

*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique*

**Université Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Biologie des populations et des organismes**



Mémoire

**De fin d'Etude présenté en vue de l'Obtention du Diplôme de Master en
Biologie**

Option : Entomologie Médicale

Thème

**Etude du pouvoir antimicrobien de la mouche
nécrophage : *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptère,
Calliphoridae)**

Soutenue le 22/09/2016

Présentée par :

M^{elle} **Mérabia Amal**

M^{me} **Merzougui Yasmine**

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme BOULKOUR S. MCB Univ.Blida1

Examinatrice : Mme SAIGHI H. MAA Univ.Blida1

Promotrice : Mme TAIL G. MCA Univ.Blida 1

Co-promotrice Mlle TALEB M. Doctorante Univ.Blida 1

2015-2016

Remercîments

On exprime toute notre gratitude à notre promotrice M^{me} **TAIL.G**, Maître de Conférences au Département de Biologie des Populations et des Organismes de la Faculté SNV de l'Université de Blida 1 et notre co-promotrice M^{lle} **TALEB.M**, Doctorante au Département de Biologie et Physiologie Cellulaire de la Faculté SNV, Université de Blida 1 pour leur effort fourni, les conseils prodigués, leurs patiences et leurs persévérances dans le suivi de ce projet, qui n'aurait pas vu le jour sans leurs encouragements, leurs patiences et leurs grandes confiances en nos capacités intellectuels.

On tient également à exprimer nos remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer notre travail: M^{me} **BOULKOUR S**, Maître de Conférences au Département de Biologie des Populations et des Organismes de la Faculté SNV de l'Université de Blida 1 et M^{me} **SAIGHI H.**, Maître assistante au Département de Biologie des Populations et des Organismes de la Faculté SNV de l'Université de Blida 1, d'avoir accepté d'examiner notre mémoire.

Nous tenons aussi à remercier **M.TEFAHI.D** Biologiste en 2^{eme} degré de laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida, tout particulièrement pour les conseils qu'il nous a procurés tout au long de notre stage. Ce mémoire nous a donné l'occasion de rencontrer et de travailler avec des personnes absolument épatantes. A toute personne qui a participé de près ou de loin pour l'accomplissement de ce modeste travail.

Yasmine & Amal

Dédicace

Je dédie ce mémoire à tout mes proches, particulièrement mes parents, qui m'ont soutenu tout au long de ma vie par leur amour, leur protection et conseil, ils m'ont permis de ne jamais faiblir ou de baisser les bras à aucun moment, afin de me permettre d'atteindre mes objectifs, en m'inculquant les vraies valeurs de la vie.

Mes sœurs adorées, qui sont, et ont toujours été à mon côté, ainsi qu'à mes frères, sans oublier leurs aides, je ne sais pas ce que je ferai. Qu'ils trouvent dans ce mémoire le témoignage de ma reconnaissance et de mon affection

À tous mes ami(e)s, tous ceux que j'aime, et tous ceux qui sont chers, à mon cœur.

Amal

Dédicace

Je dédie humblement ce manuscrit à :

Mes parents, qui par leurs amours, leurs courages, leurs bonne volonté, leurs conseils, leurs assistance et leurs passion pour les études, m'ont aidée et m'ont soutenue tant sur le plan moral que financier pour voir se réaliser un de leurs vœux les plus chers. Je vous remercie et je m'engage à demeurer attaché aux principes que vous n'avez jamais cessés à m'inculper de savoir : le sérieux, l'honnêteté et la volonté d'atteindre mes objectifs.

A mon cher mari, qui est, et a toujours été à mes coté et m'a épaulé autant qu'il a put.

A mes très chers frères, sœurs, cousins et cousines.

A tous les gents qui sont dans ma mémoire et qui n'ont pas été souscrit dans ce mémoire

Yasmine

Liste des abréviations

DASRI : Déchets D'activités De Soins Â Risques Infectieux.

E.coli : *Escherichia coli*.

EGF : Epidermal Growth Factor.

FGF : Fibroblast Growth Factors .

IGF : Insulin-like Growth Factor.

IL1 : Interleukine 1.

l'EGF : Epidermal Growth Factor.

PDGF : Platelet Derived Growth Factor.

PVA : poly acétate de vinyle.

SARM : *Staphylococcus aureus résistant à La méticilline*.

TGF beta : Transforming Growth Factor beta .

Liste des figures

- Figure 1 :** Des larves sur une plie après 5 jours (Magalon G et Vanwijck R ,2004).
- Figure 2 :** Biobag contenant des larves (Toussaint P, 2008).
- Figure 3 :** Emplacement de Pansement hydrocolloïde (LarvE® : Illustrated Application Guide, Zoobiotic©, 2006).
- Figure 4 :** Coulage de flacon de larves sur le filet stérile (LarvE® : Illustrated Application Guide, Zoobiotic©, 2006).
- Figure 5 :** Application de filet stérile sur la plaie (LarvE® : Illustrated Application Guide, Zoobiotic©, 2006).
- Figure 6 :** Fixation de filet stérile (LarvE® : Illustrated Application Guide, Zoobiotic©, 2006).
- Figure 7 :** Maintenir le tout à l'aide d'une bande rétention légère stérile (LarvE® : Illustrated Application Guide, Zoobiotic©, 2006).
- Figure 8 :** Bandage avec de pansement hydrocolloïde positionnées (LarvE® : Illustrated Application Guide, Zoobiotic©, 2006).
- Figure 9 :** Fixation de filet sur le pansement hydrocolloïde (LarvE® : Illustrated Application Guide, Zoobiotic©, 2006).
- Figure 10 :** Transfert des larves sur la plaie (LarvE® : Illustrated Application Guide, Zoobiotic©, 2006).
- Figure 11 :** Fixation de filet à l'extrémité inférieure (LarvE® : Illustrated Application Guide, Zoobiotic©, 2006).
- Figure 12 :** Application de pansement micro-perforé à adhésivité limitée (LarvE® : Illustrated Application Guide, Zoobiotic©, 2006).
- Figure 13 :** Préparation de "Biobag" (Magalon G et Vanwijck R ,2004).
- Figure 14 :** Etapes d'application d'un biobag lors d'un traitement moderne de larvothérapie (Anonyme, 2001).
- Figure 15 :** Fin de traitement (anonyme, 2001).
- Figure 16 :** Schéma de morphologie d'une mouche *caliphoridae* (Knut R, 1991).
- Figure 17 :** Des larves de *lucilia sericata* traitant une plaie (Téot L, 1996 ; Kennedy KL et al.; 1997).

Figure 18 : Des photos représentant les résultats donnés par les larves sur la plaie d un patient (Bonn D, 2000).

Figure 19 : Le Cycle biologique holometabole de *Lucilia sericat* (Auberton et al., 2012) .

Figure 20 : Vue dorsale d'un adulte de *Lucilia sericata* (Wim et al.,2011).

Figure 21 : Oviposition des femelles adultes de *Lucilia sericata* (Meigen) (Baldrige, 2006).

Figure 22 : Dernier stade larvaire (L3) de *Lucilia sericata* (Reames et al., 2000).

Figure 23 : Pupes de *Lucilia sericata* (Whitworth, 2006).

Figure 24 : Illustration du piège utilisé pour capturer les insectes nécrophages.

Figure 25 : Les différentes étapes suivies pour placer le piège.

Figure 26 : Transfert des insectes capturés dans des boites d'élevage.

Figure 27 : Transfert des larves dans des boites d'élevage.

Figure 28 : Amas d'œufs de *L. sericata* sur les abats de volailles.

Figure 29 : Tube stérile contient de l'eau physiologique.

Figure 30 : Les différentes étapes de séparation des œufs de *L.sericata*.

Figure 31 : Différentes étapes de stérilisation des œufs de *L. sericata*.

Figure 32 : Stérilisation des larves.

Figure 33 : Les larves stérilisées dans La gélose au sang avec la Polyvidone iodée (Bétadine) ®.

Figure 34 : Les étapes du test anti microbien contre *L.sericata*.

Figure 35 : Les différentes étapes de dissection de la larve.

Figure 36 : Ensemencement de la suspension intestinale sur la gélose nutritive.

Figure 37 : Le contact des larves avec le champignon et la suspension intestinale de *Condida albicans*.

Figure 38 : Vue dorsale de *Lucilia sericata* (meigen, 1826) (Diptera : calliphoridae).

Figure 39 : Cuilleron thoracique de *Lucilia sericata* nu.

Figure 40 : Thorax de *Lucilia sericata* vert métallique, basicosta jaune pâle et tronc radial nu.

Figure 41 : Dimorphisme sexuel retrouvé chez la mouche adulte *Lucilia sericata*. **(A)** Absence de l'espace entre les yeux composés d'un male de *Lucilia sericata*. **(B)** Présence de l'espace entre les yeux composés d'une femelle de *Lucilia sericata*.

Figure 42 : Nombre des œufs éclos après stérilisation avec l'Hypochlorite de sodium(Dakin)[®] et l'Hexamidine transcutanée (Isoméline)[®].

Figure 43 : Le nombre des œufs morts après stérilisation avec l'Hypochlorite de sodium (Dakin) et l'Hexamidine transcutanée (Isoméline) [®].

Figure 44 : Nombre de larves L1 stérilisées vivantes et mortes.

Figure 45 : Nombre de larves L1 vivantes et mortes après stérilisation.

Figure 46 : Larves de *L.sericata* traitées avec la polyvidone iodée (Bétadine) dans la gélose au sang après 72h d'incubation.

Figure 47 : Mise en place des asticots sur les souches bactériennes.

Figure 48 : Effet antibactérien des asticots de *L. sericata* sur *Pseudomonas aeruginosa* après 24h.

Figure 49 : Effet antimicrobien des asticots de *L.sericata* sur *Escherichia coli* après 24h.

Figure 50 : Effet des asticots de *L.sericata* sur *Staphylococcus aureus* après 24h.

Figure 51 : Effet des asticots de *L.sericata* sur *Bacillus subtilis* après 24h.

Figure 52 : Effet des asticots de *L.sericata* sur *Klebseilla pneumoneae* après 24h.

Figure 53 : Effet des asticots de *L.sericata* sur *Citrobacter freundii* après 24h.

Figure 54 : Témoin négatif utilisé pour vérifier la présence des contaminations.

Figure 55 : Résultats de l'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *klebseilla pneumoneae*.

Figure 56 : Résultats de l'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *Bacillus subtilis*.

Figure 57 : Résultats de l'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *Staphylococcus aureus*.

Figure 58 : Résultats de l'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

Figure 59 : Résultats de l'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *Citrobacter freundii*.

Figure 60 : Résultats de l'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *Escherichia coli*.

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nombre des œufs éclos après désinfection avec l'La solution de dakin(Dakin) ® et l'Hexamidine transcutanée (Isoméline) ®.

Tableau 2 : Nombre des œufs non éclos après désinfection avec la solution de dakin (Dakin) et l'Hexamidine transcutanée (Isoméline) ®.

Tableau 3 : Taux de mortalité des œufs de *L.sericata* traités par la solution de dakin (Dakin) et l'Hexamidine transcutanée(Isoméline).

Tableau 4 : Représentant le nombre de larve L1 vivant dans chaque boîte après 48h.

Tableau 5 : Nombre de larves L1 mortes dans chaque boîte après 48h.

Tableau 6 : Taux de mortalités des larves L1 de *L.sericata* après 48h d'incubation.

Tableau 7 : Présentant le nombre de larves survivant après 72h.

Tableau 8 : Résumant le nombre des œufs éclos après

Tableau 9 : Nombre des œufs non éclos après 24h.

Tableau 10 : Taux de mortalité des œufs de *L.sericata* stérilisées par les 3 produits après 24h d'incubation.

Tableau 11: Nombre de larves L1 stérilisées vivantes et mortes après 48h d'incubation.

Tableau 12 : Taux de mortalité des larves désinfectées par les 3 produits après 48h.

Tableau 13 : Nombre de larves vivantes et mortes après désinfection.

Tableau 14 : Taux de mortalité des larves traitées par les trois antiseptiques après 72h d'incubation.

Tableau 15 : Présence de contamination et le nombre de larves survies.

Tableau 16 : Etat de larves après 48h d'incubation.

Tableau 17 :Résultats du test antimicrobien sur des souches bactériennes.

Tableau 18 : Etat des larves déposées sur gélose au sang après 24h de digestion des bactéries.

Tableau 19 : Récapitulatif des résultats de l'ensemencement du tube digestif sur gélose nutritive après 24h d'incubation.

Tableau 20 : Récapitulatif des résultats de l'ensemencement du tube digestif sur gélose nutritive après 24h d'incubation (suite).

Tableau 21: Résultats obtenus après 60 min d'incubation des larves de *L.sericata* dans des boîtes de souches fongiques.

Tableau 22 : Résultats obtenus de l'ensemencement du tube digestif sur milieu sabouraud après une semaine d'incubation.

Tableau 23: Fiche de prélèvement, d'observation et d'identification des espèces collectées (1).

Tableau 24 : Fiche de prélèvement des espèces nécrophages collectées au laboratoire d'hygiène publique de la wilaya de Blida (2).

Tableau 25 : Composition de gélose nutritive (1).

Tableau 25 : Composition de gélose au sang (2).

Tableau 27 : fiche de références des souches utilisées en test antibactérien.

GLOSSAIRE

Acéphalique : l'absence de la tête.

Acide phénylacétique : Acide $C_6H_5-CH_2-CO_2H$, dont les esters sont employés en parfumerie.

Antiseptique : Un antiseptique est un produit qui permet de supprimer ou d'empêcher le développement des bactéries ou des virus. Il est utilisé sur la surface du corps (on parle en effet de désinfectant pour un usage sur des matériels médicaux ou autres).

Les antiseptiques peuvent être fongicides (contre les champignons), bactéricides (contre les bactéries), virucides (contre les virus) ou sporicides (contre les spores), mais en général ils cumulent l'ensemble de ses fonctions. Ils sont appliqués localement sur la zone à traiter.

Asticot : C'est la larve des mouches.

Bactéricides : Qui tue les bactéries et les détruit.

Bactériostatique : Se dit de tout phénomène ou de toute substance capable d'inhiber la multiplication des bactéries sans les tuer.

Biobag : C'est un pansement qui désigne ce qu'on pose sur la peau et qui recouvre une plaie.

Brachycère : Brachycera, est un sous-ordre d'insectes Diptère qui comprend les mouches muscoïdes aux antennes courtes (du grec brachy signifiant "court" et ceros "corne"). Les antennes sont formées de 3 articles ; le dernier article porte une longue soie, nommée arista, ou bien un stylet plurisegmenté.

carboxypeptidases A et B : Sont des enzymes d'origine pancréatique et intestinale présentes dans le duodénum ; elles hydrolysent les polypeptides en enlevant un acide aminé à la fois.

Des hydrocolloïdes adhésifs : Produits composés de carboxy-méthylcellulose sodique (CMC) inséré dans un réseau d'élastomère, cette CMC est un composé hydrophile qui forme un gel au contact des exsudats. Ce gel va permettre d'assurer un milieu chaud, humide et de PH favorable à la cicatrisation, respectant l'écosystème bactérien. Le pansement permet ou non un échange gazeux et protège des contaminants extérieurs. L'adhésivité se retrouve sur la peau saine. Les plaques sont adhésives et recouvertes d'un film de polyuréthane ou de non tissé. Ils se présentent en plaque, en pâte ou en poudre.

Effet protéolytique : Qui produit la protéolyse (dégradation des protéines sous l'effet d'enzymes au cours du métabolisme).

Femelle anautogène : c'est-à-dire qu'elles ont besoin d'un repas sanguin pour la maturation de leurs œufs. Elles ont besoin d'un apport de protéines qu'elles trouvent dans la consommation de cadavres.

Hexamidine transcutanée (Isoméline) : Traitement d'appoint des affections de la peau primitivement bactériennes ou susceptibles de se surinfecter.

Hypochlorite de sodium (Dakin) : C'est un liquide antiseptique utilisé pour le lavage des plaies et des muqueuses, de couleur rose et à l'odeur d'eau de Javel.

In vitro : Se dit des réactions chimiques, physiques, immunologiques ou de toutes les expériences et recherches pratiquées au laboratoire, en dehors d'un organisme vivant. (On réalise in vitro des cultures de tissus, la synthèse d'hormones, etc.).

In vivo : Se dit des réactions chimiques, physiques ou des interventions pratiquées sur l'être vivant, soit à titre d'expérimentation ou de recherche, soit dans un dessein diagnostique ou thérapeutique. (Une intradermoréaction à la tuberculine est un test réalisé in vivo).

insectes holométaboles : Ont un cycle de vie complexe, ils passent de l'état de larve à celui de nymphe, puis d'adulte. La morphologie, la physiologie et le mode de vie des larves diffèrent fortement de ceux des adultes.

l'allantoïne : C'est un composé chimique azoté, de formule $C_4H_6N_4O_3$, d'origine organique ou végétale.

La fibrine : C'est une protéine filamenteuse qui dérive du fibrinogène (protéine qui intervient, entre autres, dans le mécanisme de la coagulation). Fibrine et fibrinogène sont fabriqués par le foie. Lorsque le fibrinogène est activé par la thrombine (une protéine qui fait également partie des facteurs de la coagulation), il se transforme en fibrine. En devenant insoluble et en se stabilisant (grâce au facteur XIII de la coagulation), la fibrine va s'agglomérer et participer à l'obturation de la plaie par un caillot, de façon à empêcher le sang de s'écouler.

La fibronectine : C'est une glycoprotéine présente dans la matrice extracellulaire, et qui joue un rôle clé dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire.

la leucine aminopeptidase : est une enzyme appartenant au groupe des hydrolases (enzymes catalysant l'hydrolyse de produits métaboliques).

La polyvidone iodé (Bétadine) : Traitement local d'appoint des infections de la cavité buccale et soins postopératoires en stomatologie.

Le collagène : C'est une protéine très importante des tissus de soutien de l'organisme. C'est une longue protéine faite de 3 chaînes spiralées entre elles, et qui s'organise en fibres. Elle est fabriquée par des cellules de la zone profonde de la peau appelées fibroblastes.

le Fibroblaste : Désigne un type de cellule. Elle est souvent surnommée « cellule de soutien ». Les fibroblastes sont présents dans les nombreux tissus conjonctifs de l'organisme. On trouve ainsi des fibroblastes dans la peau, les tendons, le cartilage, etc. Les fibroblastes jouent des rôles importants dans l'organisme. Elles sont en particulier chargées de synthétiser les autres cellules formant les tissus conjonctifs. Elles sécrètent aussi des substances luttant contre certains virus et bactéries.

le phénylacétaldehyde : Aldéhyde $C_6H_5CH_2CH=O$, doué d'une odeur de jacinthe et employé en parfumerie.

Les collagénases : Ce sont des enzymes capables de rompre les liaisons peptidiques du collagène. Elles facilitent la destruction des structures extracellulaires lors de la pathogenèse bactérienne.

Les sérines protéase : Ce sont des protéines de la coagulation, des protéines digestives (trypsine, chymotrypsine, élastase), et du complément, Leur site actif contient une sérine.

Nécrophage : Est le fait de manger des cadavres (en grec, *nékros* : mort, *phagein* : manger).

Nématocère : Nematocera, est un sous-ordre d'insectes Diptère, dont les antennes sont généralement en forme de fil.

Ovipare : C'est-à-dire que la femelle pond des œufs dans lesquels se trouve l'embryon qui finit de se développer hors du corps de la mère.

Pupaison : phase intermédiaire entre le dernier stade larvaire et l'imago (adulte). Elle se compose d'une enveloppe rigide, le puparium, à l'intérieur duquel la larve va se métamorphoser. Le puparium se forme à partir de la dernière mue larvaire qui ne sera pas expulsée, mais qui va se rigidifier et ainsi créer une structure protectrice pour l'insecte. Le stade pupa est une phase longue et immobile où l'insecte est vulnérable. On retrouve donc le plus souvent les pupes à distance du cadavre (0-5 mètres), dans le sol ou au niveau d'obstacles (souches, roches, etc.).

Staphylocoque Doré : Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) est la souche de staphylocoque la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire. Elle partage avec la bactérie *Escherichia coli* le triste privilège d'être au premier rang des germes responsables d'infections nosocomiales (infections contractées à l'hôpital).

Stérilisation : C'est une technique destinée à détruire tout germe microbien par exemple d'une préparation (souvent alimentaire). L'objectif de la stérilisation est double : contrôler les micro-organismes et prévenir une éventuelle contamination.

Streptocoque A : Le streptocoque du groupe A (SGA), *Streptococcus pyogenes*, se transmet exclusivement d'homme à homme. Il est responsable d'infections fréquentes bénignes et non invasives, telles que l'angine et l'impétigo, et également d'infections invasives graves :

bactériémies, infections cutanées nécrosantes, infections puerpérales, pleuropneumopathies, méningites, qui peuvent être associées à un syndrome de choc toxique streptococcique.

Streptocoque B : Le streptocoque du groupe B (SGB), *Streptococcus agalactiae*, a pour réservoir essentiel le tube digestif à partir duquel se fait la colonisation des voies génitales, souvent intermittente.

Vivipares : Se dit des animaux dont les petits naissent sans enveloppe ni coquille, en général à un état déjà assez développé. (Chez les insectes, on distingue les *larvipares*, qui engendrent des larves, et les *pupipares*, qui engendrent des nymphes.)

Résumé

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Parasitologie (station expérimentale SNV), département de Biologie des populations et des organismes, Faculté S.N.V, université de Blida 1 et le laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida durant la période allant du mois de février au mois de Juin 2016.

Des espèces adultes ont été collectées et identifiées, on distingue : *Lucilia sericata* et *caliphora vicina*. Durant cette étude l'espèce *Lucilia sericata* était sélectionnée et élevée au laboratoire. Des produits de désinfection des œufs et des larves ont été testés. Des souches microbiennes de références ont été utilisées.

Le taux de mortalité était de 33,33% lors de la désinfection des larves par la solution de dakin (Dakin) après 48h d'incubation et 44,44% après 72h. L'Hexamidine transcutanée (Isoméidine) a donné un taux de mortalité de 57,14% après 48h d'incubation et 71,42% après 72h. En revanche, un taux de mortalité de 6,66% a été marqué lors de la désinfection par La polyvidone iodée (Bétadine) après 48 et 72h d'incubation. Les larves ont été capables de tuer *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii* et *Klebsiella pneumoniae*. Concernant les champignons, les trois souches *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* et *Aspergillus niger* ont été tuées par les larves de *L.sericata*.

Il est espéré que ces résultats constituent des informations de bases pour d'autres études in vivo ou in vitro pour l'application de cette biothérapie en Algérie.

Mots-clés : larvothérapie, *Lucilia sericata*, désinfection, bactéries, champignons, pouvoir antimicrobien.

Abstract

Our study was conducted in the laboratory of Parasitology (experimental station SNV), Department of Organismal and Population Biology, Faculty SNV, University of Blida 1 and Hygiene Laboratory of Blida from February to June, 2016.

Adult species were collected and identified, we distinguish *Lucilia sericata* et *Caliphora vicina*. During this study the common green bottle fly species was selected and raised in the laboratory. Disinfection products of eggs and larvae were tested. Microbial strains of references have been used.

The mortality rate was 33.33% during larvae disinfection with dakin solution (Dakin) after 48 h of incubation and 44.44% after 72h. The transcutaneous Hexamidine (Isoméidine) gave a mortality rate of 57.14% after 48 h of incubation and 71.42% after 72h. Whereas a mortality rate of 6.66% was recorded in the disinfection with povidone iodine (Betadine) after 48 and 72 h of incubation. Larvae were able to kill *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Citrobacter freundii*. Regarding fungi, three strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* and *Aspergillus Niger* were killed by larvae *L.sericata*.

It is hoped that these results provide basic information for other in vivo or in vitro studies for the application of this biotherapy in Algeria.

Keywords: maggot, *Lucilia sericata*, disinfection, bacteria, fungi, antimicrobial effect.

الملخص

دراستنا أجريت في مختبر علم الطفيليات (المحطة التجريبية) ، قسم الأحياء السكانية كلية ع.ح.ف ، جامعة البليدة ومختبر النظافة لولاية البليدة. خلال شهر فبراير الى يونيو 2016 . خلال هذه الدراسة، الفصيلة لوسيليا سيريكاتا تم اختيارها بكثافة في المختبر. تم اختبار مواد تعقيم البيض واليرقات اضافة الى استعمال سلالات جرثومية ذات مراجع من أجل تقدير المنتج الأكثر تأثيرا كان معدل وفيات اليرقات خلال التعقيم مع محلول الديكين (ديكين) 33.33 % بعد 48 ساعة من الحضانة و 44.44 % بعد 72 ساعة من الحضانة و هيكساميد عبر الجلد (هيزوميدين) قدر معدل الوفيات بـ 57.14 % بعد 48 ساعة من الحضانة و 71.42 % بعد 72 ساعة . أما معدل وفيات اليرقات المعالجة باليود البوفيدون (البيتادين) بعد 48 و 72 ساعة من الحضانة. معدل الوفيات قدر بـ 33.33% عند تعقيم اليرقات بـ ابوكلوريت الصوديوم (الداكان) بعد 24 سا من الحضانة و 44.44% بعد 72 سا. هيكساميد عبر الجلد (ايزوميدين) أعطى معدل وفيات قدر بـ 57.14% بعد 24 سا من الحضانة و 71.42% بعد 72 سا. في حين أن بوليفيدون اليودي (بيتادين) أعطى 6.66% بعد 48 و 72 سا من الحضانة. اليرقات كانت قادرة على قتل كلا من بسودومونا ابروجينوزا، ايشيريشيا كولي، ستافيلوكوكوس اوروس، سيتروباكتر فروندي وكلاسيبيلا بنوموني. الفصائل الفطرية الثلاث ساكروميسس سارفيسي، كونديدا أليكانوس و أسبرجيلوس نيجر تم قتلها من طرف يرقات ل. سيريكاتا. ومن المؤمل أن هذه النتائج تقدم معلومات أساسية عن دراسات أخرى حية ومخبرية لتطبيق العلاج البيولوجي في الجزائر.

كلمات المفتاح : العلاج باليرقات، لوسيليا سيريكاتا، تطهير، بكتيريا، فطريات، الطاقة المضادة للميكروبات .

Liste des matières

Introduction

Remerciements

Dédicace

Dédicace

Introduction général

CHAPITE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE..... 1

I. GENERALITE 1

I.1.définition de la larvothérapie 1

I.2Rôle des mouches nécrophages 1

I.3But de la larvothérapie 1

I.4Mécanismes d'action de la larvothérapie..... 2

 a\la détersion 2

 b\désinfection 2

 c\stimulation du tissu de granulation 3

I.5Historique 4

II. TECHNIQUESD'APPLICATION DE LA LARVOTHERAPIE EN CLINIQUE 6

 I.1. Présentation des larves 6

 I.2. Application du traitement 7

 I.2.1. Protocole d'application pour les plaies de tailles limitées 7

 a\Préparation de la zone à
 traiter.....
 7

 b\Préparation des larves avant application 7

 c\Application des larves sur la plaie 8

 d\Protocole d'application pour les plaies étendues des jambes et bras 10

 a\Préparation de la zone a traité 10

 b\Application des larves sur la plaie 11

b1. Transfert délicat des larves sur la plaie	11
b2. Par une application en Biobag	12
I.3. Exemple d'application de l'asticothérapie dans un cas clinique	13
I.4. Généralités sur les <i>Calliphoridae</i>	15
I.4.1. Morphologie et Biologie des <i>Calliphoridae</i>	15
I.4.1.1. la tête	15
I.4.1.2. le thorax	16
I.4.1.3. l'abdomen	16
I.4.2. L'intérêt de l'utilisation des larves de <i>luciliasericata</i> en asticothérapie	18
I.4.3. <i>Lucilia séricata</i>	19
I.4.3.1 Taxonomie.....	19
I.4.3.2 Biologie et cycle de développement	19
I.4.3.3 Morphologie de <i>Lucilia sericata</i>	20
a\Les Adultes.....	20
b\Les Œufs.....	21
c\Les Larves	21
d\Les pupes	22
CHAPITRE II : Matériels et méthodes	
I. Présentation du lieu de stage	24
II. Matériel et méthodes.....	24
II.1. matériel	24
II.1.1 Matériel non biologique	24
II.1.2 Matériel biologique	24
II.1.2.1 Espèce de mouche utilisée	24
II.1.2.2 Souches microbiennes	24
a. Souches bactériennes.....	24
b. Souches fongiques.....	24
II.2. Méthodes	25
II.2.1 Capture et élevage de <i>lucilia sericata</i>	25
II.2.1.1 Prélèvement	26

II.2.1.2	Trie et identification des mouches	26
II.2.1.3	Stimulation des mouches adultes.....	26
II.2.1.4	Elevage des stades immatures	27
II.2.2	Tests antimicrobiens	27
II.2.2.1	Séparation des œufs	28
II.2.2.2	Stérilisations des œufs	29
II.2.2.3	Stérilisation des larves	30
II.3.	Application directe des larves vivantes	30
II.3.1	Stérilisation des larves	31
II.3.2	Test antimicrobien	31
	• Viabilité des bactéries ingérées par les asticots.....	32
II.3.3	Tests antifongiques	32
	• Viabilité du champignon ingéré	32

CHAPITRE III : Résultats

I.	Identification des adultes de <i>Lucilia sericata</i>	35
II.	Stérilisation des œufs	37
III.	Stérilisation des larves.....	46
IV.	Test anti bactérien	48
V.	Dissection des larves.....	51
VI.	Test antifongique	55
VII.	Dissection des larves déposées en contact avec les souches fongiques testées	56

CHAPITRE IV : Discussion	56
---------------------------------------	----

Conclusion

Glossaire

Liste-des-abréviations

Liste-des-figures

Références bibliographiques

Annexes

L'asticothérapie est l'utilisation des asticots vivants de la mouche verte nécrophage *Lucilia sericata* sur une plaie afin de diminuer la charge bactérienne par enlèvement de tissus morts et de stimuler la production des facteurs de croissance nécessaires à la favorisation de la guérison (la cicatrisation) (Anonyme, 2009). c'est pour cela que ces asticots sont suggérés d'avoir un potentiel dans le débridement des plaies, car ils se nourrissent des tissus mort, des exsudats et des débris cellulaires dans la plaie (Parnes et Legan, 2007).

Elle est également connue en tant que larvothérapie, Maggot thérapie, biochirurgie, myiase thérapeutique, maggot débridement therapy (MDT), biodebridement (Snyder, 2009).

Plusieurs études des ulcères de jambes, des escarres et des plaies de pieds diabétiques montrant que cette thérapie est conféré par les trois modes d'actions des larves de cette espèce qui sont : la détersion, la désinfection et la promotion du tissu de granulation (Van der plas et al., 2008).

Lerch *et al.*, (2003) ,rapportent que lors de l'alimentation des larves de *Lucilia sericata*, les bactéries des tissus nécrotiques contenant dans la plaie sont ingérée ce qui exprime la détersion, ainsi qu'une désinfection de la plaie est marquée. En outre, ces asticots sécrètent des enzymes protéolytiques et alcalino-terreux tels que le calcium, l'urée et le bicarbonate d'ammonium, qui inhibent la croissance bactérienne (Chan *et al.*, 2007). Spilsbury *et al.*, (2008), ajoutent que ces sécrétions améliorent en même temps la prolifération de néo tissu par une diminution d'adhésion des fibroblastes au collagène et à la fibronectine ce qui donne un effet remodelant de la matrice extracellulaire et donc une amélioration de la surface des plaies traitées et une cicatrisation plus rapide .

D'une façon plus précise, les larves des insectes nécrophages sur les quelles repose la larvothérapie ne sont pas uniquement impliquées dans le traitement des plaies mais peuvent aussi être utiles à la datation du décès et donc dans l'entomologie médico-légale. En outre certaines espèces présentent également des risques sanitaires (myiases, vecteurs de maladies, espèces invasives, etc.) (Green, 2004 ; Kitching, 2004).

Malgré que, l'asticothérapie est suggérée de promouvoir la cicatrisation des plaies dans certaines études actuelles, mais son efficacité par rapport à un traitement standard est encore en argument. Cet avis donc explore en détail l'efficacité de la larvothérapie dans le traitement des plaies et les expériences des patients par l'examen et l'analyse des études en cours systématique (Hall, 2010).

Afin de confirmer ou s'affirmer l'efficacité de la larvothérapie dans les traitements des plaies, nous avons évalué le pouvoir antimicrobien des larves de la mouche nécrophage *Lucilia sericata*.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons effectué un travail constitué de deux parties :

Partie terrain, qui consiste à :

- Examiner le piège contenant l'appât de volaille quotidiennement pendant toute la durée expérimentale.
- Collecter les insectes retrouvés sur l'abat de volaille contenant dans le piège.

Partie laboratoire dont les activités principales sont :

- Identifier les espèces de mouches cibles associées aux appâts (abats de volailles).
- Réaliser des élevages au laboratoire des adultes de la mouche *L. sericata*.
- Tester le pouvoir antimicrobien de la mouche *Lucilia sericata* contre des souches microbiennes de référence.

Pour ce faire, notre travail comporte quatre principaux chapitres :

Le chapitre I sera consacré à une recherche bibliographique sur la larvotherapie, son utilité, son application en clinique, ainsi que des généralités sur la mouche *Lucilia sericata*.

Le matériel utilisé ainsi que les méthodes de travail poursuivies dans notre étude, seront représentés dans le second chapitre.

Le troisième chapitre regroupera les résultats obtenus dans ce travail. La Discussion de ces derniers sera abordée dans le quatrième chapitre, et nous terminerons notre étude par une conclusion et des perspectives.

I : Généralités

I.1. Définition de la larvothérapie

La luciliathérapie, également appelée asticothérapie, larvothérapie ou maggot therapy est l'emploi délibéré de la procréation naturelle de la mouche *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptère, Calliphoridae) à des fins thérapeutiques où les larves de cette catégorie de mouches se nourrissent exclusivement de tissus morts (Guilhou et *al.*, 2004).

I.2. Rôle des mouches nécrophages

Les mouches nécrophages sont associées à la décomposition de tissus organiques et participent à la pollinisation des plantes (Gaudry et *al.*, 2007). Leur régime alimentaire est directement lié à la présence d'un cadavre. Ce sont donc les véritables nécrophages qui vont se nourrir exclusivement de ce substrat (Damien, 2008).

Elles sont utilisées pour estimer l'intervalle post mortem minimum (Byrd et Castner, 2009) certaines larves de mouches sont impliquées au traitement des plaies « asticothérapie » (Bonn, 2000).

I.3. But de la larvothérapie

Le but de la larvothérapie est de favoriser la détersion, la désinfection et la cicatrisation des plaies chroniques. Après le succès de la larvothérapie dans des temps anciens, son déclin avec l'apparition des antibiotiques, elle connaît un renouveau depuis les années 1990 (Guilhou et *al.*, 2004).

Plusieurs raisons expliquent ce renouveau : une meilleure connaissance des mécanismes d'action des larves de *Lucilia sericata*, la formulation de larves médicales stériles dans des sacs faciles à utiliser, la mise au point de protocoles thérapeutiques plus efficaces et le développement des résistances bactériennes. Ainsi, bien que thérapeutique minoritaire, la larvothérapie se développe de plus en plus en médecine humaine et vétérinaire (Baer, 1931).

Cette thérapeutique ancienne a été interrompue après la seconde guerre mondiale lors de l'émergence des antibiotiques. Actuellement, l'effet antibactérien en particulier sur les bactéries résistantes tels que le staphylocoque doré ou les streptocoques de groupe A et B et la détersion assurée par les Larves rendent leur utilisation très intéressante dans les plaies chroniques en particulier chez les diabétiques. Les Larves stériles sont intégrées dans un pansement et leurs sécrétions agissent au travers du pansement. L'efficacité des larves est maintenant admise et des études cliniques scientifiques sont en cours pour le prouver (Wim et *al.*, 2011).

I.4. Mécanismes d'action de la larvothérapie

La larvothérapie a trois intérêts essentiels (Caruel et Faucher, 1998) :

- la détersion.
- la désinfection.
- la promotion du tissu de granulation.

I.4.1 La détersion

La détersion est une étape essentielle de la prise en charge des plaies chroniques. Elle consiste à débarrasser la surface des plaies des tissus nécrosés et de la fibrine.

Le mode d'action détersif des larves reste encore imparfaitement connu et on évoque plusieurs mécanismes :

- Plusieurs études ont montré que les larves excrètent des enzymes digestifs comme les carboxypeptidases A et B, la leucine aminopeptidase, la collagénase, et des sérines protéases (Nigam et *al.*, 2006). Ces enzymes liquéfient la fibrine qui est alors absorbée par les larves à raison d'une consommation quotidienne estimée à 15 grammes par larve. Dans des conditions d'humidité appropriées, les larves peuvent croître de 10 fois leur poids initial en 3 jours.

Plus récemment, une équipe anglaise a mis en évidence la sécrétion in vitro de 2 sérines protéases, une métalloprotéinase et une aspartyl protéinase dont le rôle est important dans la dégradation des composants de la matrice extra cellulaire comme la laminine et la fibronectine.(Chambers et *al.*,2003).

- Une action mécanique n'est pas exclue : d'une part par le grouillement des larves sur la plaie et d'autre part, par une dilacération de la fibrine par leurs mandibules (Barnard , 1977). Cet effet probablement présent avec les larves en liberté sur les plaies, est toutefois limité avec l'utilisation des larves en sachets.

I.4.2 Désinfection

Dans la littérature, plusieurs travaux évoquent le rôle désinfectant des larves (Thomas et Jones, 2000 ; Beasley et Hirst, 2004). Cette action repose elle aussi sur plusieurs mécanismes (Thomas et Jones, 2000).

- Une action mécanique : en permettant la détersion des plaies, les larves assurent une diminution de la charge bactérienne adhérente aux tissus nécrosés (Goldstein, 1931). Le passage des bactéries ainsi absorbées dans le tractus digestif des larves semble leur être fatal.
- Le mouvement des larves sur la plaie pourrait stimuler la production d'exsudat plus abondant.

- L'irrigation physiologique ainsi créée pourrait favoriser l'élimination des germes.
- La production d'ammoniaque par les larves a également été évoquée.

L'élévation induite du PH, néfaste à la croissance bactérienne (Thomas et Jones, 2000 ; Graninger *et al.*, 2002) détruirait l'infection de surface.

- D'autres substances ont été découvertes dans les sécrétions larvaires et auraient une action antibactérienne : l'allantoïne, l'acide phénylacétique et le phénylacétaldehyde (Erdmann et Khali, 1936 ; Robinson, 1937).
- Enfin, plus récemment, la sécrétion de substances antibactériennes par les larves a été rapportée. Cette notion avait déjà été mise en évidence dès 1935 par Simmons (Simmons, 1935), puis par Thomas (Thomas *et al.*, 1999). Ces protéines semblaient plus bactériostatiques que bactéricides, mais la variabilité du degré d'inhibition serait peut être liée aux différentes méthodes de recueil des sécrétions larvaires. Seule une protéine de moins de 500Da a montré dans des études récentes une activité antibactérienne contre un SARM (Nigam *et al.*, 2006). D'autres investigations sont en cours pour typer plus précisément cette substance, mais cette découverte permet d'envisager un champ d'indication plus large pour la larvothérapie puisque son action bactéricide a été mise en évidence *in vitro* vis-à-vis de SARM, *E. Coli* et *Pseudomonas* (Mumcuoglu *et al.*, 1999). *In vivo*, plusieurs cas cliniques font état de l'amélioration variable de plaies contaminées par des SARM. La faible quantité de larves appliquées et une durée trop brève du traitement ont été mises en cause dans les cas de résultats insuffisants (Thomas et Jones, 1931).

I.4.3 Stimulation du tissu de granulation

Plusieurs études, concernant des ulcères de jambe, des escarres et des plaies de pieds diabétiques, font état d'une amélioration de la surface des plaies traitées par la larvothérapie avec la prolifération d'un tissu de granulation de bonne qualité et une cicatrisation plus rapide (Mumcuoglu, 1999 ; Sherman, 2002 ; Chambers *et al.*, 2003 ; Sherman, 2003).

Initialement, on pensait que l'accélération de la prolifération cellulaire n'était due qu'à la stimulation mécanique du lit de la plaie par le grouillement des larves. Cet aspect « mécanique » ne peut cependant pas être retenu avec l'utilisation des larves en sachets.

La déterision et l'effet désinfectant n'expliquaient pas tout et des recherches *in vitro* ont montré que les sécrétions larvaires stimulent la croissance des fibroblastes humains (Prete, 1997). Cette action positive s'exerce soit directement, soit en potentialisant l'effet de certaines cytokines comme l'interleukine 6 et l'EGF (Epidermal Growth Factor) sur la croissance des fibroblastes.

Un effet remodelant de la matrice extra cellulaire a également été évoqué : les sécrétions larvaires diminueraient l'adhésion des fibroblastes au collagène et à la fibronectine par un effet protéolytique, améliorant par là même la prolifération de néo tissu (Chambers, 2003 ; Horobin *et al.*, 2003).

Enfin des quantités variables de cytokines pro cicatrisantes et de facteurs de croissances (IL1, EGF, PDGF, TGF beta, FGF et IGF) ont été mis en évidence dans les excréments larvaires mais des recherches sont en cours afin d'en connaître le rôle exact et l'éventuel intérêt thérapeutique (Smith *et al.*, 2006).

I.5. Historique

L'asticothérapie pour se rapprocher du terme anglais "maggot therapy" est une pratique très ancienne (Téot, 1996).

Depuis des milliers d'années, les aborigènes australiens et les indiens Maya utilisaient des vers pour nettoyer les plaies. Ambroise Paré le premier en compris le bénéfice thérapeutique au 16^{ème} siècle (Caruel et Faucher, 1997). Sous le premier Empire, alors qu'il soignait les blessés sur les champs de bataille, le Baron Larrey, Chirurgien de la Grande Armée, observa que les larves présentes sur les plaies amélioraient la formation du tissu de granulation (Larrey, 1829). La première application clinique des larves a été proposée par Zacharias et Jones pendant la guerre civile américaine (Mumcuoglu, 2001). Le chirurgien William BAER redécouvrit cette technique pendant la 1^{ère} guerre mondiale et fut à l'origine de son extension dans l'entre 2 guerres (Baer, 1931). L'engouement pour la larvothérapie s'amenuisa après la 2^{ème} guerre mondiale en raison de l'essor des techniques chirurgicales et d'hygiène, et de l'utilisation plus large des antibiotiques. L'émergence de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques depuis 20 ans et la curiosité des cliniciens ont ravivé l'intérêt pour cette technique (Mumcuoglu, 2001; Beasley, 2004).

L'utilisation d'animaux pour soigner des humains, dure depuis des siècles, ainsi au XVII^{ème} siècle avant J.C., Hammoun-Rabi, chirurgien de son état utilisait des décoctions d'animaux les plus divers pour soigner les gens (Sournia, 1992). Tandis que les sangsues sont toujours utilisées de nos jours pour réaliser des saignées locales à visée anti-congestive. Dans le film "Gladiator" sorti récemment, on voit le héros porteur d'une plaie (faite lors d'un combat de gladiateurs) infestée d'asticots, son compagnon d'armes lui soufflant "laisse les faire!". Ambroise Paré (1510-1590) a été le premier à faire état dans ses écrits de l'utilisation des asticots : "faire bouillir des têtes de chiots nouveau-nés, de l'huile de lys avec des asticots et de la térébenthine vénitienne"(Caruel et Faucher, 1998).

Entre l'époque de la campagne d'Égypte où le baron Jean Dominique Larrey chirurgien de l'empereur note leur utilisation plutôt par la force des choses (Roudaut-Zagnoli, 1998), et l'année 1931 où ce traitement réservé pour les plaies de guerre entre dans la médecine civile, on ne trouve pas d'écrits sur le sujet. Puis dans les années quarante avec l'avènement des antibiotiques, l'asticothérapie tombe aux oubliettes. Cependant depuis une dizaine d'années

environ, l'asticothérapie revient en force. À l'ère des traitements pour les plaies de plus en plus modernes et aboutis, il nous est apparu intéressant de comprendre à travers la littérature l'intérêt de ce traitement et les raisons de ce nouvel engouement.

Depuis une dizaine d'années, on dénombre environ 1000 praticiens (Gottrup et *al.*, 2001) qui l'utilisent. Dans la littérature, deux noms reviennent très souvent, ce sont Sherman aux USA et Thomas en Grande-Bretagne, tous les deux ayant beaucoup publié sur le sujet (Thomas et *al.*, 1998 ; Thomas et Andrews, 1999).

L'asticothérapie s'est développée plus rapidement en Grande-Bretagne qu'aux USA, S. Thomas et ses collaborateurs ayant promu cette méthode à travers de nombreuses conférences sur le sujet. Directeur de *Biosurgical Research Unit*, partie intégrante de S.M.T.L. (Surgical Materials Testing Laboratory - web : www.smtl.co.uk, unité produisant des larves stériles depuis 1995), Bonn note que S. Thomas est optimiste sur la validation de ce traitement parle ministère de la santé de son pays (Bonn, 2000).

Au USA, Sherman note que de nombreux patients relèvent de ce type de traitement mais la difficulté étant de trouver. Suffisamment de praticiens qui acceptent l'asticothérapie dans la mesure où il existe encore un nombre conséquent de médecins qui considèrent ce traitement comme archaïque. Cependant les compagnies d'assurances américaines remboursent l'asticothérapie (Bonn, 2000).

En Israël, ce traitement a aussi été réintroduit en même temps qu'aux USA et en Grande-Bretagne. K.Y. Mumcuoglu semble en être le référent (Vistnes et *al.*, 1981 ; Mumcuoglu et *al.* ; 1999).

L'asticot est officiellement un « médicament » depuis 2005 en France. Les larves à usage thérapeutique proviennent d'une culture élaborée en milieu stérile. Enfermées dans des pansements perméables à l'air et humidifiées deux fois par jour, échappant ainsi à la vue du patient, elles sont appliquées sur la plaie à soigner et se mettent aussitôt à l'ouvrage. La plaie est nettoyée en permanence puisque le pansement est changé tous les deux jours pour remplacer les travailleuses repues par de nouvelles recrues. Ces pansements « vivants » prennent le relais de la médecine conventionnelle lorsque celle-ci se révèle défailante ou impuissante. Ils font merveille sur les escarres, les plaies infectieuses incurables ou les plaies ulcérées (Cazander et *al.*, 2010).

Si abjects qu'ils puissent nous paraître au premier abord, nous aurions tort de refuser notre table à ces petits invités dotés d'un appétit d'ogre. Car si dans la nature, ils accomplissent un service de nettoyage hors pair, ces petits boulimiques de la décomposition sont aussi, sans le savoir et pour notre plus grand bien, des acteurs de la réparation et de la reconstruction (Jones et Wall, 2008).

II : TECHNIQUES D'APPLICATION DE LA LARVOTHERAPIE EN CLINIQUE

II.1. Usage des larves

Les larves sont présentées : Soit directement pour être déposées individuellement sur la plaie "surtout en Angleterre" (figure1) ; soit regroupées dans un petit sac appelé "Biobag" en Allemagne (Figure2). La détersion et l'effet bactéricide sont obtenus par les liquides sécrétés par les larves et qui passent au travers du sac (Thomas et *al.*, 1998).



Figure 1 : Des larves sur une plaie après 5 jours (Magalon et Vanwijck ,2004).



Figure 2 : Biobag contenant des larves (Toussaint, 2008).

Quelle que soit la présentation, les berges de la plaie doivent être protégées des enzymes protéolytiques sécrétées par de la vaseline neutre, du "Cavillon" (film imperméable en aérosol), des hydrocolloïdes adhésifs, de la pâte de Zinc, *etc.* (Guilhou et *al.*, 2004).

II.2. Application du traitement

Deux protocoles d'applications des larves libres sont mis à disposition par Zoobiotic© au personnel soignant : L'un est destiné aux plaies de tailles limitées, l'autre aux plaies étendues des jambes et bras.

II.2.1. Protocole d'application pour les plaies de tailles limitées : le protocole est donné par anonyme (2006)

a. Préparation de la zone à traiter

Le patient est installé confortablement et s'assure qu'il comprend bien tous les aspects du traitement. Le pansement existant est ôté. Toute trace résiduelle de traitements antérieurs est supprimé soigneusement, le pansement hydrocolloïde de la forme et de la taille de la plaie est troué et placé en appuyant fermement sur la peau intacte (figure 3). Des bandes de pansements hydrocolloïdes sont convenablement coupées Pour les plus grandes plaies et placées à la marge de la plaie. Si la plaie est petite ou de faible profondeur une double couche de pansements hydrocolloïdes peut être appliquée. Si un pansement hydrocolloïde ne peut être utilisé, la peau saine entourant la plaie doit être protégée avec une bande imprégnée de pâte à zinc.

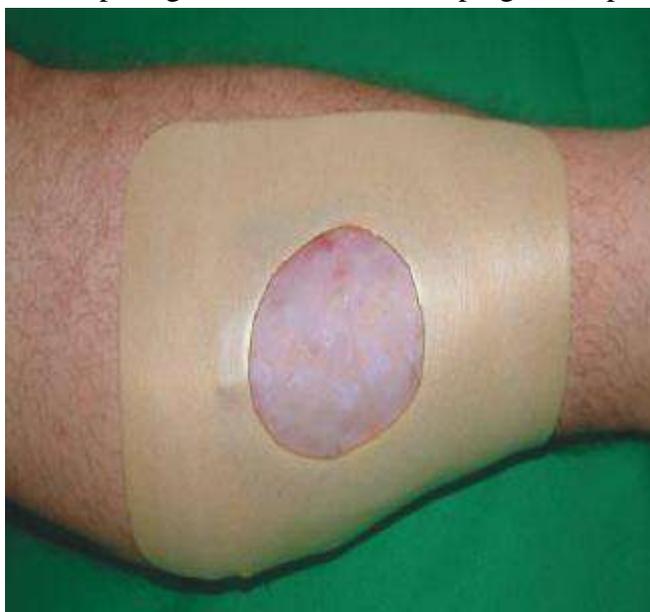


Figure 3 : Emplacement de Pansement hydrocolloïde (Zoobiotic, 2006).

b. Préparation des larves avant application

Environ 5 ml de solution saline stérile est ajouté dans le flacon de larves, qui est agité délicatement pour enlever les larves des parois et du couvercle. Si plus d'un flacon de larves doit être appliqué, le contenu du premier flacon est versé dans le deuxième et agité comme précédemment.

Si nécessaire, un morceau de filet stérile est coupé, et fourni avec chaque flacon de larves, de sorte qu'il soit suffisamment grand pour couvrir la zone exposée de la plaie et le bord du pansement hydrocolloïde puis, le filet est placé sur de la gaze stérile et pré-humidifié à laide

d'une solution saline pour éviter l'effet de tension de surface, le contenu du flacon est lentement versé sur le filet (figure 4).

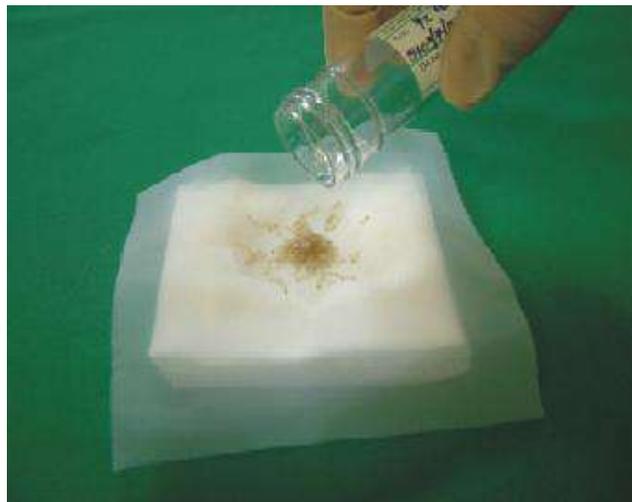


Figure 4 : Coulage de flacon de larves sur le filet stérile (Zoobiotic, 2006).

c. Application des larves sur la plaie

Le filet est retourné sur la plaie. 5 à 8 larves sont Compté au cm^2 , Les larves ne s'échapperont pas du filet car elles sont maintenues par l'effet de tension de surface (figure 5), le filet stérile est Fixé sur le pansement hydrocolloïde avec le ruban adhésif chirurgical (figure 6). Si une pâte à zinc est utilisée, la maille du filet est fermement pressée contre la pâte et une nouvelle couche de bande est appliquée sur les bords du filet pour le maintenir en position.

Quelle que soit la technique utilisée, la partie centrale du filet doit restée libre afin de permettre le drainage des exsudats et un approvisionnement suffisant en oxygène pour les larves, une pipette de solution saline stérile est Versée sur le filet et couverte avec une compresse stérile.

Enfin, le pansement micro-perforé à adhésivité limitée est appliqué et le tout est maintenu à l'aide de sparadrap ou une bande de rétention légère (figure 7). Un pansement occlusifs ne doit être utilisé, car la suffocation des larves pourraient être provoqué, Le dispositif doit être contrôlé tous les jours.



Figure 5 : Application de filet stérile sur la plaie (Zoobiotic, 2006).



Figure 6 : Fixation de filet stérile (Zoobiotic, 2006).



Figure 7 : Maintenir le tout à l'aide d'une bande rétention légère (Zoobiotic, 2006).

II.2.2. Protocole d'application pour les plaies étendues des jambes et bras

La technique adoptée est celle donnée par anonyme (2006).

a. Préparation de la zone a traité :

Le patient est installé confortablement et s'assuré qu'il comprend bien tous les aspects du traitement, le pansement existant est Ôté et toute trace résiduelle de traitements antérieurs est soigneusement supprimé, le pansement hydrocolloïde est coupé en bandes de 5 cm de largeur environ, et tout appliqué autour de la jambe ou du bras sans appuyer de chaque côté de la plaie (figure 8). Si un pansement hydrocolloïde ne peut être utilisé, la peau saine entourant la plaie doit être protégée avec une bande imprégnée de pâte à zinc, toutes les zones de peau saine sont protégé entre chaque bande de pansement hydrocolloïde par application de pâte à zinc ou d'une crème protectrice équivalente, le filet est coupé à la longueur appropriée et la jambe ou le bras est glissé à l'intérieur, le filet est Fixé sur la bande de pansement hydrocolloïde situé a l'extrémité supérieure du membre l'aide du ruban adhésif imperméable, et s'assuré que le filet soit d'une longueur suffisante pour atteindre l'autre bande de pansement hydrocolloïde situé à l'extrémité inférieure (figure 9) la partie ouverte du filet est Replié afin d'exposer la plaie.



Figure 8 : Bandage avec de pansement hydrocolloïde positionnées (Zoobiotic, 2006).



Figure 9 : Fixation de filet sur le pansement hydrocolloïde (Zoobiotic, 2006).

b. Application des larves sur la plaie

b₁. Transfert délicat des larves sur la plaie

Le filet stérile est déplié et fixé sur la bande de pansement hydrocolloïde située à l'extrémité inférieure à l'aide du ruban adhésif imperméable (figure 10 et figure 11), une pipette de solution saline stérile est versée sur le filet et couvert à l'aide d'une compresse stérile. Enfin, le pansement micro-perforé est appliqué à adhésivité limitée et à l'aide d'une bande de rétention légère tout est maintenu (figure 12). Un pansement occlusif ne doit être utilisé. Le dispositif doit être contrôlé tous les jours.



Figure 10 : Transfert des larves sur la plaie (Zoobiotic, 2006).



Figure 11 : Fixation de filet à l'extrémité inférieure (Zoobiotic, 2006).



Figure 12 : Application de pansement micro-perforé à adhésivité limitée (Zoobiotic, 2006).

b₂. Par une application en Biobag

Il peut être ; soit déjà fabriqué par le laboratoire, soit confectionné sur place (figure 13). Un morceau de PVA "Biogard" est découpé aux dimensions souhaitées (figure13 A) et scellé en laissant un côté ouvert (figure13B) afin de mettre un petit morceau d'éponge " Vacuseal-éponge" sur lequel 15 à 25 larves sont déposées à l'aide d'une spatule (figure13 C). le sachet , doit être serré pour laisser la possibilité aux larves de croître sans déchirer leur contenants, le sachet (le biobag) est ensuite scellé et imprégné de sérum physiologique; il peut être ainsi conservé plusieurs heures (figure 13 D). La dimension d'un biobag ne doit jamais excéder 4×4cm .Si la superficie de la plaie est importante, il est recommandé d'utiliser plusieurs sachets (Magalon et Vanwijck ,2004).



Figure 13 : Préparation de "Biobag" (Magalon et Vanwijck ,2004).

(A) Des morceaux de PVA biogard sont découpés aux dimensions requises (B) Ces morceaux sont scellés pour confectionner des petites sacs (C) Un morceau de (1cm³) de vacuseal éponge est mis de dans et 15 à 25 de larves sont posé (D) Le biobag (le sachet) et scellé puis imprégné de sérum physiologique.

II.3. Exemple d'application de l'asticothérapie dans un cas clinique

En France, la larvothérapie progresse régulièrement depuis son introduction en 2006. Jusqu'en Juin 2012, ce sont près d'un millier de patients traités au sein d'une centaine d'établissements de soins.

Voici à quoi ressemble un traitement moderne de larvothérapie ;

Une petite plaie fibrineuse du pied chez un patient diabétique sera traitée avec des larves sous sachet (figure 14 A). La plaie est évaluée et mesurée, l'absence de traces de traitements antérieurs susceptibles d'être néfaste pour les larves est noté (figure 14 B). La zone de tissu sain entourant la plaie est protégée contre les enzymes protéolytiques des larves à l'aide d'une pâte à eau ou à oxyde de zinc (figure 14 C). Le sachet contenant les larves est posé sur la plaie; Ici, il s'agit d'un pansement BioFOAM[®] produit par ZooBiotic de 2,5 cm x 4cm contenant 150 larves environ ; les tissus nécrotiques sont liquéfiés par les sécrétions des asticots qui sont sorties de l'enveloppe, en contre partie le liquide nécrotique nourrissant les larves à l'intérieur est absorbé par le Biobag ; Quelques fois le Biobag peut être en nylon ou en dac (figure 14 D).

Le sachet est recouvert d'une compresse (figure 14 E, F). L'ensemble sachet + compresse est maintenu en place à l'aide d'un pansement adhésif mais non-occlusif pour stabilisé le montage, et afin d'évité que les larves ne fassent trop saigner le tissu de granulation (action puissante des enzymes protéolytiques) (figure 14 G).Le pansement est terminé. Il sera changé tous les jours lors de l'examen de la plaie et la vérification des larves. Selon l'état de la plaie et l'avancement de la détersion le traitement durera de 3 à 4 jours (figure 14 H).Fin du traitement (lors de 3 Emme jours). La couleur du pansement doit être noté, due à l'évacuation par les larves des produits de détersion (figure 14 I) (Anonyme, 2001).



Figure 14 : Etapes d'application d'un biobag lors d'un traitement moderne de larvothérapie (Anonyme, 2001).

(A) Une petite plaie fibrineuse du pied du patient (B) Mesure et évaluation de la plaie (C) Protection de la zone de tissu sain entourant la plaie à l'aide d'une pâte à eau ou à oxyde de zinc (D) Dépôt du sachet contenant les larves sur la plaie (E,F) Couverture de sachet avec une

compresse (G) Maintenance de sachet+compresse a l'aide d'un pansement adhésif mais non-occlusif pour stabilise le montage (H) Fin de pansement (I) Fin de traitement (après 3 a 4 jours).

à la fin «officielle» du traitement ou Dès que la détersion est obtenue, le pansement est retiré (figure15 A, B), le sachet est éliminé dans un container DASRI, La plaie est complètement nettoyée en trois jours avec un minimum de soins quotidien (figure15 C) (TOUSSAINT, 2008).



Figure 15 : Fin de traitement (anonyme, 2001).

(A, B) enlèvement de pansement+le sachet (C) la petite plaie fibrineuse du pied du patient après le traitement.

III : Généralités sur les *Calliphoridae*

III.1. Morphologie et Biologie des *Calliphoridae*

La famille des *Calliphoridae* regroupant environ 1500 espèces, dans la plupart sont des mouches nécrophages (Rueda *et al.*, 2010). Elles ont l'aspect de mouches au corps robuste qui est une suite de segments divisée en tagmes : la tête, le thorax et l'abdomen (figure 16) (Roth, 1980).

a. la tête

La tête est une capsule assez homogène où ne sont plus reconnaissables les segments originels, elle porte une paire d'antennes qui permet à l'insecte de percevoir les odeurs et les saveurs. Deux yeux à facettes (le terme scientifique est ommatidie): appelés aussi yeux composés, ils sont constitués d'une multitude de petits éléments en forme d'hexagone, des pièces buccales (les lèvres, les mandibules et les mâchoires) de type suceur-lécheur (avec une trompe).

b. le thorax

Il comprend le prothorax, le mésothorax et le métathorax. Chacun de ces segments porte une paire de pattes ambulatoires, les deux derniers, pouvant porter une paire d'ailes, constituent, chez les Ptérygotes, le ptérothorax.

c. l'abdomen

Il comprend originellement une douzaine de segments. Par suite de fusions ou de télescopages, il en comporte souvent un nombre visible bien moindre. En général, on peut admettre que l'abdomen se termine, par l'anus, sur l'II-Emme segment, quant au processus génital, il est porté par le 9^{ème}.

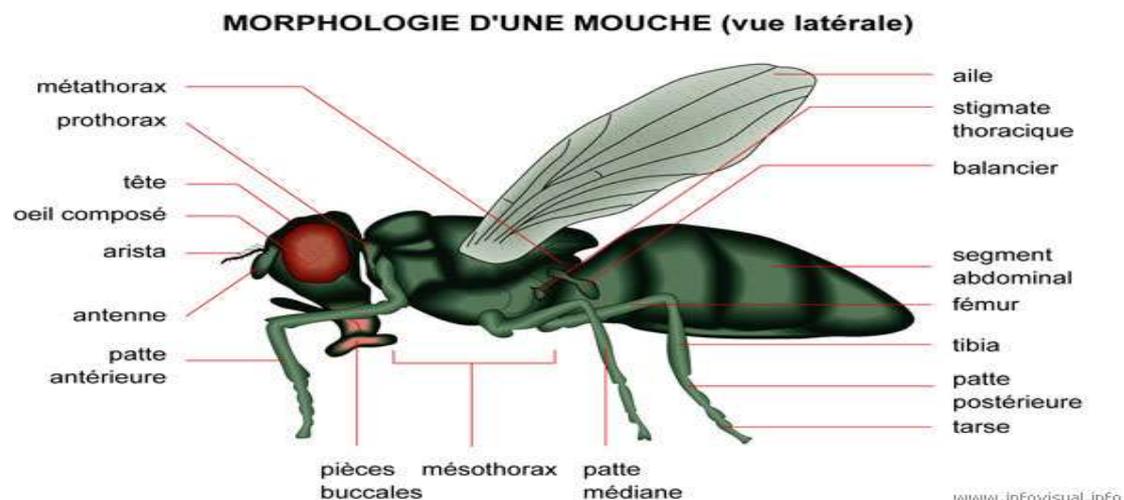


Figure16 : Schéma de morphologie d'une mouche *caliphoridae* (Knut, 1991).

Leurs tailles est de 4 à 16 mm et de couleur variantes : métalliques bleu noir, bleu-violet, bleu-vert ou vert pour l'essentiel des espèces, ce sont des mouches assez rapides avec un vol plutôt bruyant (Wyss et Cherix, 2013). Ces insectes, comme leur nom l'indique appartiennent à l'ordre des diptères donc ne possèdent qu'une paire d'ailes qui est mésothoracique. Les ailes métathoraciques sont très réduites et transformées en une paire d'organes en forme d'altère, nommés balanciers ; Corrélativement le dernier segment thoracique est réduit. Les trois paires de pattes sont dans la majorité des cas bien développées et possèdent des tarses de cinq articles (Smith, 1986).

Cette famille se distingue par un thorax qui présente au niveau de mesonotum quelques rangées de fortes soies hypopleurales (poils durs), connues sous le nom de macrochètes qui peuvent caractériser la famille, ainsi par un dimorphisme sexuelle au niveau des yeux qui sont plus écartés chez la femelle que chez le mâle, de courtes palpes maxillaires et un Calyptère bien développé (Szpilak, 2010).

Les femelles sont anautogènes c'est-à-dire qu'elles ont besoin d'une nourriture protéinée nécessaire à la maturation de leurs œufs. La femelle pond en général 150 à 200 œufs par ponte et autour de 2 000 tout au long de sa vie. Ces œufs sont blancs ou jaunes de 0,6 à 1,5 mm de long ayant un peu l'aspect d'un grain de riz qui, à l'éclosion, vont donner des larves de premier stade (Wall, 1993). Ces larves sont apodes et ont en général une morphologie et un mode de vie très différents à ceux des adultes qui sont floricoles où ils se nourrissent de liquides variés, provenant de matière organique en décomposition (viande, fruits...) ou encore des fleurs (nectar). De l'eau sucrée les attirent facilement, tandis que les larves ont un régime pouvant varier selon les genres : saprophage (se nourrit de débris végétaux ou animaux), créophage (ou carnivore), sarcophages (se nourrissent de chair d'un hôte mort), ou parasite et peuvent provoquer des myiases (Wyss et Cherix, 2013). Après deux mues correspondant aux stades larvaires deux et trois, les asticots vont s'éloigner du corps pour s'empurger et se transformer en puppe qui a la particularité de rester enfermée dans la dépouille larvaire du dernier stade qui se rigidifie et brunit progressivement tandis que la nymphe se métamorphose : c'est la pupaison. L'imago devra rompre cette enveloppe pour émerger.

C'est pour cela qui sont dites « holométaboliens », c'est par ce que le passage de l'état larvaire à l'état adulte se fait par l'intermédiaire d'un état nymphal ainsi que le mode de vie et le régime alimentaire des stades immature et les stades adultes sont différents (Auberton et *al.*, 2012).

On dit que La grande majorité des espèces des calliphoridaes sont ovipares, mais quelques-unes sont vivipares et cela fait que le cycle biologique décrit précédemment n'est pas toujours respecté. Chez certaines espèces de Calliphoridae, ou les œufs sont retenus dans les voies génitales de la femelle après leur fécondation jusqu'à l'éclosion des larves de premier stade, qui seront directement déposées sur leur source de nourriture : on parle alors de larviposition (Fabre, 1923 ; Shewell , 1987 ; Erzinçlioglu ,1996 ; Cook et Dadour 2011 ; Wyss et Cherix , 2013).

On distingue deux grands sous-ordres de diptères par rapport à leurs antennes qui sont les nématocères et les brachycères. Chez les nématocères, les antennes sont plus fines et multi segmentées, alors qu'elles sont plus courtes et comptant moins de 6 segments chez les brachycères et c'est parmi les brachycères que l'on retrouve les Calliphoridae (Knut, 1991).

La majorité des représentants de la famille des Calliphoridae se rencontre fréquemment (7/9) sur les cadavres au cours des premières phases de décompositions. Ainsi que plusieurs espèces d'entre eux ont testées à l'asticothérapie, mais la plus communément utilisée aujourd'hui est *Lucilia sericata*, appelée également « lucilie soyeuse », « mouche verte de la viande » ou « green bottle blowfly » chez les anglo-saxons (Julian, 2009).

III.2.L'intérêt de l'utilisation des larves de *lucilia sericata* en asticothérapie

Toutes les souches d'asticots ne sont pas propres à l'utilisation médicale. En effet beaucoup d'entre elles s'attaquent au tissu humain (Bonn, 2000).

Dans les publications traitant de l'asticothérapie, les larves ou asticots utilisés sont majoritairement ceux de la mouche appelée *Lucilia Sericata*, souche retenue pour ses caractéristiques suivantes :

- Elle ne s'attaque qu'aux tissus morts sans toucher aux tissus avoisinants ni au tissu de granulation (figure 17) (Téot, 1996 ; Kennedy et al., 1997), à la différence des autres espèces qui consomment également les tissus sains (pascal toussaint, 2008).
- Elle ne se niche pas dans les berges de la plaie (Téot, 1996).
- Elle contribue à diminuer les mauvaises odeurs en tuant et digérant les bactéries (Courtenay, 1999 ; Bonn, 2000 ; Courtenay et al. ; 2000 ; Fitzpatrick, 2000).
- Elle donne une détersion rapide, efficace, indolore et peu onéreuse (Téot et al., 2001). Bonn relate dans une étude comparative de Walker sur un petit groupe de patients: six traités par asticothérapie eurent leurs plaies détergées en quelques jours alors que dans l'autre groupe traité par hydrogel, deux nécessitèrent plus d'un mois de traitement pour obtenir le même résultat (figure 18) (Bonn, 2000).
- Elle n'est pas dépendante d'un apport suffisant en sang (Morison et al., 1997).



Figure 17 : Des larves de *Lucilia sericata* traitant une plaie (Téot, 1996 ; Kennedy et al., 1997).



Figure 18 : Des photos représentant les résultats donnés par les larves sur la plaie d' un patient (Bonn, 2000).

III.3. *Lucilia séricata*

III.3.1. Taxonomie

Selon Gennard (2012), cette mouche appartient à ;

Embranchement : Arthropodes

Classe : Insectes

Ordre : Diptères

Sous-ordre : Brachycères

Famille : Calliphoridae

Genre : *Lucilia*

Especie : *Lucilia sericata*

III.3.2. Biologie et cycle de développement

Après l'accouplement, les femelles adultes pondent des grappes entre 100 à 300 œufs à la fois, préférentiellement sur les plaies, les blessures des moutons, sur les cadavres ou toute matière organique en décomposition. Il peut y avoir plusieurs générations par an (Strikewise, 2007). A environ 21 ° C, les œufs de *Lucilia sericata* prennent environ 21 heures pour éclore, et à 27 ° C, mettent environ 18 heures pour éclore, après leur dépôt. Le développement larvaire nécessite environ quatre jours à 20 ° C et trois jours à 27 ° C. Il y a trois stades à travers lesquels les larves se développent (Anderson, 2000). Cependant, de nombreux autres facteurs jouent un rôle dans le développement, y compris la source d'alimentation et d'humidité (Tarone et al., 2006).

Une fois pleinement développé, la larve du 3^{ème} stade (L3) quitte l'hôte ou charognes et creuse dans le sol ou le substrat qui l'entoure (Strikewise, 2007). Le développement nymphal est inactif lorsque la température du sol est inférieure à 7°C (christian et Marge, 2008), dure environ 10 jours à 21 ° C et 7 jours à 27 ° C (Anderson, 2000). Après la mouche adulte émerge et le cycle recommence (figure 19).

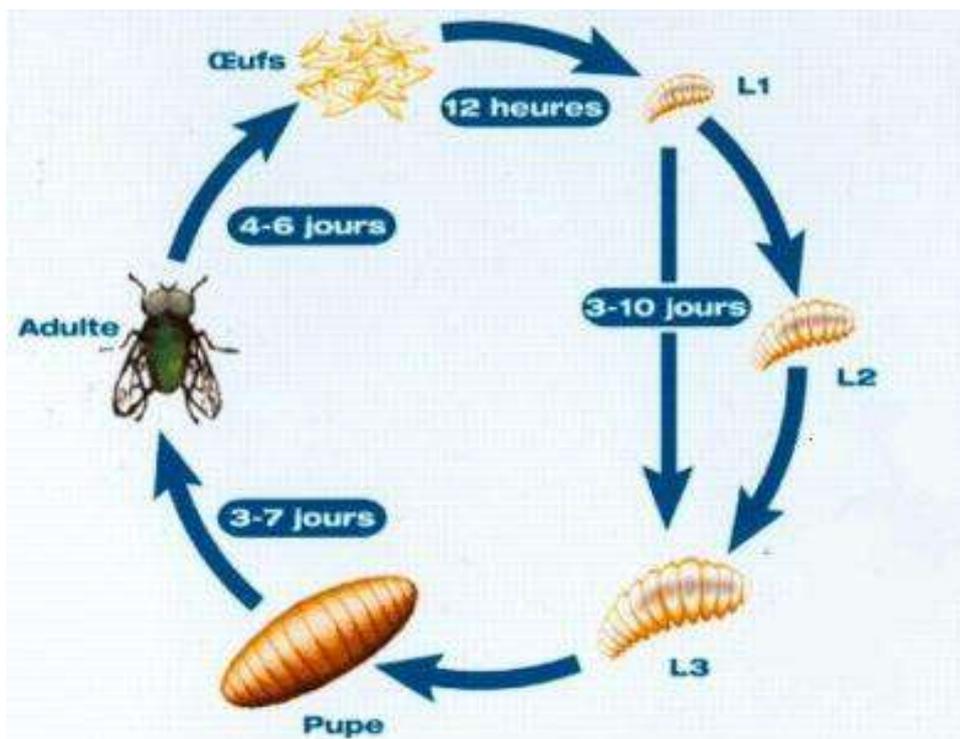


Figure 19 : Le Cycle biologique holométabole de *Lucilia sericat* (Aubernon al., 2012) .

III.3.3. Morphologie de *Lucilia sericata* :

a. Les Adultes

Ils sont généralement de couleur vert métallique et peuvent aussi avoir une coloration verte de cuivre (figure 20). Les pièces buccales sont généralement de couleur jaune et de type suceur-lécheur (Apperson et *al.*, 2011). Le dos est velu et le diamètre total est d'environ 8-10 mm. Les squames à la base des ailes sont glabres (Salimi *et al.*, 2010).



Figure 20 : Vue dorsale d'un adulte de *Lucilia sericata* (Wim et *al.*,2011).

b. Les Œufs

Ils sont généralement blanches, mais peuvent être un jaune pâle, et souvent déposés dans des lots ou des masses. Les œufs sont allongés avec une extrémité effilée légèrement, et sont d'environ 1,5 mm de long (figure 21) (Apperson et *al.*, 2011).



Figure21 : Oviposition des femelles adultes de *Lucilia sericata* (Meigen) (Baldrige, 2006).

c. Les Larves

Elles sont de couleurs blanches ou jaunâtres à travers les trois stades de développement et peuvent atteindre un maximum de 12-18 mm avant la pupaison (figure 22) (Apperson et *al.*, 2011). Les trois stades larvaires sont lisses (Australian, 2009). Elles sont de forme conique et ont une péritrème complète (zone entourant les spiracles) sur leurs stigmates postérieurs (structures qui ressemblent aux yeux, à l'arrière des larves qui sont utilisés pour la respiration) (Salimi et *al.*, 2010). L'identification des immatures mouches de la viande est difficile, ce qui nécessite un microscope, et les identifications sont souvent confirmées par l'élevage de ces individus immatures au stade adulte.



Figure 22 : Dernier stade larvaire (L3) de *Lucilia sericata* acéphalique. (Reames et *al.*, 2000).

d. Les pupes

Elles sont enfermées dans une coque durcie qui est habituellement de couleur brun rougeâtre, marron clair ou noir (figure 23). Cette coque est composée de la dernière peau du dernier stade larvaire (L3). Elles sont de 9 à 10 mm de long avec une largeur allant de 3 à 4 mm. Initialement, la pupa est blanche, mais rapidement est s'obscurcit rapidement en quelques heures (Apperson et *al.*, 2011).



Figure 23 : Pupes de *Lucilia sericata* (Whitworth, 2006).

I. Présentation du lieu de stage

Notre travail a été divisé en deux parties :

L'élevage et l'identification des spécimens ont été réalisés au niveau du laboratoire de Parasitologie (station expérimentale SNV), département de Biologie des populations et des organismes, Faculté S.N.V, université de Blida 1, et les tests antimicrobiens ont été effectués au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida durant la période allant du mois de février au mois de Juin 2016.

Les objectifs de cette étude sont chronologiquement visés :

- Dans un premier temps, a collecter et identifier les espèces cibles associées aux appâts (abats de volailles).
- Réaliser dans un second temps, des élevages au laboratoire de ces espèces.
- Tester dans un troisième temps, le pouvoir antimicrobien de la mouche *Lucilia sericata* contre des souches microbiennes de référence.

II. Matériel et méthodes

II.1. matériel

1.1. Matériel non biologique : (L'équipement utilisé dans notre étude est représenté en annexe 1)

1.2. Matériel biologique :

1.2.1. Espèce de mouche utilisée :

Notre travail est basé sur l'utilisation des larves de mouches vertes de l'espèce *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptère, Calliphoridae).

Le choix de cette espèce est basé sur le fait qu'elle a été largement utilisée en asticothérapie pendant des décennies et qu'elle est très fréquente en Algérie (Taleb, 2013 ; Taleb et al. 2015 ; Taleb et al. 2016).

1.2.2. Souches microbiennes

Des souches microbiennes de références ont été utilisées. Ces souches ont été choisies sur la base de leur importance et fréquence en microbiologie clinique.

A / Souches bactériennes

(Les références de ces souches sont mises en Annexe IV).

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii* et *Klebsiella pneumoniae*.

B / Souches fongiques

Saccharomyces cerevisiae, *Candida albicans* et *Aspergillus niger*

II.2. Méthodes

2.1 Capture et élevage de *Lucilia sericata*

Cette partie a été réalisée au laboratoire de Zoologie, département de B P O, Faculté SNV, université de Blida.

Plusieurs pièges à base d'appâts (abats de volailles) ont été utilisés. Le piège est fabriqué en coupant en deux une bouteille d'eau d'un litre et mettant la partie supérieure coupée et renversée sur la partie inférieure. Avant de fixer les deux parties du piège, une petite quantité du sable est placée au fond sur laquelle une quantité d'environ 250 gr d'appât est placée. La date, l'heure et le numéro du piège sont mentionnés sur une étiquette.

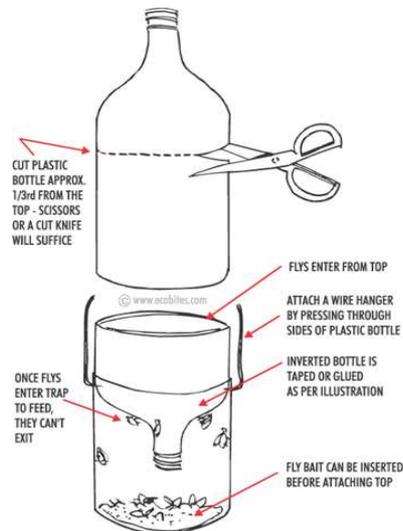


Figure 24 : Illustration du piège utilisé pour capturer les insectes nécrophages.



Figure 25 : Différentes étapes suivies pour placer le piège.

2.1.1. Prélèvement

Le prélèvement des adultes est réalisé chaque jour jusqu'à ce qu'on observe plus d'insectes. Les spécimens sont laissés vivants et transférés vers les cages d'élevages mesurant 35X15cm.



Figure 26: Transfert des insectes capturés dans des boîtes d'élevage.

2.1.2. Trie et identification des mouches :

Les mouches capturées sont triées et identifiées vivantes au laboratoire à l'aide d'une loupe binoculaire en utilisant des clés dichotomiques de Smith (1986) et Szpila (2012).

Le nombre de mouches mâles et femelles a été noté. L'adulte possède deux grands yeux composés. Les yeux de la femelle sont plus espacés que ceux du mâle (Gennard, 2012). Les principaux critères d'identification des Diptères adultes sont : Forme, taille, couleur du thorax, appendices, yeux, nervation des ailes, etc.

Les adultes de *L.sericata* sont maintenus dans des cages d'élevage au laboratoire pour la ponte à une température de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ et $50\pm 5\%$ d'humidité relative. Dans chaque cage nous avons mis du coton imbibé d'eau et du sucre ou du miel.

2.1.3. Stimulation des mouches adultes

Pour la ponte des œufs, chaque femelle est transférée individuellement dans une boîte contenant un substrat de ponte (foie de volaille). Les boîtes sont surveillées et vérifiées quotidiennement

Après la mort des femelles qui ont pondu, l'identification de l'espèce est confirmée et les spécimens sont conservés dans de l'alcool à 70% C.

2.1.4. Elevage des stades immatures :

Après la ponte, une partie des œufs pondus est utilisée pour les tests antimicrobiens, l'autre partie est réservée pour effectuer l'élevage. Après éclosion des œufs, les larves obtenues sont placés dans des boites.

Le fond de ces dernières est rempli du sable. Dans chaque boite, des abats de volaille d'environ 100 gr sont placés sur le sable. Les larves comptées et divisées équitablement entre les deux boites sont mises sur les abats et humidifiées avec de l'eau.



Figure 27 : Transfert des larves dans des boites d'élevage.

- Chaque élevage est quotidiennement observé.
- Après la pupaison, les pupes (stade immobile) peuvent être déposées directement dans des boites à insectes vivants (des boites aérées où on peut surveiller l'émergence) dans un souci de traçabilité.
- Chaque boite est étiquetée en mentionnant les données telles que le numéro de l'expérience, l'heure et la date de mise en élevage.
- Les boites sont maintenues jusqu'à l'émergence des adultes dans un endroit à température assez stable ou au laboratoire dans une enceinte climatique.
- Après l'émergence, les imagos sont transférés vers des cages d'élevage et gardés sous les mêmes conditions décrites précédemment. Les pupes non émergées sont gardées en collection dans des boites conservées dans de l'alcool.

2.2 Tests antimicrobiens :

Cette partie a été réalisée au laboratoire d'hygiène publique de la wilaya de Blida. Les manipulations de cette partie ont été réalisées sous des conditions rigoureuses d'asepsie.

2.2.1 Séparation des œufs

Dès que la mouche pond ses œufs sur un appât (abats de volailles), ces derniers sont placés dans un tube stérile contenant 15ml de l'eau physiologique, en agitant rapidement pendant 5 minutes pour arriver à séparer l'amas d'œufs. Cette méthode sert à compter le nombre d'œufs /ponte.



Figure28 : Amas d'œufs de *L. sericata* sur les abats de volailles.



Figure 29 : Tube stérile contient de l'eau physiologique.

Après séparation avec une cuillère, les œufs sont transférés dans des boîtes pétri en verre stérile, on a mis à l'intérieur un papier filtre divisé en champs. Le comptage se fait sous loupe binoculaire.

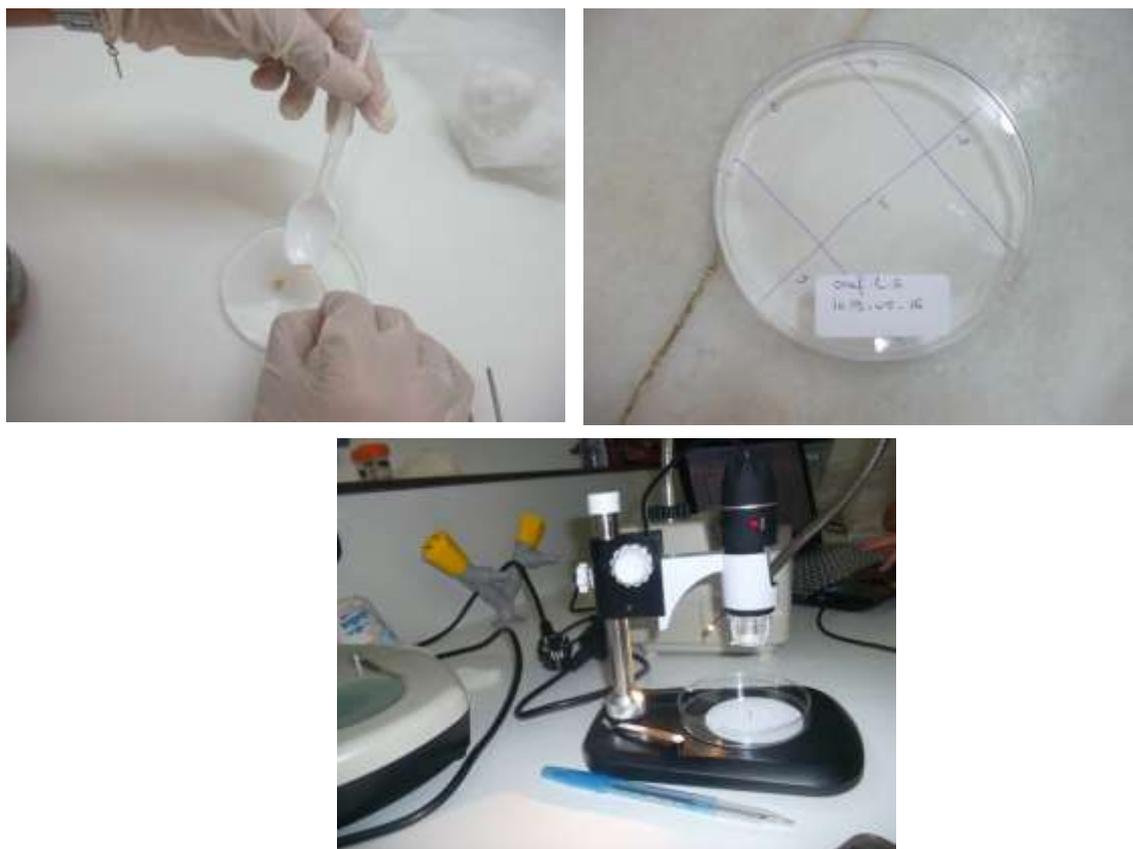


Figure 30 : Différentes étapes de séparation des œufs de *L.sericata*.

2.2. 2. Stérilisations des œufs :

Trois solutions désinfectantes à 10% ont été utilisées à savoir :

- Solution de Dakin (Dakin) ®
- La Polyvidone iodée (Bétadine) ®
- L'Hexomédine transcutanée 0,15 % (Isomédine) ®

Après leur séparation, les œufs ont été stérilisés par la méthode suivante :

- Les œufs ont été trempés dans chaque une des solutions de désinfection consacrées à cette étude pendant 2 minutes suivies par l'alcool 70% pendant 1 minute.
- Ils ont été ensuite rincés à l'eau physiologique stérile.
- Pour chaque produit, un nombre connu d'œufs a été incubé sur gélose nutritive et sur gélose au sang.
- Les boîtes ont été incubées à 25° C et vérifiées après 24, 48 et 72h.

Trois boîtes de gélose nutritive et trois boîtes de gélose au sang ont été utilisées comme témoin.

Le taux de mortalité a été calculé par la formule suivante :

Taux de mortalité = nombre total d'œufs incubés – nombre d'œufs éclos.



Figure 31: Différentes étapes de désinfection des œufs de *L. sericata*.

2.2. 3. Désinfection des larves :

Le mode de désinfection des larves est le même décrit précédemment. On met une dizaine de larve sur des boîtes de gélose au sang puis les incubent à 25°C, la lecture se fait après 24, 48, et 72h en calculant à chaque fois le taux de mortalité.

Après désinfection, une quantité d'environ 5 ml de solution saline stérile est versée dans le flacon de larves, et agitée délicatement pour enlever les larves des parois et du couvercle.

2.3 Application directe des larves vivantes

2.3.1. Désinfection des larves :

Les larves du troisième stade sont prélevées sous les appâts en les déplaçant soigneusement. Les larves sont sensibles à la lumière on les trouve surtout au-dessous de l'appât.

La désinfection est réalisée avec la même méthode décrite précédemment.



Figure 32 : Désinfection des larves.



Figure 33: Larves désinfectées dans La gélose au sang avec la Polyvidone iodée (Bétadine) ®.

2.3.2. Test antimicrobien :

Après désinfection, un nombre de 10 larves a été déposé au milieu de chaque boîte contenant des cultures bactériennes diluées à 10^{-3} . La zone d'application des asticots est couverte par une petite boîte Pétri à l'intérieur de la grande boîte avec l'agent pathogène : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Citrobactère freundii* et *Klebseilla pneumoneae*. Trois répliques pour chaque bactérie ont été utilisés.



Figure 34 : Effet du test anti microbien de *L.sericata* contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Les boîtes sont incubées à 37° C avec trois témoins négatifs (milieux de cultures uniquement) et trois témoins positifs (milieux en présence de souches bactériennes), afin d'estimer le degré de la lyse des cultures bactériennes dans la zone d'application des asticots (au centre de la boîte) après 24 h d'application des asticots.

- **Viabilité des bactéries ingérées par les asticots**

Après incubation, les larves sont retirées des boîtes et tuées par congélation, et désinfectées encore une fois avec La polyvidone iodée (la Bétadine) pendant 2 min puis lavées deux fois avec du sérum salin et de l'eau physiologique stérile. Les larves sont ensuite trempées pendant 2 min dans de l'éthanol à 70% et rincées à l'eau distillée stérile.

Les extrémités antérieures et postérieures des larves sont coupées, puis une légère pression est appliquée au milieu du corps larvaire pour libérer tout le tube digestif.

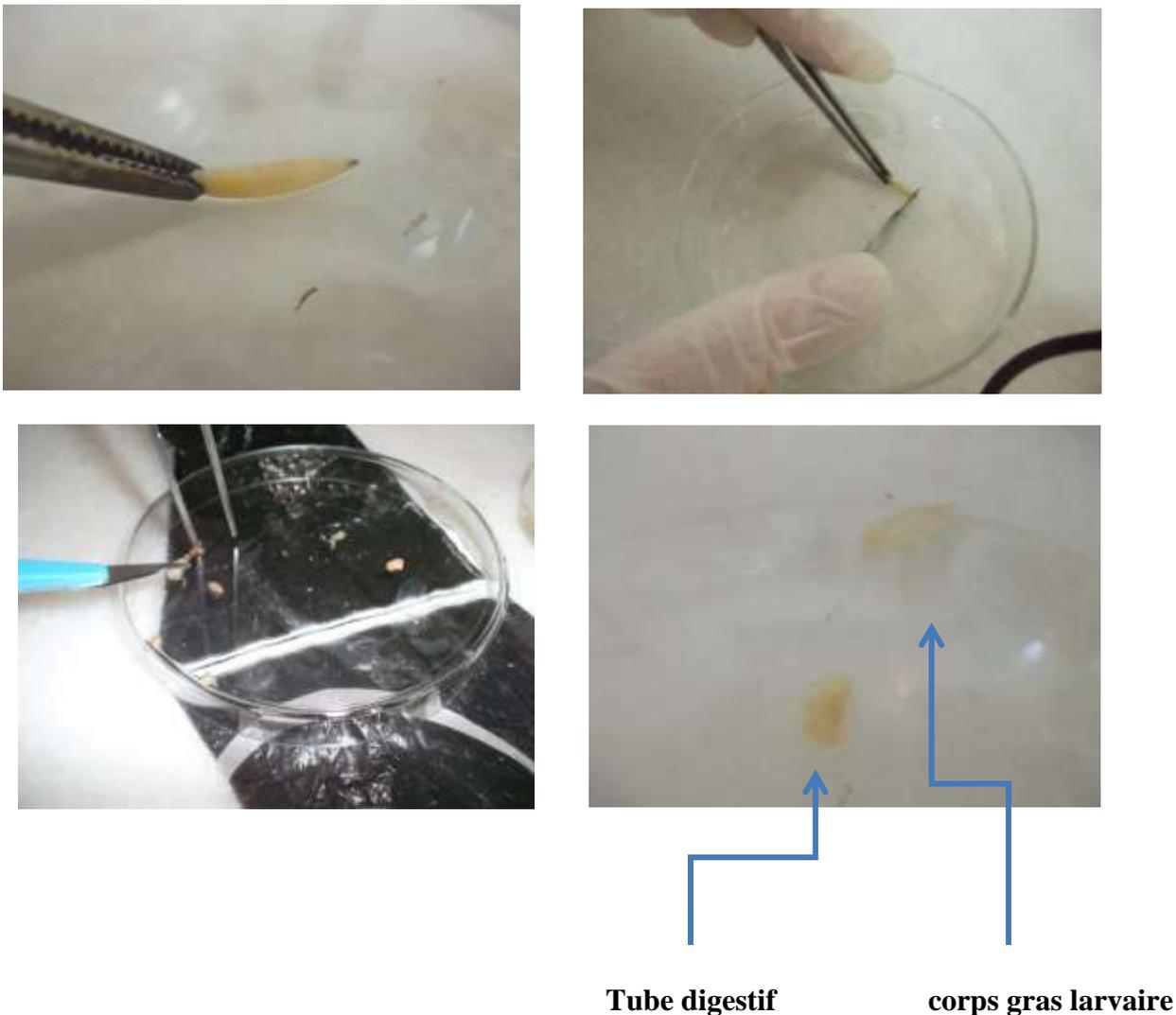


Figure 35 : Différentes étapes de dissection de la larve.

Le tube digestif de chaque larve est recueilli et mélangé avec 50 ml de l'eau distillée stérile, vortexé vigoureusement pendant 3 minutes et 100 μ l de la suspension intestinale estensemencé sur gélose nutritive. Trois boîtes de gélose nutritive ne contiennent aucune croissance bactériennes ont été utilisées comme des témoins. Après une incubation de 24h à 37°C, toute croissance bactérienne est vérifiée (Deshmukh, 2004).



Figure 36: Ensemencement de la suspension intestinale sur la gélose nutritive.

2.3.3. Tests antifongiques

- **Viabilité du champignon ingéré**

Un groupe d'environ de dix larves est transféré sur des milieux Sabouraud ou bien (OGA) inoculés avec l'une des trois souches fongiques utilisées :

Saccharomyces cerevisiae, *Candida albicans* et *Aspergillus niger*.

Trois répétitions ont été utilisées pour chaque souche. Trois boîtes ne contenant aucune croissance microbienne sont utilisées comme témoins. Après incubation pendant 60 minutes à 25 ° C, les larves sont retirées des boîtes et désinfectée avec la même manière que la précédente (test antimicrobien).

Le tube digestif de chaque larve a été recueilli avec la même méthode décrite précédemment. La suspension intestinale estensemencée sur milieu Sabouraud. Après une incubation de deux semaines à 25 °C, la présence des champignons est vérifiée (Deshmukh, 2004).

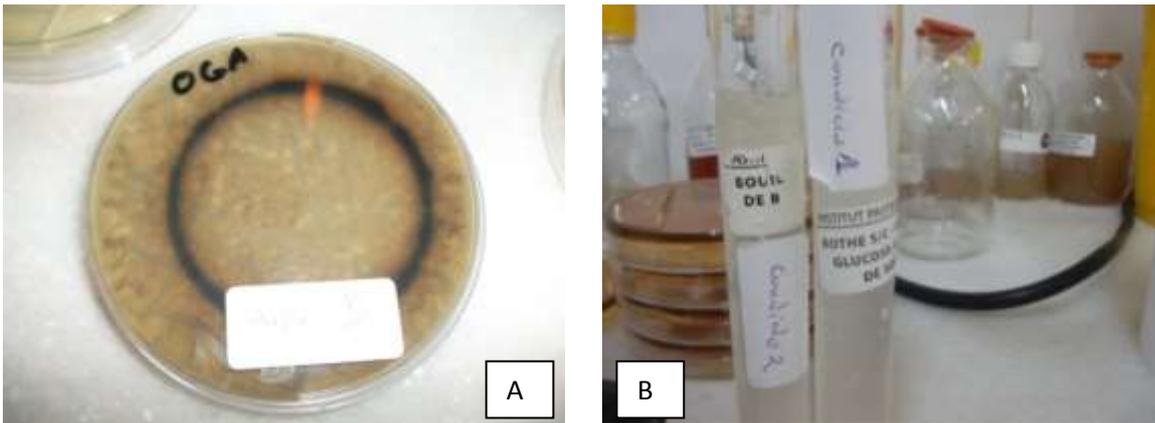


Figure 37 :

A- Contact des larves avec le champignon.

B- Suspension intestinale de *Candida albicans*.

Dans ce chapitre nous avons présenté les différents résultats obtenus durant notre travail pratique.

1. Identification des adultes de *Lucilia sericata* :

Les critères d'identification des adultes de *L. sericata* sont illustrés dans les Figures 38, 39, 40 et 41. Les adultes de cette espèce sont d'une couleur vert métallique. Leur taille varie entre 5 et 8 mm. Le cuilleron thorax ou le calyptère inférieur est d'une couleur claire et n'a pas de poils au dessus (**Figure 39**). Le basicosta a une couleur jaune claire et le tron radial commun n'est pas muni de poils (**Figure 40**). La sélection des femelles a été basée sur le dimorphisme sexuel en observant les yeux ; chez la femelle les yeux présentent un espace entre eux tandis que chez le mal cet espace est absent (**Figure 41**).



Figure 38 : Vue dorsale de *Lucilia sericata* (meigen, 1826) (Diptera : calliphoridae).

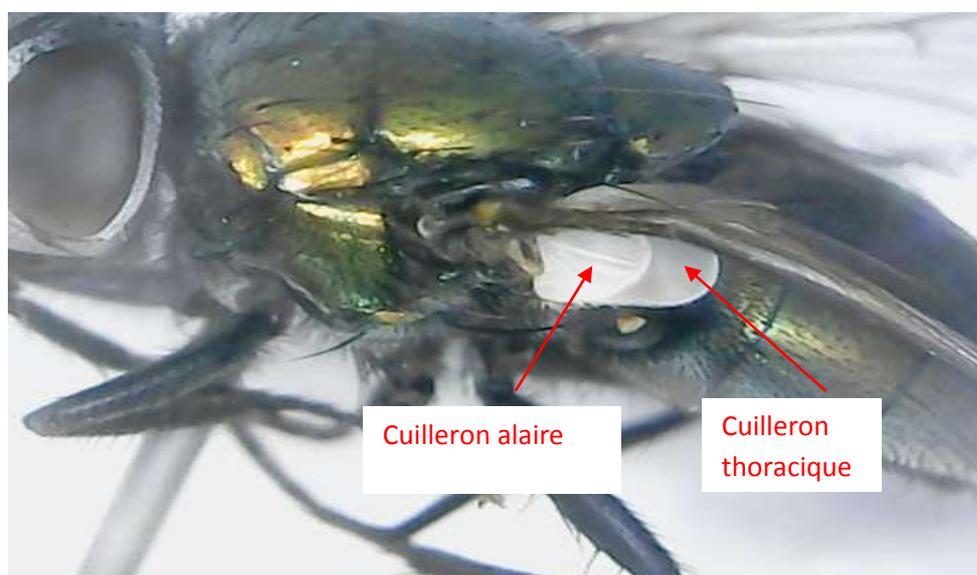


Figure 39 : Cuilleron thoracique de *Lucilia sericata* nu.

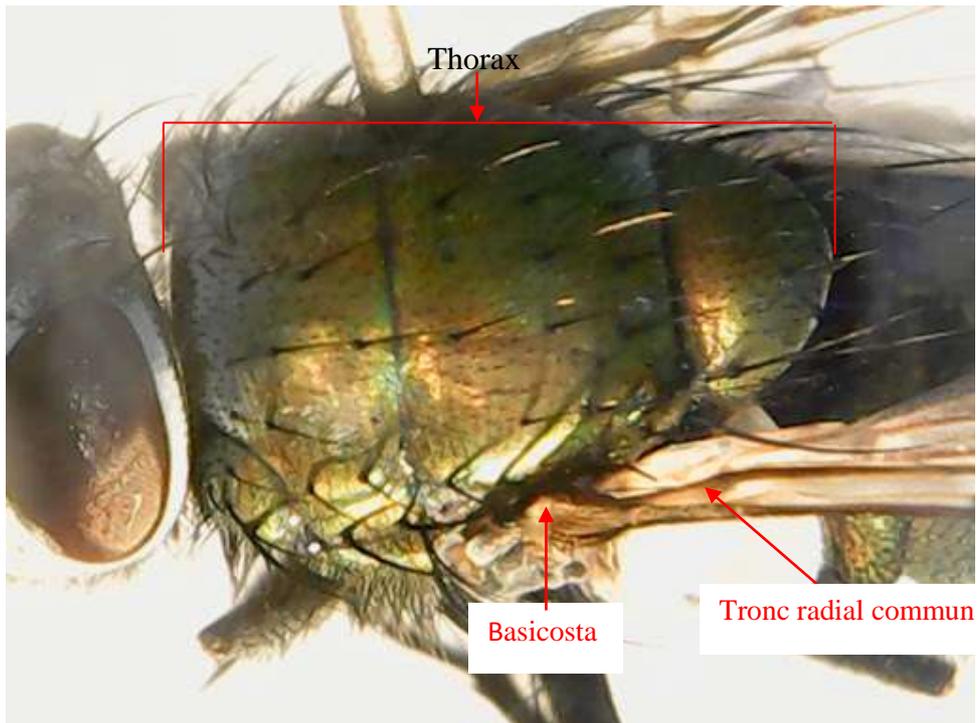


Figure 40 : Thorax de *Lucilia sericata* vert métallique, basicosta jaune pâle et tronc radial nu.



Figure 41 : Dimorphisme sexuel retrouvé chez la mouche adulte *Lucilia sericata*.
(A) Absence de l'espace entre les yeux composés d'un mâle de *Lucilia sericata*.
(B) Présence de l'espace entre les yeux composés d'une femelle de *Lucilia sericata*.

2. Désinfection des œufs :

Un nombre de 130 œufs ont été désinfectés avec la solution de dakin (Dakin) et l'Hexamidine transcutanée (Isoméline).

Concernant les œufs traité par la solution de dakin (Dakin), dans la gélose au sang, quatre œufs parmi les six ont éclos dans la première boîte, 6 œufs /10 dans la boîte (2) et 3 œufs /10 dans la troisième boîte. En outre, dans la gélose nutritive, aucune éclosion n'a eu lieu dans la première boîte, par contre, 2 œufs /10 et 3 œufs/10 ont éclos dans la 2^e et la 3^e boîte respectivement.

Le deuxième antiseptique manipulé : l'Hexamidine transcutanée (Isoméline), cinq œufs parmi 10 ont éclos dans la 1^{ère} et la 2^{ème} boîte , mais dans la 3^{ème} boîte seulement 3 œufs ont éclos, ces résultats ont été marqué dans la gélose au sang.

En revanche, la gélose nutritive 2 œufs /10 ont éclos dans la 1^{ère} boîte, 4 œufs /10 dans la boîte 2 et qu'un seul œuf éclos dans la 3^{ème} boîte

Enfin, le témoin de gélose au sang a marqué 4 œufs/5 ont été éclos et 3 œufs / 5 dans le témoin de la gélose nutritive.

Le **tableau 1** résume les résultats obtenus dans cette désinfection.

Tableau 1 : Nombre des œufs éclos après désinfection avec la solution de dakin (Dakin) ® et l'Hexamidine transcutanée (Isoméline) ®.

Antiseptique 10%	Solution de dakin (Dakin)		Témoin		Hexamidine transcutanée(Isoméline)	
	Gélose Au sang	gélose nutritive	Gélose Au sang	gélose nutritive	Gélose Au sang	gélose nutritive
Boîte 1	4	Pas d'éclosion	4	3	5	2
Boîte 2	6	2	/		5	4
Boîte 3	3	3			3	1

Le taux d'éclosion est élevé dans le milieu de culture gélose au sang par rapport à la gélose nutritive quelque soit l'antiseptique utilisé (**Figure 42**).

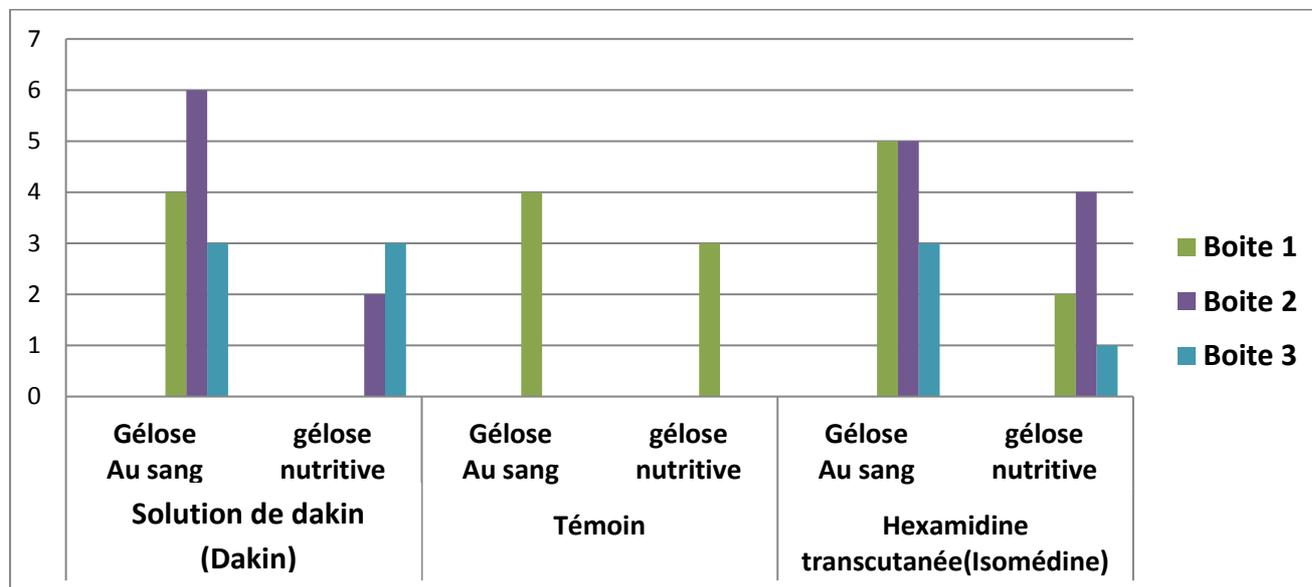


Figure 42: Nombre des œufs éclos après désinfection avec la solution de dakin (Dakin)[®] et l'Hexamidine transcutanée (Isoméline)[®].

Tableau 2 : Nombre des œufs non éclos après désinfection avec la solution de dakin (Dakin) et l'Hexamidine transcutanée (Isoméline)[®].

Antiseptique 10%	Solution de dakin (Dakin)		Témoin		Hexamidine transcutanée(Isoméline)	
	Gélose Au sang	gélose nutritive	Gélose Au sang	gélose nutritive	Gélose Au sang	gélose nutritive
Boite 1	6	10	1	2	5	8
Boite 2	4	8			5	6
Boite 3	7	7			7	9

Les résultats représentés dans le **tableau 2** ont montré que dès la désinfection par l’ solution de dakin (Dakin), 56,66% d’œufs n’ont pas éclos dans la gélose au sang et 83,33% dans la gélose nutritive ., contrairement dans le traitement par l’Hexamidine transcutanée (Isoméidine), 56,66% des œufs n’ont pas éclos dans la gélose au sang et 76,66% dans la gélose nutritive ces résultats ont suggéré que la gélose au sang représente un milieu de culture favorable à l’éclosion des œufs.

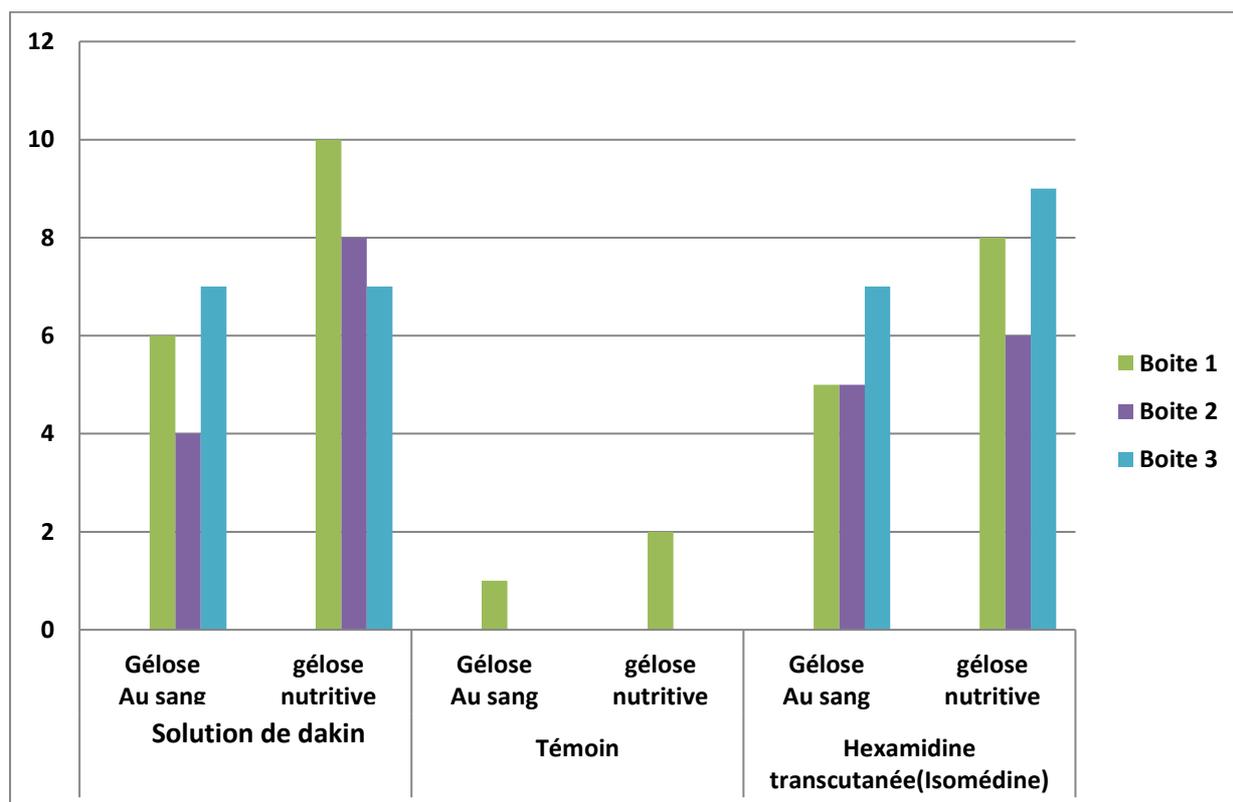


Figure 43 : Nombre des œufs morts après désinfection avec l’Solution de dakin (Dakin) et l’Hexamidine transcutanée (Isoméidine) ®.

Le nombre d’œufs non éclos dans la désinfection par la solution de dakin (Dakin), est de 70% mais les œufs traités par l’ Hexamidine transcutanée (Isoméidine) a révélé que 66,66% d’œufs n’ont pas éclos.Le taux de mortalité des œufs est exprimé en **tableau 3**.

Tableau 3 : Taux de mortalité des œufs de *L.sericata* traités par l' Solution de dakin (Dakin) et l'Hexamidine transcutanée(Isoméline).

	Nombre d'œufs éclos	Nombre d'œufs non éclos	Total	Taux de mortalité (%)
Œufs traités par la solution de dakin (Dakin)	42	18	60	30
Œufs traités par Hexamidine transcutanée(Isoméline)	40	20	60	33,33
Témoins	7	3	10	30
Total	89	36	130	

Le taux de mortalité des œufs stérilisés avec la solution de dakin (Dakin) et les témoins est de 30%. En revanche, l' Hexamidine transcutanée (Isoméline) a donné un taux de mortalité de 33,33% .

Les œufs incubés dans la gélose au sang éclosent mieux que dans la gélose nutritive. Les Résultats obtenus après 48h sont donnés dans le **tableau 4** (les œufs ont éclos en larve du 1^{er} stade). Le produit solution de dakin (Dakin) a montré qu'après 48 h d'incubation, 3 / 4 larves ont été survies dans la première boite , 2 / 6 larves dans la boite (2) et 1 / 3 larves dans la boite (3) mettant en gélose au sang Concernant la gélose nutritive, aucune éclosion n'a été enregistré dans la première boite, 2/2 larves vivantes dans la 2^{ème} boite et aucune larve vivante n'a été notée dans la 3^{ème} boite à cause de contamination.

En revanche, trois larves traitées par l'Hexamidine transcutanée (Isoméline) en gélose au sang parmi cinq larves sont vivantes dans la première boite, 4 / 5 larves dans la deuxième boite et toutes les larves ont été survvenues (3 / 3) dans la boite (3)

Pour ce qui est des boites contenant la gélose nutritive, la mortalité des larves a été observée dans la première et la deuxième boite et seulement une seule larve vivante a été notée dans la troisième boite. Pour les témoins, 4 / 4 larves vivantes ont été enregistré dans la gélose au sang et 2 / 3 larves en gélose nutritive.

Tableau 4 : Nombre de larves L1 vivant dans chaque boîte après 48h de traitement.

Antiseptique 10%	Solution de dakin (Dakin)		Témoin		Hexamidine transcutanée(Isomé dine)	
	Gélose Au sang	gélose nutritive	Gélose Au sang	gélose nutritive	Gélose Au sang	gélose nutritive
Boite 1	3	0	4	2	3	0
Boite 2	2	2	/		4	0
Boite 3	1	0 à cause d'une contamination environnementale			3	1
Total	8		6		11	

Tableau 5 : Nombre de larves L1 mortes dans chaque boîte après 48h de traitement.

Antiseptique 10%	Solution de dakin (Dakin)		Témoin		Hexamidine transcutanée(Isomé dine)	
	Gélose au sang	Gélose nutritive	Gélose au sang	Gélose nutritive	Gélose Au sang	Gélose nutritive
Boite 1	1	0	0	1	2	2
Boite 2	4	0	/		1	4
Boite 3	2	0			3	0
Total	7		1		12	

Selon les résultats requis en **tableau 4** et **5**, la 3^{ème} boîte traitée avec l'Solution de dakin (Dakin) en gélose nutritive a été contaminée, cette dernière est due probablement à l'étuve de

laboratoire qui été contaminée. Aucune mortalité des larves n'a été constaté dans le lot témoin en gélose au sang . Cependant, en gélose nutritive, une seule larve morte a été noté parmi les 4.

l'Hexamidine transcutanée (Isoméidine), a présenté un nombre élevé de larves mortes dans la gélose nutritive que dancomparativement à la gélose au sang.

Tableau 6 : Taux de mortalité des larves L1 de *L.sericata* après 48h d'incubation.

	Nombre de larves vivantes	Nombre de larves non vivantes	Total	Taux de mortalité (%)
Larves traités par la solution de dakin (Dakin)	8	7	15	46,66
larves traités par Hexamidine transcutanée(Isoméidine)	11	12	23	52,17
Témoins	6	1	7	14,29
Total	25	20	35	

Le taux de mortalité des larves traitées par la solution de dakin (Dakin) est de 46,66% , tandi que chez les larves désinfectées par l'Hexamidine transcutanée (Isoméidine) ce taux est de 52,17% de mortalité contre 14,29% chez les témoins.Selon les **tableaux 3 et 6**, le traitement des œufs ou les larves par l'Hexamidine transcutanée (Isoméidine), a révélé un taux de mortalité le plus élevé que les témoins et chez les sujets traités par la solution de dakin (Dakin).

Tableau 7 : Nombre de larves survivant après 72h d'incubation.

Antiseptique 10%	Solution de dakin (Dakin)		Témoin		l'Hexamidine transcutanée (Isoméline)	
	Gélose Au sang	gélose nutritive	Gélose Au sang	gélose nutritive	Gélose Au sang	gélose nutritive
Boite 1	3	0	4	2	3	0
Boite 2	2	2	/		4	0
Boite 3	1	0 à cause d'une contamination environnementale			3	1

Après 72h d'incubation, les larves ont augmenté de taille et aucune mortalité n'a été enregistrée. Nous avons refait cette manipulation mais cette fois ci on a traité les œufs avec les 3 produits.

Un nombre de 184 œufs a été obtenu. Dans chaque boite de gélose au sang, 10 œufs ont été placés. Le choix de ce milieu était basé sur le fait qu'il donne des résultats satisfaisants par rapport à la gélose nutritive. Chaque boite a été répliquée deux fois.

Tableau 8 : Nombre des œufs éclos après 24h.

Antiseptique 10%	solution de dakin (Dakin)	l'Hexamidine transcutanée (Isoméline)	La polyvidone iodée (Bétadine)	Témoin
Boite 1	4	3	8	7
Boite 2	5	4	7	/
Total	9	7	15	7

Tableau 9 : Nombre des œufs non éclos après 24h.

Antiseptique 10%	solution de dakin (Dakin)	l'Hexamidine transcutanée (Isoméline)	La polyvidone iodée (Bétadine)	Témoin
Boite 1	6	7	2	3
Boite 2	5	6	3	/
Total	11	13	5	3

Les **tableaux 8 et 9** montrent que les œufs désinfectés avec la polyvidone iodée (Bétadine) sont presque tous ont éclos : 8 œufs éclos /10 dans la première boîte et 7 œufs éclos /10 dans la 2^{ème} boîte par rapport aux autres antiseptiques

Avec l'Hexamidine transcutanée (Isoméline), 3 œufs /10 ont éclos dans la 1^{ère} boîte et 4 œufs /10 ont éclos dans la seconde boîte 2.

Et pour l'solution de dakin (Dakin) : 4 œufs éclos parmi 10 dans la 1^{ère} boîte et 5 œufs /10 dans la 2^{ème}. En revanche, 7 œufs sur 10 ont éclos dans le lot témoin .

Tableau 10 : Taux de mortalité des œufs de *L.sericata* désinfectés par les 3 produits après 24h d'incubation.

	Nombre d'œufs éclos	Nombre d'œufs non éclos	Total	Taux de mortalité (%)
Œufs traités par Solution de dakin (Dakin)	9	11	20	55
Œufs traités par Hexamidine transcutanée(Isoméline)	7	13	20	65
Œufs traités par la polyvidone iodée (Bétadine)	15	5	20	25
Témoin	7	3	10	42,85
Total	41	32	70	

Tableau 11: Nombre de larves L1 désinfectées vivantes et mortes après 48h d'incubation.

Antiseptique 10%	Solution de dakin (Dakin)		l'Hexamidine transcutanée (Isoméline)		La polyvidone iodée (Bétadine)		Témoin	
	Larves vivantes	Larves mortes	Larves vivantes	Larves mortes	Larves vivantes	Larves mortes	Larves vivantes	Larves mortes
Boîte 1	3	1	2	1	7	1	5	2
Boîte 2	3	2	1	3	7	0		
Total	6	3	3	4	14	1	5	2

Selon le **tableau 11**, le nombre de larves du 1^{er} stade vivantes désinfectées par la Polyvidone iodée (Bétadine) : 7 larve /10 (boîte 1^e) et 7 larves /7 (boite 2) est élevé par rapport à celles désinfectées par l' solution de dakin (Dakin) : 3 larves vivantes sur 4 dans la boîte 1^e , 3 larves vivantes sur 5 dans la 2^{eme} boîte. Avec l' l'Hexamidine transcutanée (Isoméidine) : 2 larves vivantes / 3 et une seule larve vivante parmi 4 (**Figure 44**).

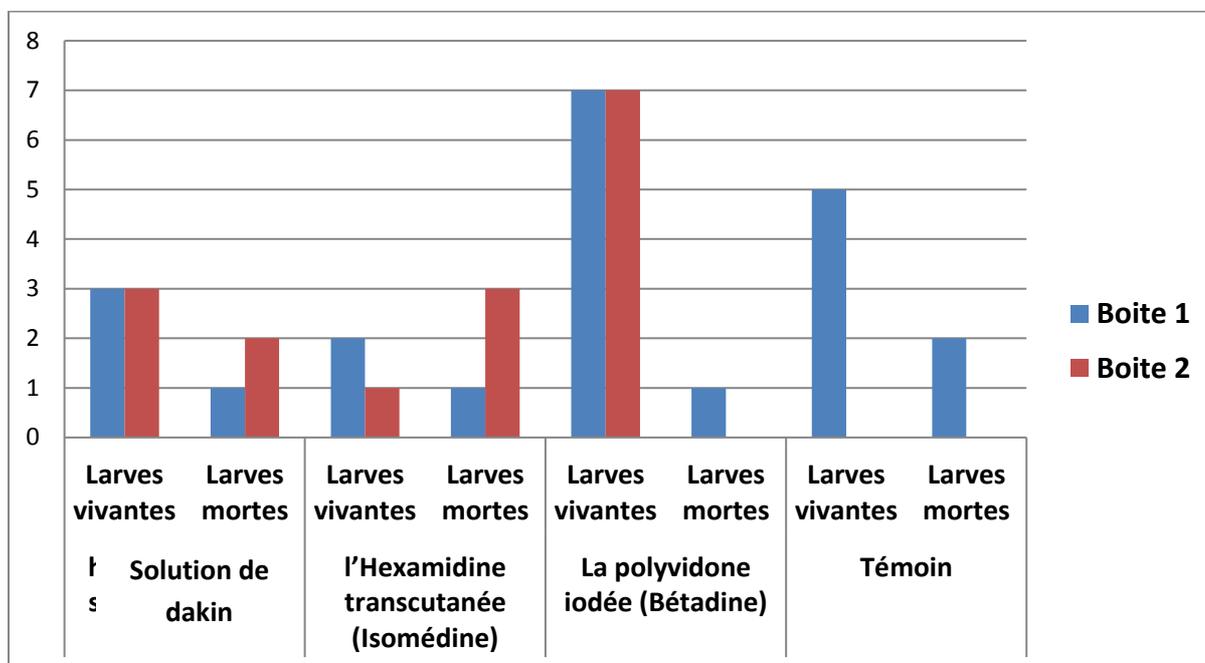


Figure 44 : Nombre de larves L1 désinfectées vivantes et mortes.

Le taux de mortalité des larves désinfectées par les 3 produits après 48h est exprimé dans le **tableau 12**.

Tableau 12 : Le taux de mortalité des larves désinfectées par les 3 produits après 48h.

	Nombre de larves vivantes	Nombre de larves non vivantes	Total	Taux de mortalité (%)
Larves traités par Solution de dakin (Dakin)	6	3	9	33,33
Larves traités par Hexamidine transcutanée(Isoméidine)	3	4	7	57,14
Larves traités par la polyvidone iodée (Bétadine)	14	1	15	6,66
Témoin	5	2	7	28,57
Total	28	10	38	

Les larves traitées par la la polyvidone iodée (Bétadine) ont montré un taux de mortalité de 6,66% . Ce taux est plus faible par rapport aux larves traités par la solution de dakin (Dakin) de 33,33% et le témoin avec 28,57%.

l'Hexamidine transcutanée (Isoméline) a donné par contre le taux le plus élevé avec 57,14%.

Tableau 13 : Nombre de larves vivantes et mortes après désinfection après 72h d'incubation.

Antiseptique 10%	Solution de dakin (Dakin)		l'Hexamidine transcutanée (Isoméline)		La polyvidone iodée (Bétadine)		Témoin	
	Larves vivantes	Larves mortes	Larves vivantes	Larves mortes	Larves vivantes	Larves mortes	Larves vivantes	Larves mortes
Boîte 1	2	2	2	1	7	1	5	2
Boîte 2	3	2	0	4	7	0		
Total	5	4	2	5	14	1	5	2

Les larves traitées par La polyvidone iodée (Bétadine) restent presque toutes vivants excepté une seule mortalité dans la boîte 2. Dans les boîtes traitées par la solution de dakin (Dakin), nous avons noté 4 larves mortes, et un nombre de 4 larves désinfectées par l'Hexamidine transcutanée (Isoméline) mortes ont été comptées dans les deux répliquas.

Tableau 14 : Taux de mortalité des larves traitées par les trois antiseptiques après 72h d'incubation.

	Nombre de larves vivantes	Nombre de larves non vivantes	Total	Taux de mortalité (%)
Larves traités par Solution de dakin (Dakin)	5	4	9	44,44
Larves traités par Hexamidine transcutanée(Isoméline)	2	5	7	71,42
Larves traités par la polyvidone iodée (Bétadine)	14	1	15	6,66
Témoin	5	2	7	28,57
Total	26	12	39	

Nous avons observé presque les mêmes résultats obtenus en **tableau 12** : 6,66% des larves traitées par la polyvidone iodée (Bétadine) sont mortes, 28,57% de mortalité a été enregistré

chez les larves non désinfectées (témoins), pour les larves traitées par l'Hexamidine transcutanée (Isoméline) un taux de mortalité de 71,42 à été enregistré et un taux de 44,44% de larves traitées par la Solution de dakin (Dakin) sont mortes.

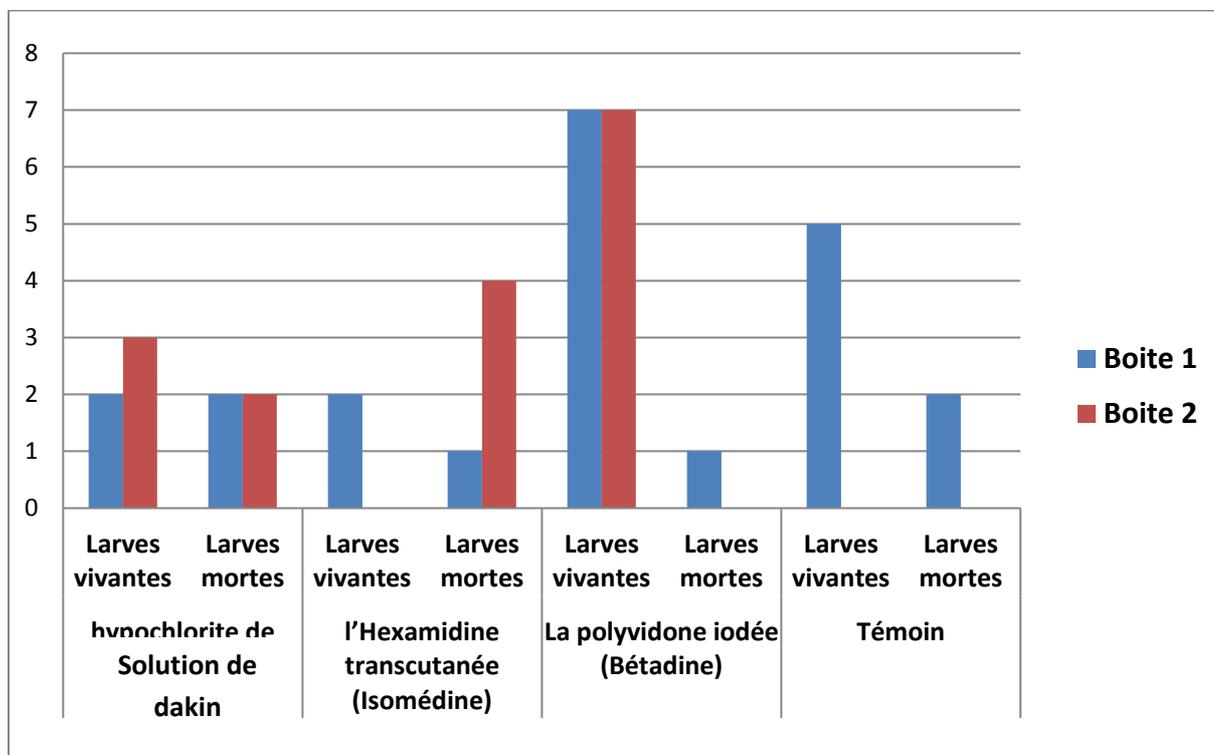


Figure 45 : Nombre de larves L1 vivantes et mortes après désinfection.

D'après les résultats obtenus en **tableau 14** et la **figure 45**, la polyvidone iodée (Bétadine) a donné une bonne désinfection des œufs par rapport à l'Solution de dakin (Dakin) et l'Hexamidine transcutanée (Isoméline).

3. Désinfection des larves

Le résultat de la désinfection après 24h d'incubation est résumée dans le **tableau 15**.

Tableau 15 : nombre de larves survivantes.

	La polyvidone iodée (Bétadine)				Témoin	
	Gélose nutritive		Gélose au sang		Gélose au sang	
Milieu de culture	vivant	mort	vivant	mort	vivant	mort
Boite 1	8	2	10	0	10	0
Boite 2	9	1	8	2	/	
contamination	absence		absence		absence	
Total	20		20		10	
Taux de mortalité %	15		10		0	

Le tableau 15 montre que le taux de mortalité est très faible dans toutes les boîtes avec absence de contamination . Le taux de mortalité chez les larves mises en gélose au sang (10%) est faible comparativement à celles en gélose nutritive (15%), la gélose au sang présente un milieu de culture favorables aux larves. Après 48h , les larves grandissent rapidement dans la gélose au sang en se nourrissant du milieu de culture (tableau 15).

Tableau 16 : Etat de larves après 48h d'incubation.

Antiseptique	La polyvidone iodée (Bétadine)				Témoin	
	Gélose nutritive		Gélose au sang		Gélose au sang	
Milieu de culture	vivant	mort	vivant	mort	Vivant	mort
Boite 1	6	4	9	1	7	3
Boite 2	8	2	8	2	/	
Total	14	6	17	3	7	3
Taux de mortalité %	30		15		30	

Après 72h d'incubation , les boîtes ne présentent aucune contamination et les larves restent vivantes pendant leur incubation.



Figure 46 : Larves de *L.sericata* traitées avec la polyvidone iodée (Bétadine) dans la gélose au sang après 72h d'incubation.

4. Test anti bactérien

Les figures suivantes expliquent la mise en place des larves de *L.sericata* en contact avec les souches bactériennes.



Figure 47 : Mise en place des asticots sur les souches bactériennes.

Après 24 h de contact des asticots de *L. sericata* et la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, une différence de couleur entre le centre et le pourtour de la boîte a été constaté (couleur verte des colonies de *P. aeruginosa* dans le pourtour) (**Figure 48**) . Les colonies bactériennes ont été également inhibées dans le centre de toutes les autres boîtes (**Figure 49, 50, 51, 52 et 53**).

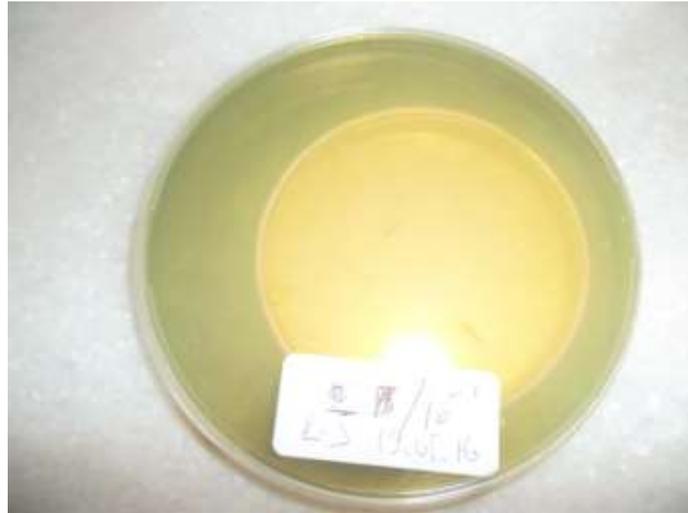


Figure 48: Effet antibactérien des asticots de *L. sericata* sur *Pseudomonas aeruginosa* après 24h.



Figure 49 : Effet antimicrobien des asticots de *L. sericata* sur *Escherichia coli* après 24h.



Figure 50: Effet des asticots de *L.sericata* sur *Staphylococcus aureus* après 24h.

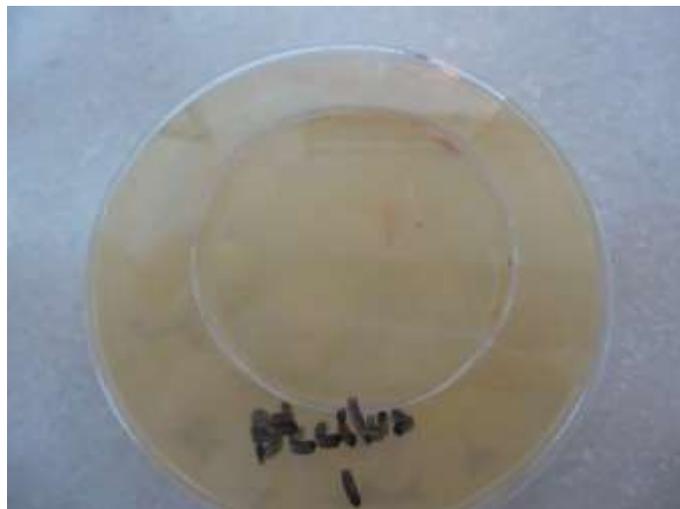


Figure 51: Effet des asticots de *L.sericata* sur *Bacillus subtilis* après 24h.



Figure 52 : Effet des asticots de *L.sericata* sur *Klebsiella pneumoniae* après 24h.



Figure 53: Effet des asticots de *L.sericata* sur *Citrobacter freundii* après 24h.

Tableau 17 : Résultats du test antimicrobien sur des souches bactériennes.

Souche	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus subtilus</i>		<i>Klebseilla pneumoniae</i>		<i>Citrobacter freundii</i>	
	Vivante	Morte	Vivante	Morte	Vivante	Morte	Vivante	Morte	Vivante	Morte	Vivante	Morte
Nombre de larve	24	16	28	4	16	25	17	18	30	2	25	6
total	40		32		41		35		32		31	
Taux de mortalité %	40		12,5		72		51,43		6,25		19,35	

D'après les résultats obtenus mentionnés dans le **tableau 17** un taux de mortalité très faible avec 12,5% , 6,25% et 19,35% a été enregistré dans le contact des asticots de *L.sericata* avec les souches bactériennes suivantes : *Escherichia coli* , *Klebseilla pneumoneae* et *Citrobacter freundii* respectivement. En revanche, , un taux de mortalité de 40% a été noté pour la souche *Pseudomonas aeruginosa*, , 72% pour la souche *Staphylococcus aureus* et finalement 51,43% de mortalité pour *Bacillus subtilus*. Les larves vivantes sont déposées par la suite dans la gélose au sang pendant 24h à 37°C afin de laisser le temps au tube digestif de bien digérer la bactérie.

Les bactéries âgées de 48h ont été incubées à nouveau après retirer toutes les larves pour vérifier la croissance bactérienne.

Tableau 18 : Etat des larves déposées sur gélose au sang après 24h de digestion des bactéries.

Souche	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Klebseilla pneumoniae</i>		<i>Citrobacter freundii</i>	
	Vivante	Morte	Vivante	Morte	Vivante	Morte	Vivante	Morte	Vivante	Morte	Vivante	Morte
Nombre de larve	24	16	28	4	16	25	17	18	30	2	25	6
Total	40		32		41		35		32		31	
Taux de mortalité %	40		12,5		72		51,43		6,25		19,35	

Après 24h d'incubation à 37°C, aucune croissance bactérienne n'a été notée dans les boites.

5. Dissection des larves

Après incubation des larves, les boites ont été vérifiées après 24h :



Figure 54 : Témoin négatif utilisé pour vérifier la présence des contaminations.



Figure 55 : Résultats de l'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *klebseilla pneumoniae*

Aucune croissance bactérienne n'a été remarquée pour la suspension intestinale contenant la souche *klebseilla pneumoneae* (**figure 55**).



Figure 56 : Résultats de l'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *Bacillus subtilis*.

Une contamination très claire a été remarquée dans les boites d'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *Bacillus subtilis*.



Figure 57 : Résultats de l'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *Staphylococcus aureus*.

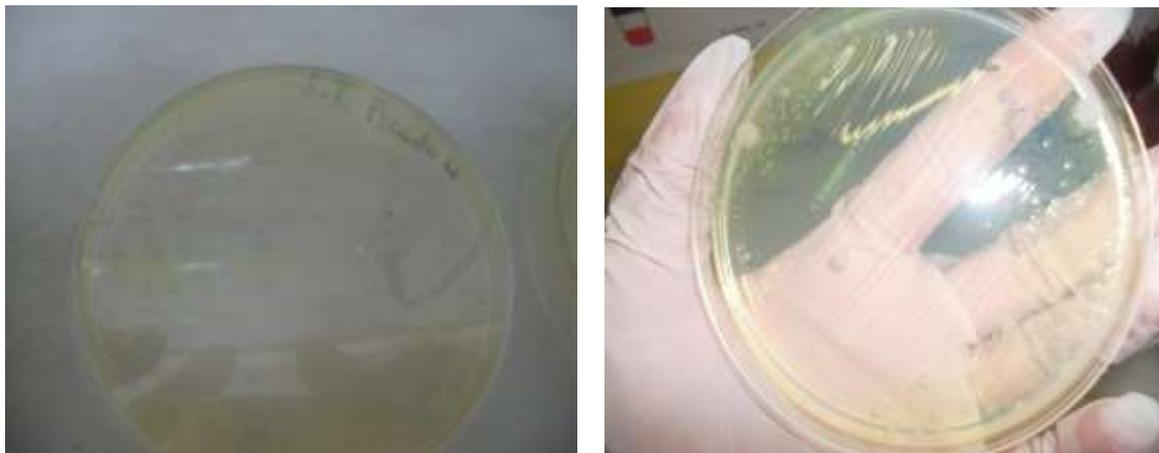


Figure 58 : Résultats de l'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *Pseudomonas aeruginosa*

Une absence de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* a été notée sur les boites (Figure 58).



Figure 59 : Résultats de l'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *Citrobacter freundii*.

Aucune contamination n'a été observée dans les boîtes de l'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *Citrobacter freundii* (**Figure 59**).

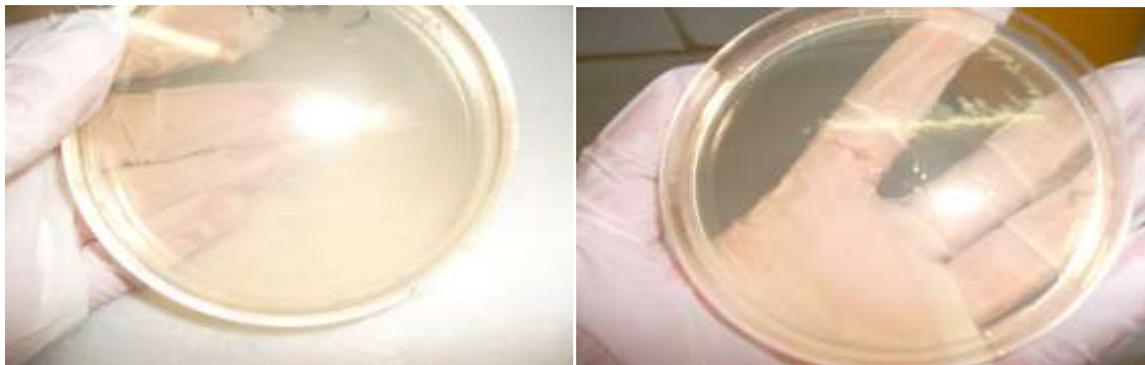


Figure 60: Résultats de l'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *Escherichia coli*.

Absence de contamination observée dans les boîtes de l'ensemencement de la suspension intestinale contenant la souche *Escherichia coli*.

Tableau 19 : Récapitulatif des résultats de l'ensemencement du tube digestif sur gélose nutritive après 24h d'incubation.

	Ensemencement du tube digestif sur gélose nutritive									Témoin	
Souche bactérienne	<i>Klebseilla pneumoniae</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Bacillus subtilis</i>				
Nombre de répliqua	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2
contamination	Absence de contamination	Absence de contamination	Contaminé (<i>Bacillus Subtilis</i>)	contaminé			contaminé			Absence de contamination	Absence de contamination

Tableau 20 : Récapitulatif des résultats de l'ensemencement du tube digestif sur gélose nutritive après 24h d'incubation (suite).

	Ensemencement du tube digestif sur gélose nutritive									Témoin	
Souche bactérienne	<i>Citrobacter freundii</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Escherichia coli</i>				
Nombre de répliqua	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2
Contamination	Absence de contamination			contaminé			Absence de contamination			Absence de contamination	

Aucune contamination n'a été observée pour les trois souches suivantes : *E.coli*, *citrobactère fondii* et *klebseilla pneumoniae*, ce qui explique, l'effet bactéricide de ces bactéries par les asticots de *L. sericata*.

D'autre part, une contamination a été marquée pour *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*.

6. Test antifongique

Pour ce qui du test antifongique,

Aucune mortalité n'a été enregistré chez les larves après 60 min d'incubation en contact direct avec les souches fongiques testées (**Tableau 21**).

Tableau 21: Résultats obtenus après 60 min d'incubation des larves de *L.sericata* en contact avec les souches fongiques testées.

Souche bactérienne	Souches fongiques									Témoin	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			<i>Candida albicans</i>			<i>Aspergillus niger</i>				
Nombre de répliqua	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2
Nombre de larves vivantes	9/9	8/8	9/9	10/10	10/10	10/10	9/9	9/9	8/8	10/10	10/10

7. Dissection des larves déposées en contact avec les souches fongiques testées

Tableau 22 : Résultats obtenus de l'ensemencement du tube digestif sur milieu sabouraud après une semaine d'incubation.

Souche bactérienne	Ensemencement du tube digestif sur milieu sabouraud									Témoin	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			<i>Candida albicans</i>			<i>Aspergillus niger</i>				
Nombre de répliqua	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2
Contamination	Absence de contamination			Absence de contamination			Absence de contamination			Absence de contamination	

Après incubation d'une semaine, aucune contamination n'a a été mentionnée pour les trois souches fongiques *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* et *Aspergillus niger* dans les trios répliquas.

Le travail réalisé dans le cadre de ce mémoire comporte deux parties : la première consiste à capturer et identifier *L. sericata* sur des appâts de foie de volaille, et la deuxième partie consiste à tester le pouvoir antimicrobien de cette espèce.

L. sericata a été identifiée parmi les premiers colonisateurs des cadavres en Algérie (Taleb, 2013 ; Taleb et al., 2015 ; Taleb et al., 2016). Elle est très fréquente sur les cadavres humain et a été capturées dans plusieurs régions en Algérie durant toute les saison (Taleb et al., 2015). Ces observations sont similaires à nos résultats de capture et d'identification des Diptères nécrophages sur les appâts de foie. L'abondance de cette espèce constitue un avantage pour son utilisation en biothérapie.

Concernant la désinfection des œufs et des larves L1 de *L. sericata*, nos résultats montrent que la polyvidone iodée (Bétadine) est le meilleur produit de désinfection par rapport à la solution de dakin (Dakin). Le taux de mortalité avec ce dernier était 33,33% après 48h d'incubation et 44,44% après 72h. Pour, l'Hexamidine transcutanée, a un taux de mortalité de 57,14% de a été marqué après 48h d'incubation et 71,42% après 72h. Lors d'utilisation de la polyvidone iodée (Bétadine) le taux de mortalité était faible : 6,66% durant toutes les périodes d'incubation.

Le but de la partie d'étude de l'effet antibactérien vise à tester le pouvoir antibiotique des asticots de *Lucilia sericata* contre les souches bactériennes suivantes :

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii* et *Klebsiella pneumoniae*.

Après 24 h de contact des asticots de *L. sericata* nous avons constaté la disparition des colonies dans la zone d'application des larves et leur persistance dans le pourtour de la boite. Cela prouve que les asticots étaient capables d'avaler les colonies bactériennes.

Néanmoins, un taux de mortalité a été observé dans les boites de *Pseudomonas aeruginosa* 40%, *Bacillus subtilis* 15,43%, *Citrobacter freundii* 19,35, *Klebsiella pneumoniae* 6,25%, *Staphylococcus aureus* 72% et *Escherichia coli* 12,25%. Cela peut être du à la charge bactérienne élevée par rapport à l'effectifs des larves présentes sur les boites.

Concernant l'ensemencement des boites avec les suspensions intestinales des larves, aucune croissance bactérienne n'a été observée dans les boites de *Citrobacter freundii* et

Escherichia coli. En revanche, des colonies de *Bacillus subtilis* ont été notées sur toutes les boîtes de cette souche. Cela peut être due à une contamination environnementale du milieu par cette bactérie ou à la non élimination de cette dernière par les asticots. Les boîtes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* ne présentaient pas une recroissance de la souche bactérienne ingérée par les larves mais elles ont été contaminées par *Bacillus subtilis*.

Ces résultats suggèrent que ces bactéries ont été détruites dans le tube digestif des asticots.

Cette activité anti-bactérienne a également fait l'objet d'études *in vitro* desquelles il ressort que des asticots vivants stérilisés sont déposés sur de certaines variétés de bactéries pathogènes.

Notre résultat est similaire avec celui obtenu par Toussaint (2008) et Pöppel et al. (2015). Contrairement à Clavel (2015) et Thomas (1999) qui ont montré que ces larves ne présentaient aucune action contre *Escherichia coli*.

Nos observations montrent une action des larves vis-à-vis *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par (Steenvoorde, 2007) et (Thomas,1999). Ces auteurs ont montré que les larves étaient capables de détruire les bactéries à Gram positive comme *Staphylococcus aureus* à Gram négative comme *Pseudomonas aeruginosa*.

Bonn (2000) a signalé que Thomas (1999) a trouvé *in vivo*, de l'ammoniac dans les sécrétions qui en augmentant le pH de la plaie participerait à l'effet antimicrobien, ainsi que des agents naturels antibactériens (antibiotiques-like) ont été notées dans d'autres publications (Kennedy et Trich,1997 ; Reames et al.,1998).

Quand aux tests antifongiques, le taux de mortalité des larves après un contact de 60 min était nul. Ce qui signifie que les larves ont toléré la présence de *Conidida. albicans*, *Aspergillus niger* et *Saccharomyces cerevisiae* dans leur tube digestif. De plus, les suspensions intestinales des larves incubées pendant une semaine sur le milieu Sabouraud ne présentaient aucune croissance fongique. Ces résultats suggèrent que les asticots ont détruit ces souches fongiques.

Peu d'auteurs ont testé le pouvoir antifongique des larves de *L. sericata*. Dans une étude réalisée in-vitro par Alnaimat et al. (2013), les auteurs ont montré une activité des larves de *L. sericata* vis-à-vis de *Trycophyton terrestre* et *Saccharomyces cerevisiae*. Ils ont également trouvé que les souches fongiques ingérées par les larves ont été tuées dans leur tube digestif. Ces résultats concordent avec nos observations.

La mouche *L. sericata*, mieux connue sous le nom de « mouche verte de la viande », est actuellement utilisée en larvothérapie qui est reconnue depuis plusieurs siècles. Ses larves sont élevées dans des conditions particulières d'asepsie. Les asticots de *L. sericata* sont utilisés pour leur action bactéricide et fongicide sur la détersion des plaies vis-à-vis des souches résistantes aux antibiotiques.

L. sericata est très fréquentes avec des effectifs élevés sur les pièges pendant toute la période d'étude.

Concernant la stérilisation des œufs et des larves, la polyvidone iodée (Bétadine) est le meilleur produit qui a donné un taux de mortalité faible (6,66%).

Un total de six souches bactériennes ont été utilisées pour tester l'action bactéricide des larves de *L. sericata*. Nos résultats ont montrés que ces dernières sont capables de tuer *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii* et *Klebsiella pneumoniae*.

Les résultats obtenus des tests antifongiques ont été satisfaisants. Les trois champignons *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* et *Aspergillus niger* ont été tués par les larves de *L. sericata*.

Au cours de ce travail, nous avons pu constater l'intérêt potentiel de la larvothérapie dans le traitement de différents types de plaies. Les sécrétions des larves peuvent également être utilisées pour la production des antibiotiques naturels. Pour ce fait, des études prolongées sur le pouvoir antimicrobien vis-à-vis des souches résistantes peuvent être réalisées. De plus, il serait intéressant de tester le pouvoir antibiotiques des larves stériles in-vivo.

Mais une question se pose : la larvothérapie peut-elle être utilisée en première ligne ou doit-on la considérer comme une technique de dernier recours ?

ANNEXE I

MATERIELS

A. Matériel du terrain

- Paires de gants de chirurgien
- récipients en plastique avec couvercle
- sacs poubelles
- pinces souples en acier
- appareil photos reflex numérique
- enregistreur de température étalonné

- piège pour les insectes volants
- Bouteilles en plastique de 1 litre
- Elastiques
- Sachets
- Tulle

B. Matériel du laboratoire

- Loupe binoculaire (agrandissement 50x) avec un appareil photo intégré
- microscope numérique USB
- pinces, scalpel, ciseaux
- boîtes en plastique pour l'élevage
- abbats de volailles
- sable
- congélateur
- Pistolet
- Bain marie
- Etuves à 25°C et 37°C
- Vortex
- Pc portable acer i3
- Loupe manuelle
- Ecouvillon
- Lame sert à disséquer
- Sucre
- Miel
- Eau de robinet
- bibliographie (ouvrages d'Entomologie, clefs d'identification des insectes).

C. Verrerie

- Bec bunsen
- Boites pétri
- Boites pétri en verre stérile
- Pipettes pasteur
- Portoirs à tube
- Bec bunsen
- Tubes stériles
- Tubes à essai
- Lence
- Seringues
- Erlenmeyer
- Bécher
- Eprouvette graduée
- Entonnoir

D. Produits chimiques

- Alcool éthylique (C₂H₆O) à 70% et à 95%
- Eau distillée
- Eau physiologique stérile
- Hypochlorite de sodium (Dakin)
- Hexamidine transcutané
- Polyvidone iodée (Bétadine)
- Sérum salin

E. Milieux de culture

- Gélose nutritive
- Gélose au sang préparé
- Milieu sabauraud
- Milieu OGA

ANNEXES

Eau distillée

Eau physiologique stérile

Alcool 70%

Alcool 85%

Loupe binoculaire (agrandissement 50x) avec un appareil photo intégré

boîtes en plastique pour l'élevage (18 x 18 x 7 cm)

abats de volaille

milieux de culture :

la gélose nutritive

la gélose au sang

milieu OGA

milieu sabouraud

Annexe II

a. Désinfection des œufs

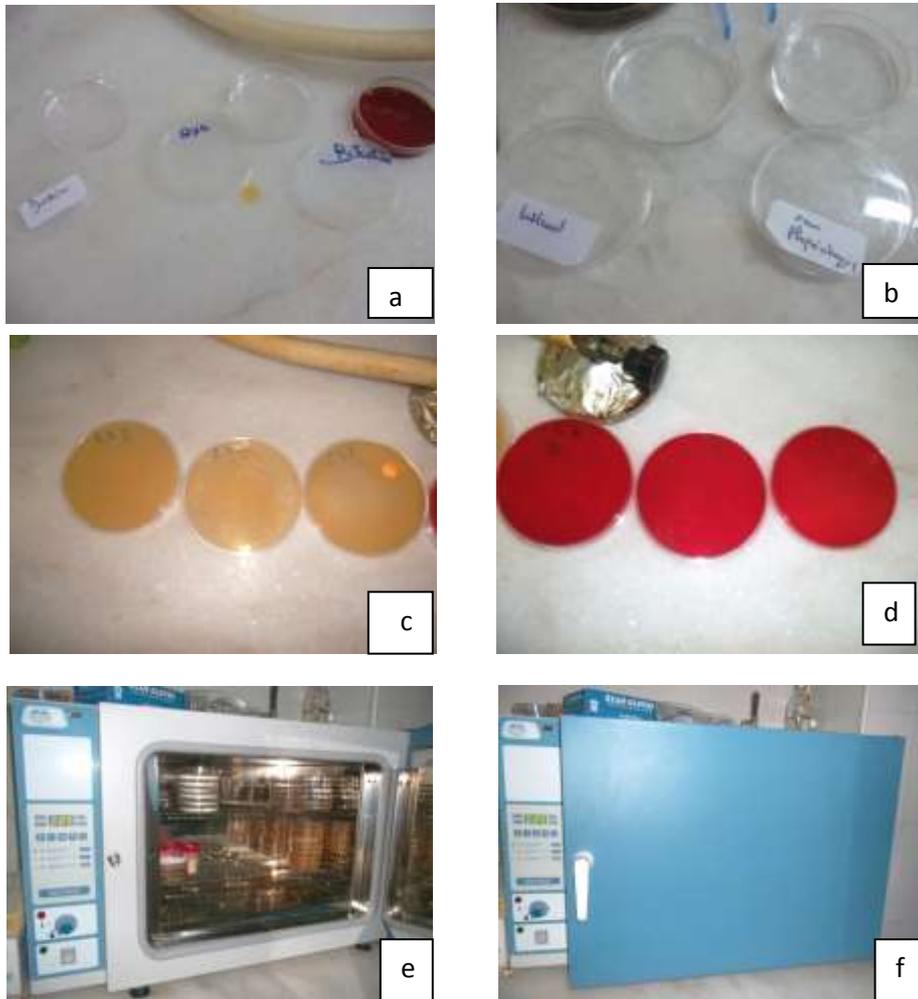


Figure 31: Différentes étapes de désinfection des œufs de *L. sericata*.

b. Souches microbiennes utilisées dans notre travail.

Souches bactériennes	Gram	Souches fongiques
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Escherichia coli</i>	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Candida albicans</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	+	
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	

Annexe III

Tableau 23: Fiche de prélèvement, d'observation et d'identification des espèces collectées (1).

N° d'appâts	Date	Lieu	Observation	Identification
01	24-03-16	Bourkika	Après 2h : - Absenced'espèces -lodeur commence à se sentir -après 4h : 3 espèces de taille moyenne de couleur vert métalique arrivenet à déposer dans le piège 6h après à 17 :30' 3 autre espèces présentent dans le piège et la mort d'un individu	-6 espèces de <i>Lucilia sericata</i> -7 espèces de <i>Caliphora vicina</i>
02	17-04-16	Blida	Après 24h -2 espèces + œufs -Une espèce morte	-12 espèces de <i>L.sericata</i> -2 espèces de <i>C.vicina</i>

			<p>-Odeur de l'appât Le 19-04-16 -10 espèces de couleur sombre : 2 vivantes «et 8 morte - amas d-œufs - une forte odeur -7 espèces vivantes - une morte</p>	
03	02-05-16	Blida	<p>A 13 :36 Présence d'une espèce de couleur sombre 14 :30 Une mouche verte dans le piège</p>	
	04-05-16		<p>Une espèces de grande taille avec yeux orangé est présente</p>	
04	05-05-16	Blida	<p>-Une seule espèce arrivée à cause de la pluie - 3 espèces de couleur sombre sont déposé dans le piège</p>	<p><i>-L.sericata</i> <i>-Les 3 individus sont C. vicina</i></p>
05	08-04-16	Blida	<p>-Présence d'une espèce de couleur verte métallique -3 espèces de couleur sombre mortes - une autre espèce grande de taille du corps rayé</p>	<p><i>L.sericata</i> <i>C.vicina</i></p>

Tableau 24 : Fiche de prélèvement des espèces nécrophages collectées au laboratoire d'hygiène publique de la wilaya de Blida (2).

N° du piège	Date de la chasse	Espèce	Heure de ponte	Température du milieu	Nombre d'œufs
06	05-05-16	<i>L.sericata</i>	Entre 18h et 6h	20°	167
07	08-05-16	<i>C.vicina</i>	14h	22°	68
08	19-05-16	<i>L.sericata</i>	10 :14	28°	112

Dans le 7^{ème} piège, l'appât de piège a été changé a cause de colonisation des fourmis.

Annexes IV

Tableau 25 : Composition de gélose nutritive (1).

Composants	Concentration
Peptone	6.0 g/litre
Extrait de bœuf	1.0 g/litre
Extrait de levure	2.0 g/litre
Chlorure de sodium	5.0 g/litre
Agar	14.0 g/litre
Ph final : 7.3 ± 0.2	

Tableau 26 : Composition de gélose au sang (2).

Composants	Concentration
Mélange de peptone	16.0 g/litre
Extrait de levure	2.0 g/litre
D- glucose	0.5 g/litre
Chlorure de sodium	7.0 g/litre
Agar	12.0 g/litre
Ph final : 7.3 ± 0.2	

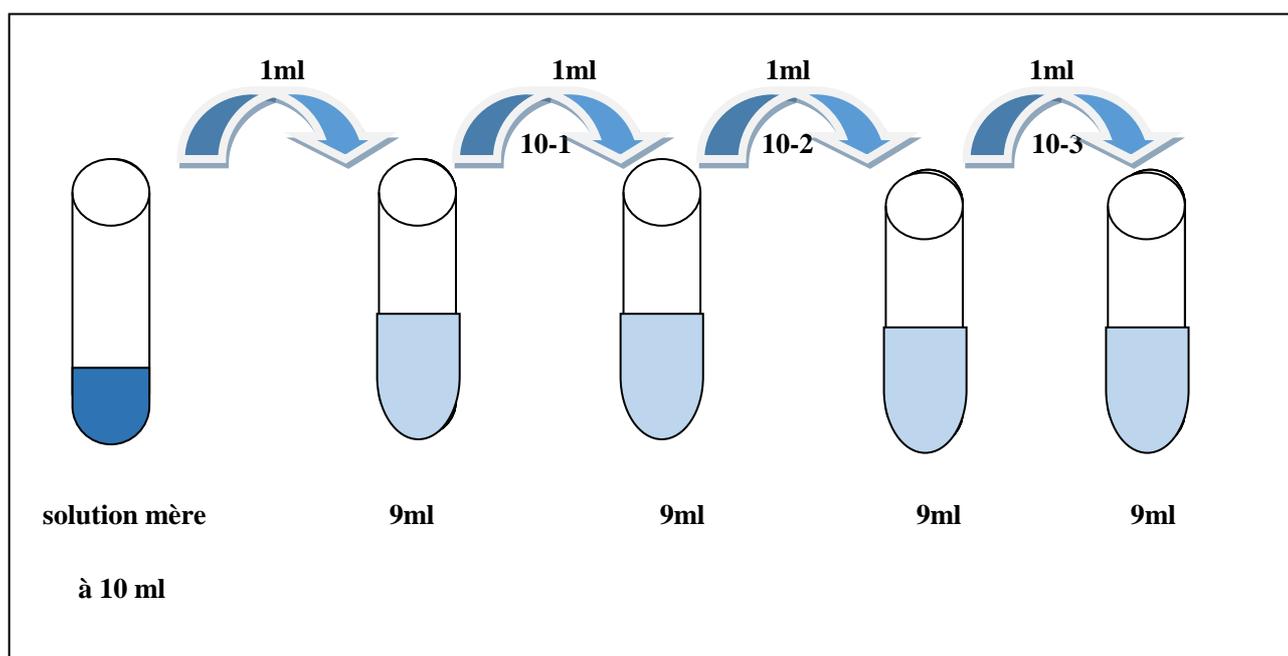
Tableau 27 : fiche de références des souches utilisées en test antibactérien.

Souches	Références
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC ® 27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC ® 25923
<i>Escherichia coli</i>	ATCC ® 25922
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC ® 55406
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC ® 700603
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC ® 8090

Annexes V

i. La dilution des suspensions microbiennes à partir d'une suspension mère

Durant notre test antimicrobien des asticots de *L.sericata* on était sensé de diminuer la concentration des suspensions microbiennes à 10^{-3} à partir de solution mère.



ii. dilution des antiseptiques à 10%

Dans un bécher, nous avons ajouté 5 ml de l'antiseptique à 45 ml de l'eau physiologique.

Introduction

Chapitre I

Partie Bibliographique

Chapitre II

Matériels & méthodes

Chapitre III

Résultats

Chapitre IV

Discussion