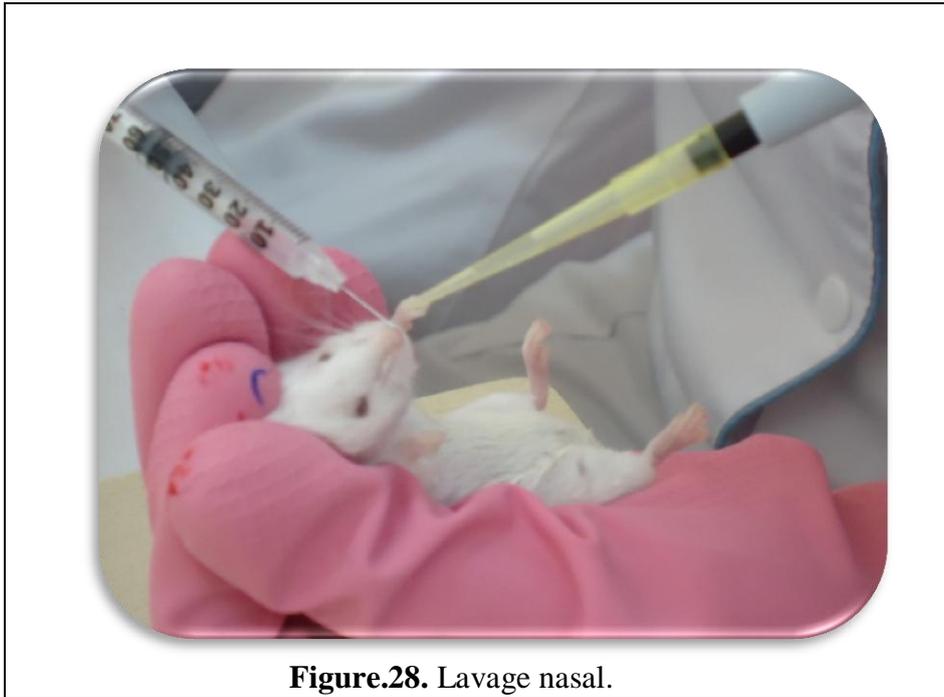


Figure.28. Lavage nasal.

3.5. Lavage broncho-alvéolaire

Au 17^{ème} jour, les souris euthanasiées par l'exposition au chloroforme ont subi des lavages broncho-alvéolaire, la technique consiste à ouvrir la cage thoracique des souris et à pratiquer une incision dans la trachée, un peu en dessous du larynx. Un cathéter était ensuite inséré dans la trachée par cette même incision, puis immobilisé par un fil chirurgical (Geneviève, 2005). Des seringues remplies de 0,5ml de PBS étaient reliées au cathéter. Le PBS était ensuite injecté dans le poumon, puis réaspiré dans la seringue. Les cellules alvéolaires ont aussi été obtenues suite à un double lavage de 0,5 ml. La suspension recueillie était par la suite centrifugée à 1500 rpm pendant 6min (Li *et al.*, 2010) (Figure 29).



Figure.29. Lavage broncho-alvéolaire.

3 .6. Les frottis des liquides nasaux et broncho-alvéolaires

Des frottis des différents liquides nasals et broncho-alvéolaires issus des différentes souris (traitées et témoins) ont été réalisés.

Une goutte du liquide (nasal ou broncho-alvéolaire) de taille moyenne est déposée de 1.5 cm du bord droit d'une lame. La goutte a été étalée par capillarité en la mettant au contact de l'arête de la lamelle rodée tenue à 45 degrés, puis la lamelle est poussée rapidement vers la gauche de la première lame en entraînant le liquide qui s'étale en une couche mono cellulaire (Frottis).

Le frottis est passé à la coloration au **May-Grünwald–Giemsa (MGG)**, en déposant 10 à 15 gouttes de May-Grünwald et laissé se fixer pendant 3 mn. Puis 10 à 15 gouttes d'eau tamponnée sont déposées et mélangées par rotation de la lame 1 mn.

Le frottis a été recouvert de Giemsa dilué pendant 15 mn puis lavé à l'eau neutre et laissé sécher à l'air libre, après on passe à l'observation microscopique [13] (**Figure 30**) (voire l'annexe).

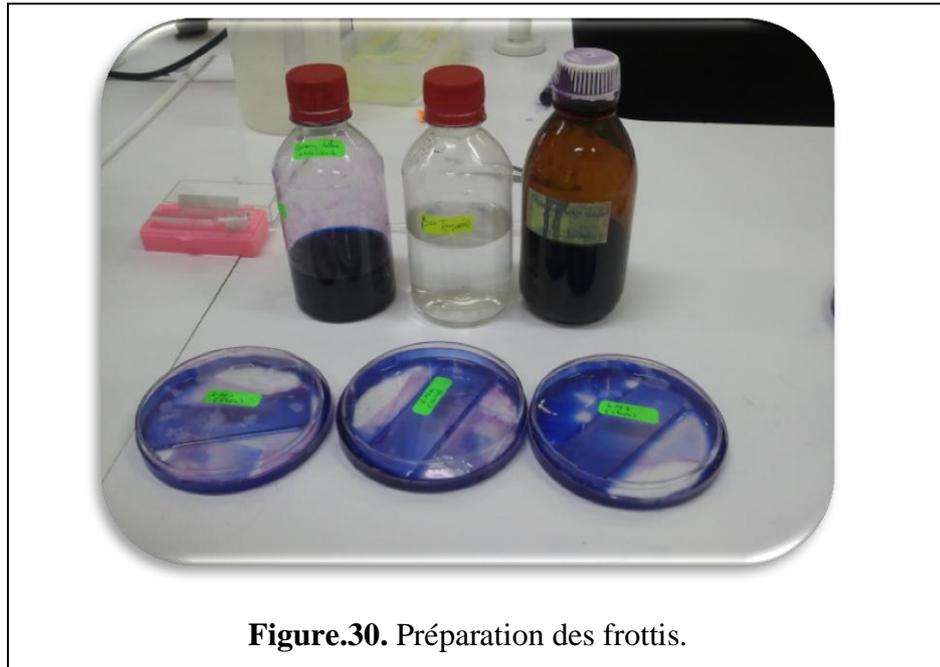


Figure.30. Préparation des frottis.

3.7. La numération cellulaire

Après centrifugation, la suspension cellulaire de chaque liquide de lavage est mise dans des tubes polycarbonatés séparés en raison de 100µl, puis 900 µL de la solution 0,2 % de bleu de Trypan (voire annexe) sont ajoutés. Enfin on passe au comptage qu'est effectué sur une cellule de Malassez et les résultats sont exprimés en leucocytes par litre de liquide récolté.

- Le nombre des leucocytes par litre est calculé selon l'équation suivante:

$$N=(n/v)f$$

Avec : N: Nombre de cellules par litre.

n : nombre de cellules comptées.

V: volume de comptage en litre.

f : facteur de dilution.

3.8. Prélèvement sanguin

Après avoir égorgé les souris, une quantité de sang a été recueillie dans des tubes d'Ethylène-Diamine-tétra-Acétique (EDTA) afin d'éviter la coagulation pour la réalisation de la Formule Numérique Sanguine (FNS) (**Figure 32**).



3.9. Prélèvement des organes

Après dissection des souris, on prélève les poumons et la rate et on les pèse pour évaluer l'état d'hypersensibilité. Les poumons sont conservés dans le formol 1% pour l'étude histologique.

3.10. Isolement des splénocytes

Après avoir pesé la rate, cette dernière est déposée dans une boîte de pétri contenant 3ml de solution de PBS et est débarrassée de la graisse. A l'aide de deux pinces, la capsule est vidée de son contenu cellulaire (**Figure 33**).

La suspension cellulaire est ensuite placée dans un tube en être filtrée sur une gaze fixée à un entonnoir et puis centrifugée pendant 10 min. à 1500 rpm.

On remet le culot en suspension dans 0.5ml de PBS, puis on lui ajoute 4.5ml de solution de lyse (voire annexe) des globules rouges. Après une incubation de 10 min, la suspension est centrifugée 10 min. à 1500 rpm. Cette dernière est suivie par l'élimination du surnageant alors que le culot est remis en suspension dans 3ml de PBS, centrifugé 10 min. à 1500 rpm. Cette dernière étape est répétée deux fois.

A la fin du dernier lavage, le culot cellulaire est repris dans 3ml de PBS et puis on passe au comptage des splénocytes après avoir dilué 100µl de la suspension dans 900µl de bleu de

trypan, ainsi le pourcentage de viabilité de ce type cellulaire est calculé (Ducan, 1995 et Daun *et al.*, 1995).



Figure.33. La dilacération de la rate.

4.1. Effet de l'extrait larvaire de Chironomidae sur le nombre des leucocytes

4.1.1. Variation du taux des globules blancs, des lymphocytes et des neutrophiles

Les résultats de la variation des taux des Globules blancs (GB), des lymphocytes et des neutrophiles sont représentés dans les **figures 33.34 et 35**. En effet, on observe une diminution des taux des GB chez les souris traitées par rapport aux témoins (témoins : $6,18 \pm 2,61 \cdot 10^3$ cellules/ μL , traitées : $4,9 \pm 0,5 \cdot 10^3$) ainsi que pour les neutrophiles (témoins : $2,85 \pm 1,18 \cdot 10^3$, traitées : $0,475 \pm 0,21 \cdot 10^3$ cellules/ μl).

D'autre part, une augmentation des taux des lymphocytes chez les souris traitées a été enregistrée (témoins : $3,2 \pm 1,41 \cdot 10^3$, traitées : $4,2 \pm 0,42 \cdot 10^3$).

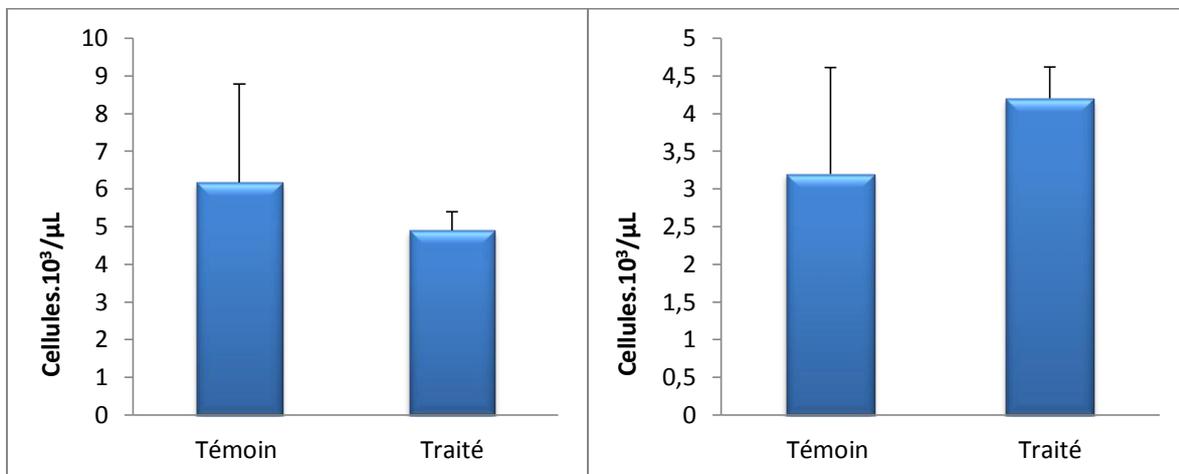


Figure. 33. Variation du taux des globules blancs.

Figure. 34. Variation du taux des lymphocytes.

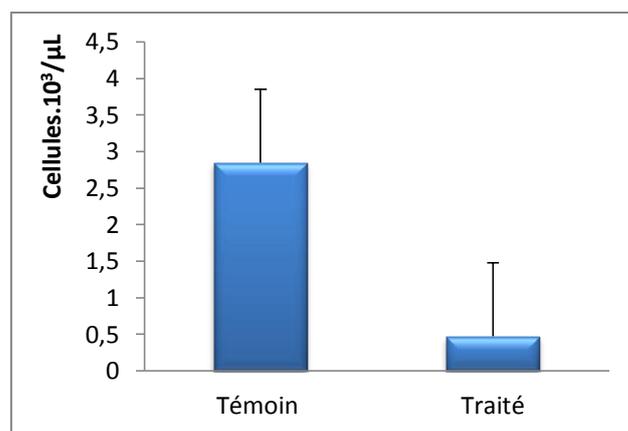


Figure. 35. Variation du taux des neutrophiles.

La diminution des GB peut être due à la diminution d'une sous population leucocytaire dite neutrophile, la diminution de ces dernières peut être expliquée par leur migration orientée ; à travers la paroi des vaisseaux en direction des foyers inflammatoires (**Vaubourdolle, 2007**).

D'autre part l'augmentation des lymphocytes peut être due à une réponse immunitaire vis-à-vis de l'allergène étudié, au cours de cette réponse une activation lymphocytaire est installée au niveau des organes lymphoïdes après le contact avec l'antigène. Cette activation est suivie par une prolifération et différenciation des lymphocytes en plusieurs sous populations plus précisément les Th1, qui sont impliquées dans les réactions inflammatoires à médiation cellulaire, cette immunité est caractérisée par l'activation des macrophages et la production des lymphocytes T cytotoxiques (**Ito et al., 1997**). De même, Les cellules Th2 sont impliqués dans l'induction de la réponse à anticorps de type IgE. La production d'IL-4 stimule les cellules B vers une production d'IgE (**Murray, 1998**), ce qu'est en accord avec nos résultats.

4.1.2. Variation du taux des monocytes, des éosinophiles et des basophiles

D'après les histogrammes illustrés dans les **figure 36 et 37**, on remarque une augmentation du nombre des monocytes chez les souris traitées par rapport aux témoins (témoins : $0,025 \pm 0,05 \cdot 10^3$, traitées : $0,15 \pm 0,06 \cdot 10^3$) et une diminution du taux des éosinophiles (témoins : $0,1 \pm 0 \cdot 10^3$, traitées : $0,075 \pm 0,05 \cdot 10^3$).

Pour les basophiles, les automates utilisés n'ont pas enregistré leurs valeurs.

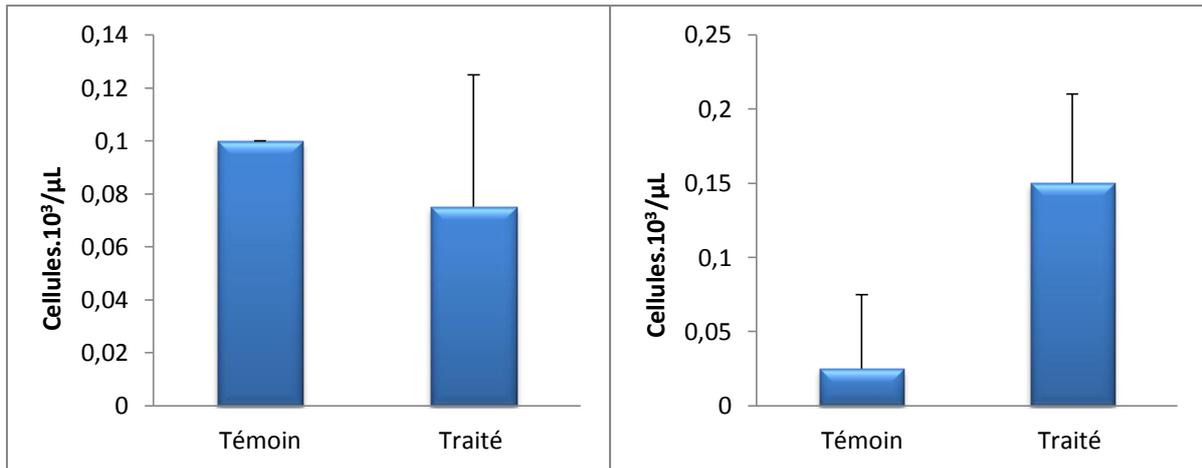


Figure. 36. Variation du taux des éosinophiles.

Figure. 37. Variation du taux des monocytes.

La sous population Th1 des lymphocytes agit comme activateur des monocytes circulant dans le sang et stimule leur transformation en macrophages frais dirigés ultérieurement vers les foyers inflammatoires (**Attakpa, 2010**), ce qui explique l'augmentation de leur nombre dans le sang.

Les macrophages peuvent phagocyter les particules antigéniques et les présenter à leurs surfaces (**Blackwelle et Else, 2001**).

Les éosinophiles sont des granulocytes intervenant dans l'HS de type I notamment dans le cas d'asthme et de la rhinite allergique. Leur diminution est expliquée par leur recrutement vers le site d'inflammation (**Raffi, 2007**).

4.1.3. Variation du taux des plaquettes

Les résultats présentés dans la **figure 38** illustrent une augmentation remarquable du taux des plaquettes chez les souris traitées par rapport aux témoins (témoins : $313,5 \pm 200,85 \cdot 10^3$, traitées : $912 \pm 66,62 \cdot 10^3$).

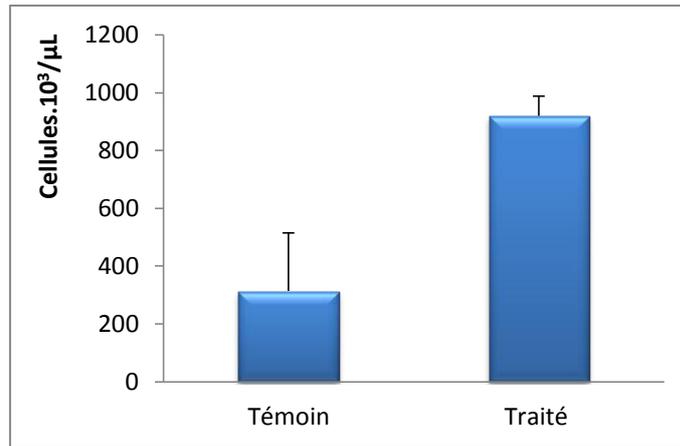


Figure. 38. Variation du taux des plaquettes.

L'augmentation du taux des plaquettes remarquée peut être expliquée par le fait que les plaquettes interviennent dans le processus inflammatoire allergique grâce à l'expression à leurs surfaces de récepteurs de haute affinité pour les IgE, FcεRI (Molina, 1995).

Yssel et ses collaborateurs (1998) ont montré que, la stimulation des plaquettes induit le relargage de la sérotonine et de RANTES ce qui permettra aux plaquettes de jouer un rôle dans le maintien de l'inflammation allergique.

4.2. Effet de l'extrait larvaire des Chironomidae sur le nombre des cellules des liquides nasaux et broncho-alvéolaires

4.2.1. Comptage cellulaire

Les résultats indiqués dans la **figure 39** montrent une augmentation importante du nombre des cellules des liquides nasaux des souris traitées par rapport aux témoins (témoins : $26,81 \pm 11,8 \cdot 10^9$, traitées : $60,68 \pm 18,26 \cdot 10^9$).

Les résultats mentionnés dans la **figure 40**, révèlent une forte augmentation du nombre des cellules des liquides broncho-alvéolaires des souris traitées en comparant avec les témoins (témoins : $24,5 \pm 6,62 \cdot 10^6$, traitées : $89,43 \pm 28,21 \cdot 10^6$).

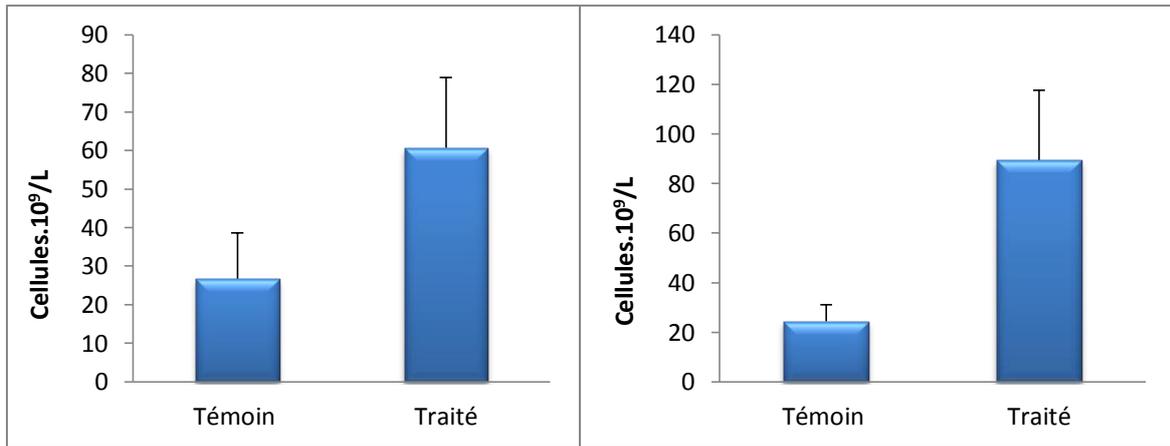


Figure. 39. Variation du nombre des cellules du liquide nasal

Figure. 40. Variation du nombre des cellules du liquide broncho-alvéolaire.

Les résultats s'accordent avec les travaux démontrant que dans les réactions allergiques notamment dans le cas des allergies respiratoires les granulocytes sont recrutés vers les sites inflammatoires (la muqueuse nasale, tractus respiratoire) et les monocytes recrutés sont en abondance dans les différents liquides nasaux et broncho-alvéolaires suite à leur recrutement (Molina, 1995).

4.2.2.Frottis

Les frottis réalisés et observés au microscope optique ($\times 400$), montrent une richesse et une augmentation du nombre des cellules des souris traitées par rapport aux témoins, plus précisément les polynucléaires (Figure 41 et 42).

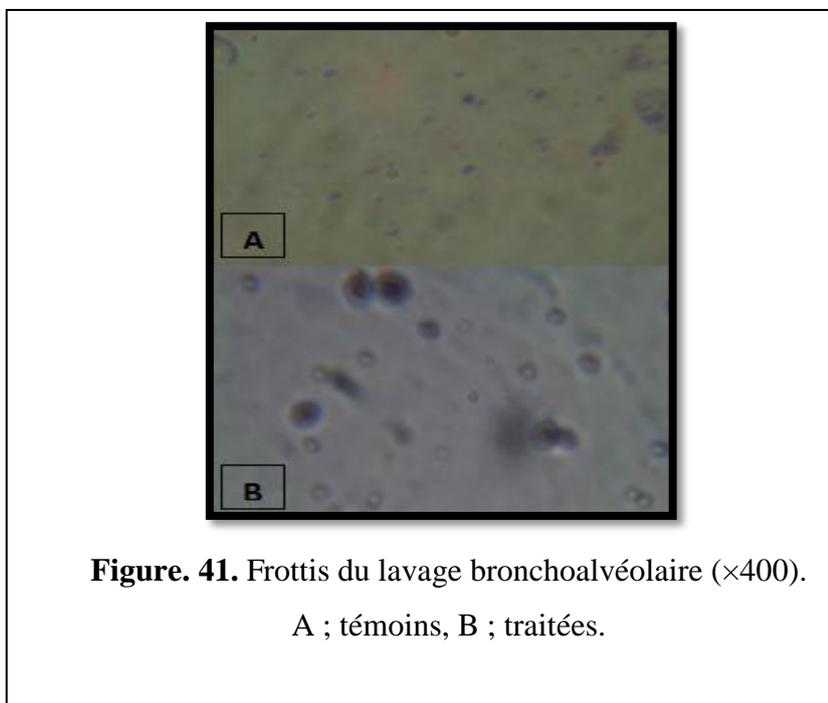


Figure. 41. Frottis du lavage bronchoalvéolaire ($\times 400$).

A ; témoins, B ; traitées.

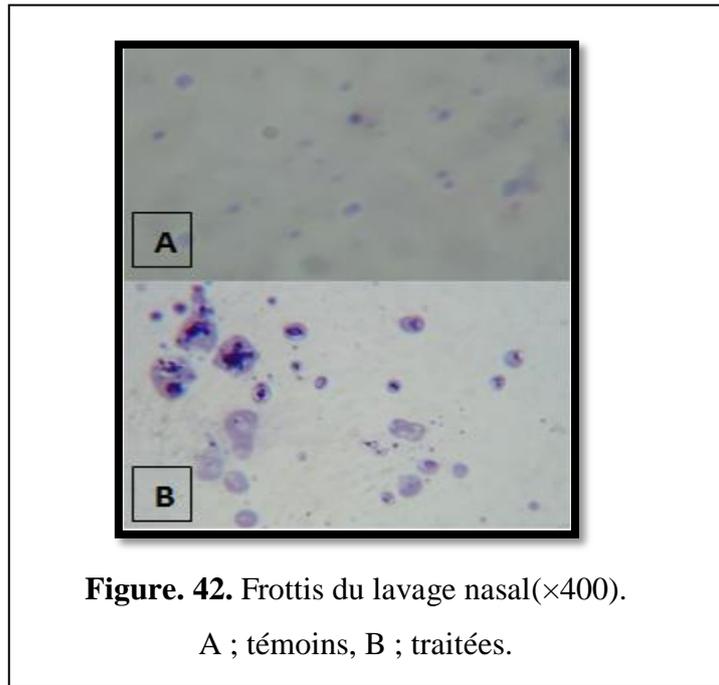


Figure. 42. Frottis du lavage nasal($\times 400$).
A ; témoins, B ; traitées.

4.3. Effet de l'extrait larvaire des Chironomidae sur le nombre de splénocytes

4.3.1. Comptage cellulaire

La **figure 43** montre une augmentation du nombre des splénocytes, il est de $(15,25 \pm 2.88 \cdot 10^9)$ chez les souris témoins, cependant, il est de $(28,31 \pm 8.09 \cdot 10^9)$ pour celles traitées.

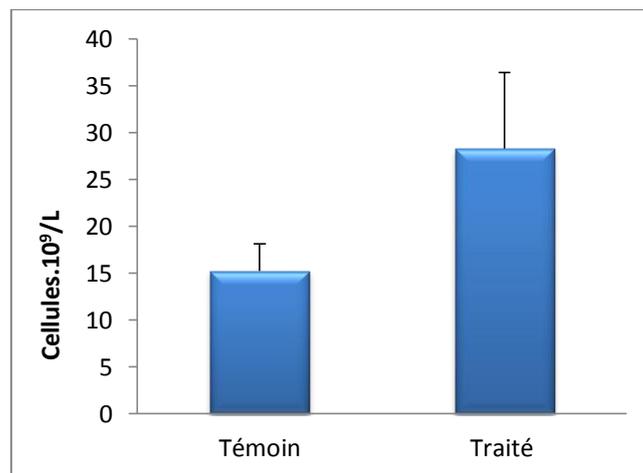


Figure. 43. Variation du nombre des splénocytes.

L'augmentation du nombre des splénocytes peut être causée par le fait que la rate est l'organe où les cellules spléniques (Lymphocytes B et T) sont stockées et entre en contact avec un Ag, ce qui provoque leurs activations et prolifération [14].

4.4. Effet de l'extrait larvaire des Chironomidae sur le poids des organes

Les résultats obtenus de la sensibilisation des souris par l'extrait larvaire sont représentés dans les **figures 44 et 45**, on constate une augmentation du poids des poumons chez les souris traitées par rapport aux témoins (témoins : $0,375 \pm 0,03$ g, traitées : $0,512 \pm 0,11$ g), ainsi qu'une augmentation du poids de la rate chez les souris traitées a été enregistrée (témoins : $0,095 \pm 0,03$ g, traitées : $0,145 \pm 0,06$ g).

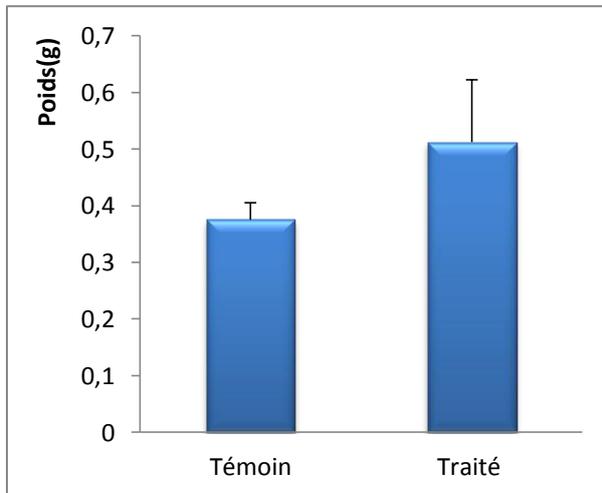


Figure. 44. Variation du poids des poumons.

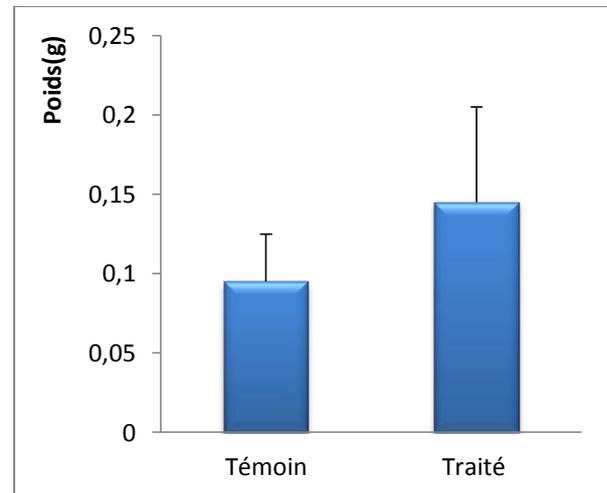


Figure. 45. Variation du poids de la rate.

La rate représente un organe lymphoïde secondaire où les lymphocytes B et T s'activent et se prolifèrent pour déclencher une réponse adaptative, et ces résultats sont confirmés par l'augmentation du nombre de splénocytes.

Concernant le poids des poumons leur augmentation est peut être due à un état d'inflammation des voies respiratoires, ce qui est traduit par l'augmentation du nombre des cellules issues des liquides de lavages broncho-alvéolaires.

Pour une confirmation on a adressé au laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Hôpital Ibn Zohr de Guelma, des pièces de poumons des souris fixées au formol pour une étude histologique.

4.5. Etude histologique

Pour plus une confirmation des résultats obtenus des souris traitées (la numération cellulaire des lavages broncho-alvéolaire, nasal et des splénocytes ainsi que l'état visualisé des poumons), des coupes histologiques de cet organe ont été réalisées et les résultats ont été démontrées dans **la figure 46**.

L'examen microscopique a montré chez les témoins, un poumon normal avec une simple congestion vasculaire, des alvéoles avec des cloisons inter-alvéolaires. La structure histologique semble normale. En effet, les cloisons ou parois alvéolaires sont formées par un ensemble de cellules dont des pneumocytes et des cellules endothéliales. (**Figure 46a**).

Pour les souris soumises à des instillations nasales avec l'extrait brut de Chironomidae, un infiltrat inflammatoire péri-bronchiolaire mononucléé a été bien remarqué avec présence de lymphocytes (**Figure 46b**). Le traitement a aussi entraîné une diminution du diamètre alvéolaire. Ceci pourrait être dû à un épaissement de la paroi alvéolaire par prolifération des fibres conjonctives.

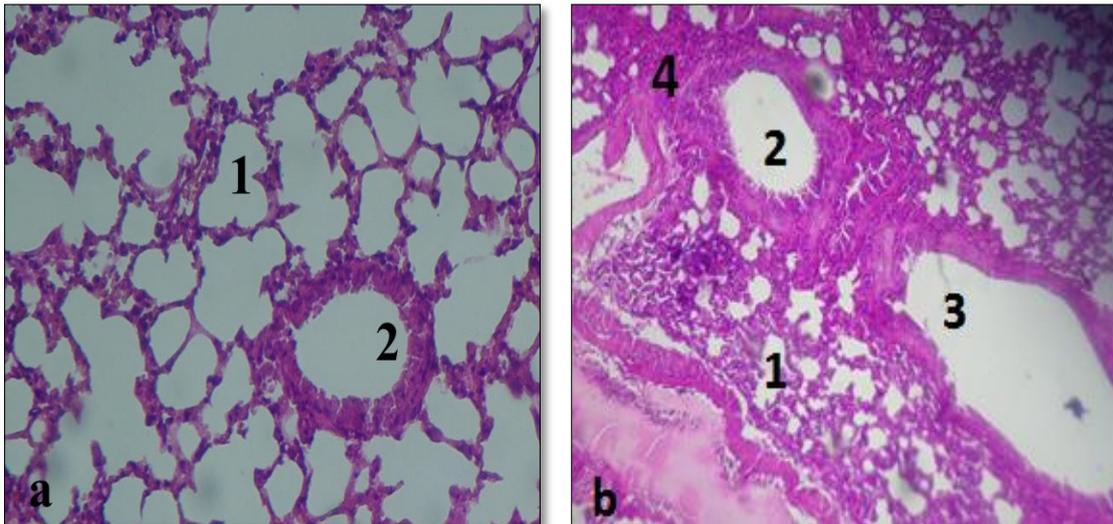


Figure46 :Coupe histologique des poumons des souris témoins et traitées (x100).

a) Poumon normal du témoin **b)** Poumon du traitée avec l'extrait brut de Chironomidae.

1-Alvéole, **2-** Bronchiole, **3-** Vaisseaux sanguin, **4-**Infiltrat cellulaire

Conclusion et perspectives

Dans notre travail, nous nous sommes intéressé d'étudier les effets allergiques de l'extrait larvaire de Chironomidae sur le système immunitaire.

Malgré qu'il existe plusieurs travaux internationaux sur les effets allergiques des Chironomidae, en Algérie aucune étude n'est aujourd'hui réalisée.

Pour la réalisation de ce travail, on a préparé l'extrait brut de ces larves afin de déterminer leur effet allergique in vivo, en utilisant des souris blanches femelles comme modèles animal.

Les résultats obtenus supposent que l'extrait brut induit une réaction inflammatoire localisée au niveau des voies respiratoires ce qui agit sur la formule leucocytaire et se traduit par une lymphocytose, hyperplaquettose et monocytose et d'une autre part, une leucopénie, neutropénie et une éosinopénie.

En ce qui concerne le nombre de cellules des liquides nasaux et broncho-alvéolaire, une augmentation significative a été enregistrée.

Une augmentation du poids des organes a été enregistrée, une augmentation du poids de la rate ainsi que une augmentation du poids des poumons due aux inflammations confirmée par une étude histologique montrant la présence des infiltrats inflammatoires chez les souris traitées.

En fin cette étude mérite d'être poursuivie et approfondie à nouveau champ de connaissance sur les effets allergiques de cette famille. Ils s'avèrent intéressant de :

- ✓ Faire une étude immunologique par les allergènes purifiés.
- ✓ Prolonger la période de sensibilisation afin de réaliser une exploration humorale.
- ✓ Utiliser des autres voies d'immunisation.
- ✓ Des études complémentaires s'appuyant sur des méthodes techniques différentes mériteraient d'être développées, afin d'améliorer peut-être la sensibilité et la spécificité des tests proposés, et pourquoi pas d'appliquer une étude sur les êtres humains.

Références

Aldunate M. T., Echechiia S., B. Gomez, B. E. Garcia, J. M. Olaguibel, A. Rodriguez, I. Moneoaoy A. et Tabar I., (1999).*Chironomids and other causes of fish food allergy.* *Alergol Inmunol Clin.*14(3): 140-145.

Ali, (1991). *Perspectives on management of pestiferous Chironomidae (Diptera), an emrging global problem.* *JAmeric. Mosq. Cont. Assoc.* 7 : 81-260.

Amzazi S., (2007). *Cours d'immunologie.* Université Mohammed V-Agdal. Rabat. Faculté des Sciences Filière SVI – Semestre 6.156 pages.

Armitage P., Cranston P.S.&Pinder L.C.V., (1995).*Chironomidae-biology and ecoloy of non-biting midges.* Chapman & Hall. London. 572 pages.

Association des Collèges des Enseignants d'Immunologie des Universités de Langue française, (2011). *Item 113 : Allergies et hypersensibilités de type I chez l'enfant et chez l'adulte : aspects épidémiologiques, diagnostiques et principe du traitement.* Université Médicale Virtuelle Francophone. 32 pages.

Attakpa E.S., (2010). *Role du Recepteur nucleaire d'Activation et de Prolifération des Peroxysomes (PPAR- α) dans la modulation de l'inflammation et l'activation des cellules T.* Thèse de Doctorat. Physiologie cellulaire et moléculaire. Université de Bourgogne (France) et d'Abomey-Calavi (Benine). 159 pages.

Bach J.F. et Lesavre Ph., (1986). *Immunologie.* Flammarion. France. 315 pages.

Baudry C. et Brezeltec H., (2006).*Microbiologie-immunologie : immunologie exercices d'application.* 2^{ème} édition. Wolters Kluwer .France. 129 pages.

Baur X., Dewair M., Haegele K., Prelicz H., Scholle A. &Tichy H., (1983).*Common antigenic determinants of haemoglobin as basis of immunological cross-reactivity between*

chironomid species (Diptera, Chironomidae): studies with human and animal sera. Clin Exp Immunol. 54: 599-607.

Blackwell N.M. & Else K.J., (2001). *B cells and antibodies are required for resistance to the Parasitic gastro intestinal nematode Trichuris muris.* Infect. Immun. 69(6) : 3860-3868.

Burmester G.R., Pezzutto A., Ulrichs T. et Alexandra A.,(2000). *Atlas de poche d'immunologie :Bases, analyses biologiques, pathologies.* Médecine-Sciences Flammarion. 293 pages.

Busse W.W. & Lemanske J., (2001). *Asthma.* N Engl J Med. 344(5): 62-350.

CabrerizoBallesteros S., de Barrio M., Baeza ML. & Rubio Sotes M., (2006). *Allergy to Chironomid larvae (red midge larvae) in non professional handlers of fish food.* J Investig Allergol Clin Immunol.16(1):63-68.

Chapel H., Haeney M., Misbah S. et Snowden N., (2004). *Immunologie clinique :de la théorie à la pratique,avec cas cliniques.* De Boeck. 4^{ème} édition. 358pages.

Cranston P.S., Gad El RabM.O.etKay A.B., (1981). *Chironomid midges as a cause of allergy in the Sudan.* Trans R Soc Trop Med Hyg.75(1):1-4.

Daun J.R., Shepherd D.M. & Randolph J.N., (1995). *Physical interactions and early signaling between Helper T lymphocytes and B lymphocytes.* Wileys-liss-Inc., New-York, Chichester, Toronto, Singapore. 1: 469-481.

David B., Guenounou M., Aubert D., Cornel E., Deviller P., HambergerC. et Lavand F., (1996). *Cahier de formation biologie médicale en immuno-allergie.* 55pages.

Demoly P., (2005). *Rhinite allergique et polypose naso-sinusienne.* John Libbey Euro text. Paris.159 pages.

Dutau G., (2006). *Allergologie.* 2^{ème} édition .Elsevier Masson. France. 267 pages.

Ducan D.D., Lawrence D.A., (1995). *T cells and cloned and transformed T-cell lines to assess in immune function.* Wileys-liss-Inc., New-York, Chichester, Toronto, Singapore.1.483-505.

Edahiro T., Ohta N., Matsuoka H., Ishii A., Tanizaki Y., Kitani H., Kunitomi T., Noono S. &Tachibana K., (1989). *Analysis of lymphocyte response to chironomid midge antigens in asthmatic and non-asthmatic individuals.* Jpn J Med SciBiol.42(3):101-10-101.

Entringer S., (2009). *Contribution de deux test immunopharmacologiques dans l'exploration d'allergies respiratoire professionnelles.* Thèse pour obtenir le diplôme d'état de docteur en médecine. Faculté de médecine de Creteil. Paris. 113 pages.

Erikson N.E., Peterson, I., Vedal, S., Hogstedt, B.,Belin, L. &Johannsen, S.G.O. (1985) *Allergy among farmers.* Abstract **137** of Annual Meeting of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Stockholm.**199pages.**

Erikson NE., Ryden B. & Johnson K., (1989). *Hypersensitivity to larvae of Chironomids (non-biting midges).*Allergy.44: 305-331.

Galli S.J., Tsai M. &Pilioponsky A.M., (2008). *The development of allergic inflammation.*Nature. 454:445-454.

Geneviève D., (2009). *Mécanismes et structures impliqués dans l'effet anti-inflammatoire et bronchorelaxant du 1,1-diméthylphényll-4pipérazinium.* Faculté de médecine. Université Laval.267 pages.

Gharnoug M. et Saadna B., (2012). *Contribution à l'étude des allergies aux pollens.* Mémoire de fin d'étude de master 2 Immunologie Approfondie. Faculté de Guelma.86 page.

Gérald A., (2011). *Profil des nourrissons atteints d'allergie aux protéines de lait de vache :Etude rétrospective cas.Témoins à l'hôpital Jean Verdier (Boudy.93).*Thèse pour obtenir le diplôme d'état de docteur en médecine.Université Denis Diderot Faculté de médecine. Paris VII.139 pages.

Hirabayashi K., Kubo K., Yamaguchi S., Fujimoto K., Murakami G. & Nasu Y., (1997). *Studies of bronchial asthma induced by Chironomid midges (Diptera) around a hypereutrophic lake in Japan.* Allergy.52(2):188-95.

Holgate S.T., (2008). *Pathogenesis of asthma.* Clinical and Experimental Allergy.38: 872-897.

Ito K., Suko M., Miyamoto T., Kobayashi S., Nakazawa T., Takahashi T., Nishikata H., Nemoto T. & Matsubara T., (1989). *Study on the clinical usefulness of RAST using insect and mite allergen discs.* [Japanese] Arerugi. 38(5):413-22.

Jeong K.Y., Yum H.Y., Lee I.Y., Ree H.I., C.S. Hong, Kim D. S.et T.S. Yong., (2004). *Molecular Cloning and Characterization of Tropomyosin, a Major Allergen of Chironomus kiiensis, a Dominant Species of Nonbiting Midges in Korea.* Clin Diagn Lab Immunol.11(2): 320-324.

Johansson S.G., Hourihane J.B., Bousquet J., Brujnzeel-Koomen C., Dreborg S.& Haahtela T., (2001). *EAACI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force, A revised nomenclature for allergy; An EAACI position statement for the EAACI nomenclature task force.* Allergy.56:813–24.

Kampen V., Liebers V., Czuppo A. et Baur X., (1994). *Chironomidae hemoglobin allergy in Japanese, Swedish, and German populations.* Allergy. 49(1): 9-12.

Kay A.B., Gad El Rab M.O., Stewart J. & Erwa H.H., (1978). *Widespread IgE-mediated hypersensitivity in Northern Sudan to the Chironomid Cladotanytarsus lewisi ('green nimitti').* Clin Exp Immunol.106-110.

Kawai K. et Muraguchi A., (1998). *Gene cloning of monomeric hemoglobin of wide distributed Chironomid Polypedilum nubifer.* Hydrobiologia. 386: 91-99.

Kino T., Chihara J., Fukuda K., Sasaki Y., Shogaki Y. & Oshima S., (1987). *Allergy to insects in Japan. High frequency of IgE antibody responses to insects (moths, butterfly, caddis*

fly and Chironomid) in patients with bronchial asthma and immunochemical quantitation of the insect-related airborne particles smaller than 10 µm in diameter. J Allergy Clin Immunol.79: 857-866.

Kim Y.J. et Park H.S., (1994). *Skin reactivity and specific IgE antibody to two non-biting midges in Korean respiratory allergy patients. J Korean Med Sci. 9: 21-28.*

Kohshima S., (1984). *A novel cold-tolerant insect found in a Himalayan glacier. Nature. 310: 27-225.*

Komase Y., Sakata M., Azuma T. & Nakagawa T., (1997). *IgE antibodies against midge and moth found in Japanese asthmatic subjects and comparison of allergenicity between these insects. Allergy.52:75-81.*

Li Y., Zhang L., Liu Y., Yang X. et Sun X. (2010). *Establishment of a mouse model of Humulus pollen allergen-induced allergic asthma. Journal of Xi'an Jiaotong University. 65: 562-565.*

Liebers V., Hoernstein M. & Baur X., (1993). *Humoral immune response to the insect allergen Chi t 1 in aquarists and fish-food factory workers. Allergy.48: 236-239.*

Liebers V., Raulf M. et Baur X., (1994). *Allergen-induced expression of cell surface markers on lymphocytes of Chi t I-sensitized patients. Allergy.49 :163 -169.*

Lydyard P., Whelan A. et Fanger M., (2002). *L'essentiel en immunologie. Berti. Paris. 384pages.*

Matsuoka H., Ishii A. et Noono S., (1988). *Detection of IgE antibodies to larvae and adults of chironomids by Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay. Allergy.43(6):9-425.*

Matsuoka H., Ishii A., Kimura J.Y. et Noono S., (1990). *Developmental change of chironomid allergen during metamorphosis. Allergy.45(2):115-20.*

Molina C., (1995). *L'allergie à l'aube du troisième millénaire. John. Libbey Eurotext. Paris. 103 pages.*

Mondoulet L., (2005). *Diversité de la réponse IgE dans l'allergie à l'arachide. Caractérisation des allergènes et devenir de leur potentiel allergénique lors des traitements thermiques et des processus digestifs.* Thèse pour obtenir le grade de docteur en Microbiologie et biocatalyse industrielles. INSA de Toulouse.249 pages.

Murray J.S., (1998). *How the MHC selects Th1/Th2 immunity.* Immunol Today 19 :157-163.

Parham P., (2003). *Le système immunitaire.* De Boeck. Paris.407 pages.

Raffi H., (2007). *Granulocytes éosinophile : Physiologie et implication dans les réactions inflammatoires. Etudes bibliographique.* Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. Université Paul-Sbatier de Toulouse. 269 pages.

Revillard J.P., (2001). *Immunologie.* 4^{ème} édition. De Boeck. Bruxelles. 600 pages.

Roitt I.M., Brostoff J. et Male D., (2002). *Immunologie.* 3^{ème} édition. De Boeck. Bruxelles.484 pages.

Romy F., Jerry R.M., Huong L.V., Prescott T.A., Raymond J.J., Daniel T. & Prosper N.B.,(2005). *Oral and Nasal Sensitization Promote Distinct Immune Responses and Lung Reactivity in a Mouse Model of Peanut Allergy.*American Journal of Pathology. 167(6): 1621-1630.

Sudre B., (2009). *Bioaérosols de l'environnement agricole et protection contre l'allergie.* Thèse de doctorat. Homme, environnement, santé. Besançon (France) : Université de Franche Comté. 308 pages.

Suzuki M., Itoh H., Sugiyama K., Takagi I., Nishimura J., Kato K. ,Mamiya S., Baba S., Ahya Y., Itoh H., Yokota A., Itoh M. &Ohta N., (1995).*Causative allergens of allergic rhinitis in Japan with special reference to silkworm moth allergen.*Allergy.50: 23-27.

Teranishi H., Kawai K., Murakami G., Miyao M.& Kasuya M., (1995). *Occupational allergy to adult chironomid midges among environmental researchers.* Int Arch Allergy Immunol.106: 271-277.

Thoms J.K., Richard A., Goldsby, Barbara A., (2007). *Immunologie*. 6^{ème} édition. New York. 684 pages.

Urbain B., Gustin P., Prouvost J.F., Ansay M., (1994). *Quantitative assessment of aerial ammonia toxicity to the nasal mucosa by use of the nasal lavage method in pigs.* Am J Vet Res. 55(9):40-1335.

Urbain B., Mast J., Goddeeris B., Ansay M. et Gustin P., (1997). *Influence d'une exposition aux poussières sur la composition cellulaire des liquides de lavage nasal et broncho-alvéolaire chez le porc.* 1. Journées Rech. Porcine en France. 29: 17-22.

Vaubourdolle M., (2007). *Biologie Hématologie*. 3^{ème} édition. Le Moniteur. 1123 pages.

Yong T.S., Lee J.S., Lee I.Y., Park S.J., Park G.M., Ree H.I., Park J.W., Hong C.S. & Park H.S., (1993). *Identification of Chironomus kiiensis allergens, a dominant species of non-biting midges in Korea.* The Korean Journal of Parasitology. 37(3): 171-179.

Yssel H., Abbal C., Pene J. et Bousquet J., (1998). *The role of IgE in asthma.* Clinical & Experimental Allergie. 28 S5: 104-109.

Zerguine K., (2010). *Contribution à l'étude des Chironomidae (Diptera : Insecta) des mares temporaires de la Numidie Orientale. Aspect de Biologie, Ecologie et systématique.* Thèse de Doctorat en Biologie animale et Environnement, Annaba. Université de Bedji Mokhtar d'Annaba. 289 pages.

Les sites web

[1] : Anonyme (2013). Physiologie de l'hypersensibilité de type I. Disponible sur :

http://www.memobio.fr/html/immu/im_al_ph.html.

(Consulter le 20/02/2013)

[2] : Medecine-Algerie (2011). Hypersensibilité de type IV (HS retardée-HS a médiation cellulaire. Disponible sur :

http://medecinealgerie.org/index.php?option=com_content&view=article&id=29:hypersensibilite-de-type-iv--hca-&catid=65:cours-dimmunologie--alger-&Itemid=74.

(Consulter le 27/02/2013)

[3] : Anonyme (2013). Les allergènes. Disponible

sur :<http://allergies.comprendrechoisir.com/comprendre/allergie-allergene>

(Consulter le 23/03/2013)

[4]: Vulgaris-medical (2013). Allergène. Disponible sur:

<http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie-medicale/allergene>.

(Consulter le 23/03/2013)

[5] : Jacques P. C., (2012). *Chironomus plumosus* : fiche de maintenance en aquarium. Disponible sur :

<http://www.aquaportail.com/fiche-invertebre-925-chironomus-plumosus.html>.

(Consulter le 07/01/2013)

[6]: Anonyme (2011). Blood worm. Disponible sur :

<http://www.phadia.com/fr/Allergenes/ImmunoCAP-Allergens/Insects/Allergens/Blood-worm/>

(Consulter le 15/04/2013)

[7]: Anonyme (2013). Chironomus Part 1 (Molecular Biology).Disponible sur:

<http://what-when-how.com/molecular-biology/chironomus-part-1-molecular-biology/>

(Consulter le 15/04/2013)

[8]: Liebers V., Van Kampen V., Isringhausen-Bley S. et Baur X., (1998) Structure and Epitopes of Chi t 1.01. Disponible sur:

<http://www.karger.com/Article/FullText/23908>.

(Consulter le 31/03/2013)

[9] : L'Association des Allergologues et Immunologues du Québec (2013). Rhino-conjonctivite. Disponible sur :

http://allerg.qc.ca/Information_allergique/2_1_rhinite.html.

(Consulter le 02/05/2013)

[10] : Anonyme (2010). Conjonctivite. Disponible sur :

<http://www.ameli-sante.fr/conjonctivite/definition-et-symptomes-conjonctivite.html?print=1>.

(Consulter le 02/05/2013)

[11] : Anonyme (2010). Souris *Mus musculus*. Disponible sur :

<http://l-odysee-des-rongeurs.over-blog.org/article-14508931.html>.

(Consulter le 16/05/2013)

[12]: Pfeiffer P., (2013). Rote Chironomidae larve. Disponible sur:

<http://peterpfeiffer.at/bildarchiv-item/rote-chironomidae-larve/>

(Consulter le 20/05/2013)

[13] : Anonyme (2012). Coloration au May-Grünwald-Giemsa (Pappenheim). Disponible sur:

<http://www.microscopies.com/DOSSIERS/PRATIQUES/TPM-2/MGG%20.htm>

(Consulter le 23/04/2013)

[14] : Simon M., (2009). Les cellules immunitaires et les organes lymphoïdes. Disponible sur :

<http://www.cours-pharmacie.com/immunologie/les-cellules-immunitaires-et-les-organes-lymphoïdes.html>

(Consulter le 22/05/2013)

Résumé

L'allergie est une réaction anormale inadaptée, exagérée et excessive du système immunitaire vis-à-vis une substance étrangère : « Allergène ».

Les Chironomidae ce sont des insectes caractérisés par des larves rouges pourvues d'hémoglobine, ce dernier est un pneumallergène causant des hypersensibilités de type I et IV.

Notre étude est basée sur les caractérisations immunologiques de l'extrait brut de ces larves.

Dans l'ensemble, cette expérimentation a permis de mettre en évidence le pouvoir inflammatoire de l'extrait brut des larves Chironomidiennes. En effet, cette étude mérite d'être poursuivie.

Mot clés : Allergie, Chironomidae, hypersensibilité, extrait brut, inflammatoire.

Abstract

The allergy is an inadequate exaggerated and excessive reaction of the immunity system to words to strange substance (allergen).

The Chironomids are insects marked by red larvae provided with hemoglobin it is an aeroallergen which cause hypersensitivity type I and IV.

Our study is based on immunological characterization of the crude extract of the larvae.

Overall, this experiment has highlighted the inflammatory ability of the crude extract of Chironomidien larvae. Indeed this study deserves to be continued.

Key words: Chironomids, hypersensitivity, crude extract, inflammatory.

ملخص

تعتبر الحساسية رد فعل غير طبيعي ومفرط للجهاز المناعي ضد جسم غريب "مولد الحساسية".

تتميز حشرة الكيرونوميد ببيرقة حمراء غنية بخضاب الدم هذا الاخير يعتبر مولد حساسية هوائي يسبب فرط حساسية من الدرجة الاولى.

تتركز دراستنا على الخصائص المناعية للمستخلص الخام لهذه البيرقة.

عموما هذه التجربة تسمح بإظهار قدرة هذا المستخلص في احداث الالتهاب; هذه الدراسة تستحق المواصلة.

الكلمات المفتاحية: حساسية ; كيرونوميد ; المستخلص الخام ; الالتهاب .

Solutions utilisées**Solution de PBS 10mM**

Na Cl	9 g
Na ₂ HPO ₄	1.09 g
Na H ₂ PO ₄	0.32 g
Eau distillée	1000 ml

Solution de lyse

NH ₄ Cl	0.83 g
Eau distillée	100 ml

H Cl 0.1 Normalité

H Cl	0.93 ml
Eau distillée	90.7 ml

Na OH 0.1 Normalité

Na OH	0.4 g
Eau distillé	100 ml

Bleu de trypan

Bleu de trypan	0.2 g
Eau distillé	100 ml

Giemsa dilué

Giemsa-R	84 ml
Eau tamponnée	516 ml

Tampon phosphaté Ph 7 (AV)

Phosphate monopotassique	1 g
Phosphate disodique	5 g
Eau distillée	5000 ml

Eau tamponnée

Tampon phosphaté	30 ml
Eau distillée	570 ml