

Université de Neuchâtel



Réponse immunitaire de souris à la salive de
tiques *Ixodes ricinus* : influence des cellules
dendritiques et $T\gamma\delta$

Thèse de doctorat de
Yvan Lorimier
2003

Institut de zoologie, laboratoire d'immunologie parasitaire
Emile-Argand 11
Case postale 2
2007 Neuchâtel

IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Réponse immunitaire de souris à la salive
de tiques *Ixodes ricinus* :
influence des cellules dendritiques et
 $T\gamma\delta$**

M. Yvan LORIMIER

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

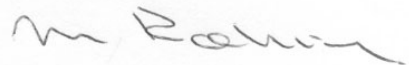
La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel, sur le rapport des membres du jury

MM. M. Brossard (directeur de thèse),
B. Betschart, B. Rutti et
G. Maestroni (Locarno)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 4 novembre 2003

La doyenne:



Martine Rahier

1. Introduction :	7
1.1 Les tiques.....	7
1.2 Ixodes ricinus	9
1.3 Les rôles de la salive.....	11
1.4 Les pathogènes transmis par I. ricinus.....	13
1.5 Réaction immunitaire de la souris BALB/c contre la salive d' <i>Ixodidae</i>	14
1.5.1 La composante cellulaire	15
1.5.1.1 Les cellules dendritiques	16
1.5.1.2 Les cellules T.....	22
1.5.1.3 Les cytokines.....	23
1.5.2 La composante humorale.....	24
1.5.2.1 Les anticorps	24
1.5.2.2 Le système complément.....	26
1.6 Buts du travail.....	26
2. Matériel et méthodes	29
2.1 Matériel	29
2.1.1 Souris	29
2.1.2 Lapins.....	30
2.1.3 Tiques.....	30
2.1.4 « Thermocycler » (appareil à PCR)	31
2.1.5 Compteur à scintillation	31
2.1.6 Lecteur ELISA	31
2.1.7 Incubateur	31
2.1.8 Chromatographie.....	31
2.2 Méthodes	32
2.2.1 Infestation des lapins.....	32
2.2.2 Infestation des souris.....	33
2.2.3 Mise à mort des souris	34
2.2.4 Dissection des souris.....	34
2.2.5 Récolte de la salive d'I. ricinus	34
2.2.6 Extrait protéique de glandes salivaires d'I. ricinus (EGS).....	35
2.2.7 Dosage des protéines de l'EGS.....	35
2.2.8 Fractionnement de l'EGS par chromatographie.....	35

2.2.9 Dialyse des fractions	36
2.2.10 Concentration des fractions	36
2.2.11 Enrichissement des cellules dendritiques	36
2.2.12 Enrichissement des sous-populations de cellules dendritiques	38
2.2.13 « Pulsing » et injection des cellules dendritiques.....	39
2.2.14 Prélèvement de la peau et séparation de l'épiderme et du derme	40
2.2.15 Enrichissement des cellules T $\gamma\delta$ et des cellules de Langerhans	40
2.2.16 Enrichissement des cellules TCD4 et TCD8.....	41
2.2.17 Culture cellulaire.....	42
2.2.18 Test de prolifération cellulaire.....	42
2.2.19 Dosage des cytokines par ELISA	43
2.2.20 Extraction d'ARN	44
2.2.21 Rétrotranscription	45
2.2.22 Préparation des compétiteurs.....	46
2.2.23 PCR compétitive semi-quantitative.....	46
2.2.24 Electrophorèse des produits d'amplification et évaluation semi- quantitative	47
2.2.25 Western blot	49
2.2.26 Dosage de la prostaglandine (PGE2).....	52
2.3 Dosage des messagers d'IL-4, d'IFN- γ et d'IL-10 dans l'épiderme, le derme, les ganglions et la rate de souris BALB/c infestées par des larves d'I. ricinus.....	52
2.4 Stimulation des cellules T $\gamma\delta$ de l'épiderme par de la salive d'I. ricinus.....	53
2.4.1 Cellules T $\gamma\delta$ seules	53
2.4.2 Cellules T $\gamma\delta$ et cellules de Langerhans.....	53
2.5 Schéma de l'étude de la réponse immunitaire de la souris BALB/c stimulée par différentes sous-populations de cellules dendritiques spléniques pulsées avec des antigènes d'I. ricinus	54
3 Résultats.....	56
I. Réactions des tissus de BALB/c impliqués lors de la piqûre des tiques	56
3.1 Evolution des rapports d'IL-4, d'IFN- γ et d'IL-10.	56
3.1.1 Evolution des rapports d'IL-4 dans l'épiderme, le derme, les ganglions et la rate	56

3.1.2 Evolution des rapports d'IFN- γ dans l'épiderme, le derme, les ganglions et la rate	61
3.1.3 Evolution des rapports d'IL-10 dans l'épiderme, le derme, les ganglions et la rate	65
3.2 Production de l'IL-4 par les cellules T $\gamma\delta$ de l'épiderme de la souris BALB/c lors d'une infestation par des larves d'I. ricinus	69
3.3 Expérience de stimulation in vitro des T $\gamma\delta$	70
3.4 Production de l'IL-4 par les cellules T $\gamma\delta$, TCD4+, TCD8+ de la rate d'une souris BALB/c lors d'une infestation par des larves d'I. ricinus.....	71
II. Influence des antigènes de tiques et des cellules dendritiques sur la polarisation de la réponse.....	72
3.5 Sélection des fractions	72
3.6 Prolifération lymphocytaire après « pulsing » des différentes sous-populations de cellules dendritiques avec les fractions d'EGS.....	74
3.6.1 Analyse des fractions d'EGS et de la salive par Western blot.....	77
3.6.2 Dosage de la prostaglandine PGE2	80
3.7 IL-4 et IFN- γ dans le surnageant de cultures des lymphocytes de souris BALB/c naïve receveuses de différentes sous-populations de cellules dendritiques pulsées	81
3.7.1 Production d'IL-4	81
3.7.2 Production d'IFN- γ	82
3.7.3 Rapport IL-4/IFN- γ pour chaque antigène de tiques et chaque sous-population de cellules dendritiques	84
4 Discussion	86
4.1 Production de cytokines et polarisation de la réponse	86
4.1.1 Etude de l'évolution d'IL-4, d'IFN- γ et IL-10	86
4.1.2 L'épiderme.....	86
4.1.3 Le derme	88
4.1.4 Les ganglions drainants.....	89
4.1.5 La rate	90
4.2 Etudes des sous-populations de cellules dendritiques pulsées avec différents antigènes salivaires d'Ixodes ricinus	90

4.2.1 Rôle des cellules dendritiques de la souris BALB/c dans l'immunité anti-I. ricinus	91
4.3 Limite du travail et voie future	93
5 Résumé	95
6 Remerciements	96
7 Annexe	98
7.1 FPLC	98
7.2 Comptage de la scintillation :	100
7.3 PCR	100
7.3.1 "Master Mix"	100
7.3.2 Cycles de PCR	101
7.3.3 Séquences des amorces	101
7.4 Résultats des mesures de messagers chez la souris BALB/c naïve	102
7.5 Résultats des mesures de messagers chez la souris BALB/c infestée	103
7.5.1 Epiderme	103
7.5.2 Derme	104
7.5.3 Ganglions	105
7.5.4 Rate	106
7.5.5 Valeurs des messagers d'IL-4 et HPRT produits par différentes populations cellulaires de l'épiderme de souris BALB/c infestées	106
7.5.6 Valeurs des messagers d'IL-4 et HPRT produits par différentes populations cellulaires de rate de souris BALB/c infestée	107
8 Bibliographie	108

1. Introduction :

1.1 Les tiques

Ixodes ricinus est une des nombreuses espèces de tiques. Les tiques sont des ectoparasites cosmopolites. Elles appartiennent au phylum des Arthropoda.

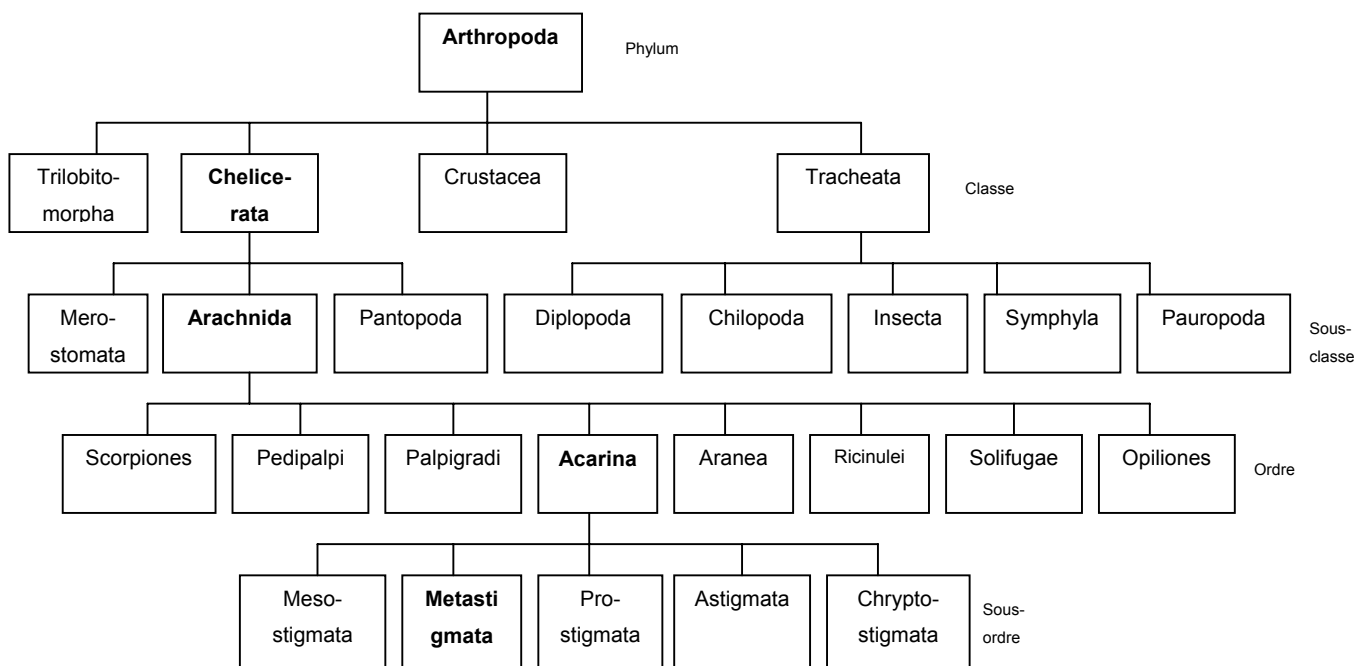


Figure 1 : Arbre phylogénétique des arthropodes

Les groupes taxonomiques auxquels appartiennent les tiques sont en gras.

La taille des boîtes et les distances entre elles ne fournissent aucune indication concernant l'importance des taxons et leur parenté. Modifié selon ⁽²⁾

On distingue différentes familles de tiques. *I. ricinus* appartient à la famille des Ixodidae mais les tiques englobent aussi les *Argasidae* et les *Nuttallielidae*. Ces dernières, dont on n'a décrit qu'une seule espèce, sont peu connues.

Les *Ixodidae* et les *Argasidae* se distinguent par leur morphologie et leur mode de vie. Les *Ixodidae* sont faciles à reconnaître parce qu'il est possible de voir les pièces

buccales en vue dorsale. Ceci est impossible pour les *Argasidae* dont le capitulum est ventral (fig 2).

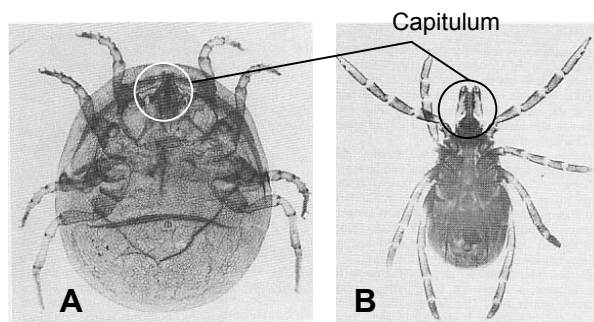


Figure 2 : Différence entre *Argasidae* et *Ixodidae* (*Foundations in parasitology, Schmidt and Roberts*)

(A), *Ornithodoros* sp. (*Argasidae*). (B), *I. scapularis* (*Ixodidae*). Les pièces buccales sont ventrales chez les *Argasidae* alors qu'elles sont dorsales chez les *Ixodidae*.

Chez les *Argasidae*, le dimorphisme sexuel est peu marqué. Aucune porosité n'est visible à la base du capitulum. Les yeux se situent dans la région supracoxale et la partie dorsale de l'exosquelette n'est pas divisée en alloscutum et scutum comme chez les *Ixodidae*.

Les *Argasidae* ont généralement une spécificité importante pour leur hôte. Sur les quelques 150 espèces connues, la plupart prennent de nombreux repas sanguins sur leur hôte qui fournissent les nutriments nécessaires à la mue d'un stade à l'autre et aux pontes. Les pontes ne dépassent pas 500 œufs. Les *Argasidae* vivent généralement dans les crevasses du sol, dans les nids d'oiseaux, dans les terriers, à proximité de leur hôte. Les *Argasidae* peuvent jeûner jusqu'à 5 ans.

La famille des *Ixodidae* est subdivisée en trois sous-familles :

- les *Ixodinae* comptent un seul genre *Ixodes* (fig 3) avec 250 espèces environ. Ces tiques sont généralement de petite taille. Les adultes ne présentent pas de festons et le sillon anal toujours présent est antérieur à l'anus. Le dimorphisme sexuel des pièces buccales est important. Elles n'ont pas d'yeux.
- les *Amblyominae* se reconnaissent par un sillon anal postérieur ou difficilement discernable, par la base du *capitulum* qui n'est pas étirée latéralement et par la présence de festons chez les adultes.
- les *Rhipicephalinae* sont identifiables par les extensions latérales de la base du capitulum. Elles peuvent présenter des festons. Le sillon anal est postérieur ou absent.

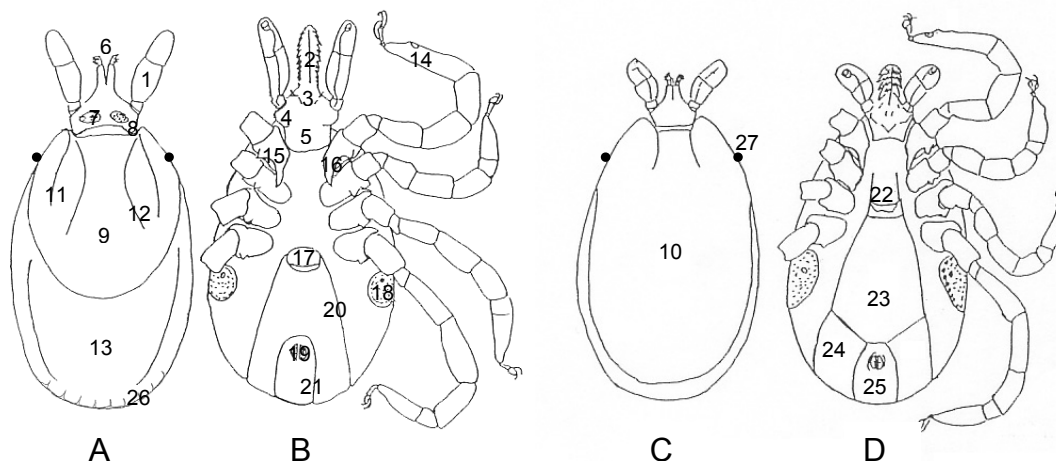


Figure 3 : Schéma d'*Ixodidae* (genre *Ixodes*)

(A) femelle en vue dorsale, (B) femelle en vue ventrale, (C) mâle en vue dorsale, (D) mâle en vue ventrale. 1. Pédipalpe, 2. Hypostome, 3. Soies posthypostomales, 4. Cornes basi-ventrales, 5. Basis capituli, 6. Chélicères, 7. Aires poreuses, 8. Cornes basi-dorsales, 9. Scutum, 10. Conscutum, 11. Sillon scapulaire, 12. Sillon cervical, 13. Alloscutum, 14. Tarse I, 15. Coxa I, 16. Epine coxale, 17. Gonopore, 18. Stigmate, 19. Anus, 20. Sillon ventral, 21. Sillon périanal, 22. Plaque pré-génitale, 23. Plaque médiane, 24. Plaque adanale, 25. Plaque anale, 26. Festons, 27. Ocelles

1.2 *Ixodes ricinus*

La larve d'*Ixodes ricinus* se reconnaît par ses pattes au nombre de 6 et sa petite taille (moins d'un millimètre). La nymphe, elle mesure plus d'un millimètre et possède 4 paires de pattes. Les adultes sont plus grands. Le mâle atteint 3 millimètres alors que la femelle peut atteindre 4 millimètre à jeun.

Antérieurement, nous trouvons le rostre composé d'un hypostome entouré des chélicères. La « basis capituli est plus large que longue. Dorsalement, le scutum recouvre presque l'ensemble du dos du mâle alors qu'il ne représente qu'un tiers de la surface dorsale de la femelle. Ventralement, le sillon anal est toujours présent. Antérieurement, s'ouvre l'orifice génital. Les ocelles sont observés latéralement à la hauteur du scutum.

I. ricinus se rencontre jusqu'à une altitude de 1400 m ⁽⁴⁾ et se trouve très fréquemment en lisière des bois ou dans les sous-bois où elle trouve l'environnement adéquat à sa vie (humidité et température). Dans ces biotopes, elle trouve son hôte facilement (rongeurs, oiseaux, gibier, chien, chat, Homme,...). Les chemins forestiers qui sont souvent fréquentés par les promeneurs sont des lieux privilégiés pour le contact entre ce parasite et l'Homme. Les personnes qui se promènent dans les bois sont particulièrement exposées aux maladies transmises par ces ectoparasites (chapitre 1.4).

Dans le cas d'*I. ricinus*, le repas sanguin dure environ 3 jours pour la larve, 5 jours pour la nymphe et 7-9 jours pour la femelle adulte. Le mâle ne se nourrit que rarement et son repas dure moins d'un jour. Les infestations par les larves peuvent être massives. Les différents stades sont représentés sur la figure 4.

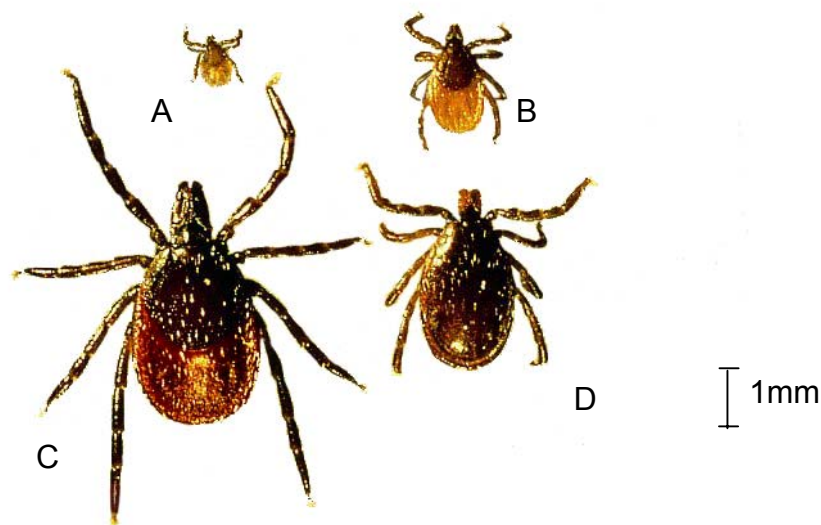


Figure 4 : *Ixodes ricinus* (photo prise au laboratoire de parasitologie de Neuchâtel par C. Di Mito)

(A) Larve, (B) Nymphe, (C) Femelle (adulte), (D) Mâle (adulte)

La femelle *I. ricinus* pond environ un millier d'œufs d'où éclosent les larves hexapodes (fig 4). *I. ricinus* quitte son hôte après chaque repas sanguin pour muer ou pondre.

1.3 Les rôles de la salive

Pour se fixer, la tique découpe la peau de l'hôte à l'aide de ses chélicères et introduit son hypostome qui lui sert de harpon. La tique injecte de la salive et prélève du sang. Cette salive contient des anticoagulants qui facilitent le repas sanguin ⁽⁵⁾. Comme celui-ci dure plusieurs jours chez les *Ixodidae*, la salive conserve sa fluidité au sang et permet à la tique de se nourrir avec succès ⁽⁶⁾. La salive semble contenir des substances analgésiques, même si leur présence n'a été démontrée que chez *Amblyomma americanum* ⁽⁷⁾. Les ectoparasites fixés passent ainsi inaperçus pendant leur repas et évitent que l'hôte les élimine par un toilettage excessif ⁽⁸⁾.

Certaines molécules de la salive sont immunosuppressives ⁽⁹⁾. Elles inhibent la réponse immunitaire de l'hôte. Une protéine salivaire dénommée Iris pour « *Ixodes ricinus* immunosuppressor » a été caractérisée ⁽¹⁰⁾. Il a été démontré qu'elle diminuait la prolifération des lymphocytes de souris infestées lors d'une stimulation secondaire *in vitro* en présence de concavaline A ⁽¹⁰⁾. Un effet inhibiteur sur des cellules humaine mononucléaires périphériques du sang a également été démontré lors d'une stimulation *in vitro* par du LPS ou de la phytohémagglutinine (PHA). De plus, la production d'IFN- γ , d'IL-6, de TNF- α et d'IL-8 était aussi inhibée.

La salive de *Rhipicephalus sanguineus* réduit la production d'IL-2 et la prolifération *in vitro* des lymphocytes T issus de souris infestées par cette espèce de tique. Cette salive inhibe également l'activation des macrophages induite par l'IFN- γ . L'inhibition est proportionnelle à la concentration de salive ⁽¹¹⁾.

Pendant son repas sanguin, la tique ingère des anticorps. Ces anticorps peuvent traverser l'épithélium intestinal et se retrouver dans l'hémocoèle tout en conservant leurs propriétés immunologiques ⁽¹²⁾. Ils pourraient se lier aux tissus de la tique et interférer avec le métabolisme normal des tiques et gêner l'ovogénèse. Les immunoglobulines se lient ainsi à certaines protéines de *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* et *Ixodes hexagonus* ⁽¹³⁾. Détectées dans

l'hémolymphe et l'extrait de glandes salivaires (EGS) de ces espèces, des « Immunoglobulin binding proteins » sont susceptibles de participer à la défense de la tique neutralisant les anticorps de l'hôte.

Chez *Ixodes scapularis*, une protéine se liant à l'IL-2 humaine ou murine a été identifiée. L'IL-2 étant une cytokine importante dans l'activation des cellules T, B, monocytes, macrophages et « natural killer ». La réaction immunitaire de l'hôte est inhibée par cette protéine ⁽¹⁴⁾. Des protéines de la salive de plusieurs *Ixodidae* se lient à l'IL-8 impliquée dans le chimiotactisme des neutrophiles. La liaison de l'IL-8 à son récepteur est inhibée et le chimiotactisme diminue ^{(15) (16)}. L'infiltration des neutrophiles dans le derme au site de fixation des tiques est ainsi diminuée.

L'histamine de l'hôte peut également être neutralisée par de petites protéines de 20 et 25 kD détectées dans des extraits de glandes salivaires (EGS) de *R. appendiculatus* ⁽¹⁷⁾. L'histamine est libérée lors de la dégranulation des mastocytes et des basophiles et participe à l'acquisition d'une résistance contre les tiques ^{(18) (19)}. La neutralisation de cette molécule facilite sans doute le repas des ectoparasites.

Le système complément est également inactivé par la salive d'*Ixodes scapularis*. Le C3, élément central des voies classique et alternative ne peut être converti en C3a et C3b en présence de la salive d'*I. scapularis* ⁽²⁰⁾.

D'autres molécules sont antigéniques et induisent une réponse acquise de l'hôte dans des systèmes naturels ou expérimentaux. Certaines espèces comme *Clethrionomys glareolus* développent une résistance contre *I. ricinus* alors que d'autres, comme *Apodemus flavicollis*, n'y parviennent pas ⁽²¹⁾. La résistance de l'hôte aux *Ixodidae* se traduit par un poids réduit de la tique à la fin de son repas sanguin, une durée plus longue du repas, un nombre d'œufs réduit et une viabilité diminuée des œufs, ainsi qu'un pourcentage plus élevé de tiques mourant sans pondre ni muer. L'acquisition d'une résistance a été démontrée en laboratoire chez le lapin ⁽²²⁾.

1.4 Les pathogènes transmis par I. ricinus

Lors de son repas sanguin, *I. ricinus* est vectrice d'agents pathogènes. En Suisse, cette tique transmet principalement *Borrelia burgdorferi sensu lato*, agent de la borréliose de Lyme⁽²³⁾, le virus FSME provoquant l'encéphalite à tique⁽²⁴⁾, *Anaplasma phagocytophila*⁽²⁵⁾, *Babesia microti*⁽²⁶⁾ et *Babesia divergens*⁽²⁷⁾.

Certaines études montrent que la salive de la tique est très importante dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte face aux pathogènes transmis⁽²⁸⁾. La modulation de la réponse anti-borrélioses par la salive de la tique a aussi été démontrée dans notre laboratoire⁽²⁹⁾. Le taux des IgE totales produites par la souris BALB/c augmente drastiquement lors d'infestations avec des nymphes d'*I. ricinus* infectées ou non par *B. burgdorferi*. Ce phénomène n'est pas observé si les borrélioses sont inoculées à la seringue chez les BALB/c. La production d'IgG2a anti-*Borrelia*, caractéristique d'une réponse Th1, est augmentée chez des BALB/c déficientes en IL-4 et chez des souris inoculées à la seringue au contraire de souris infestées par des nymphes infectées⁽²⁹⁾. Le repas des *Ixodidae* durant plusieurs jours, la salive injectée module la réponse immunitaire de l'hôte pour que la tique puisse continuer à se nourrir convenablement pendant toute cette durée. La transmission des pathogènes dépend également du temps pendant lequel la tique est fixée à son hôte, même si quelques heures suffisent pour l'infection de ce dernier⁽³⁰⁾.

Les nombreuses molécules immunomodulatrices et immunosuppressives présentes dans la salive conditionnent le passage des agents pathogènes de la tique à son hôte. La connaissance de la réaction immunitaire de l'hôte contre la salive de la tique est essentielle pour comprendre son importance dans la transmission des maladies à tiques.

1.5 Réaction immunitaire de la souris BALB/c contre la salive d'Ixodidae

L'injection de la salive par la tique provoque une réaction immunitaire chez la souris. Cette réaction comporte plusieurs facettes. L'immunité innée se traduit par une inflammation locale au lieu de la piqûre, une infiltration de cellules comme les éosinophiles, neutrophiles, basophiles, monocytes, une production de cytokines et l'activation du système complément. L'immunité acquise se traduit par la stimulation spécifique de cellules T CD4⁺ des ganglions drainant le site de fixation ⁽³¹⁾, la production de cytokines Th2 ⁽³²⁾, ⁽³³⁾ et la production d'anticorps d'isotype IgG1 ⁽³⁴⁾.

Par hybridation *in situ*, il a été montré que la quantité d'ARNm de l'IFN- γ augmente faiblement dans le derme lors de réinfestations, alors que la quantité des messagers de l'IL-4 reste élevé ⁽³³⁾. De nombreuses études ont montré que la souris BALB/c confrontée aux antigènes de tiques initie une réponse Th2 avec une augmentation de la production d'IL-4. Les lymphocytes T CD4⁺ de souris BALB/c infestées par des nymphes d'*I. ricinus* restimulées avec de la conA, produisent une grande quantité d'IL-4 et peu d'IFN- γ ⁽³²⁾. Ces cellules proviennent des ganglions drainant le site de fixation des tiques. Une faible augmentation de la production d'IFN- γ est constatée lorsque les souris ont été infestées plusieurs fois alors que l'IL-4 reste constamment élevée. Les cellules provenant de ganglions qui ne drainent pas le site de fixation des tiques produisent peu d'IL-4 alors que la quantité d'IFN- γ augmente faiblement ⁽³²⁾.

Ferreira et al. ⁽¹¹⁾, ⁽³⁵⁾ ont étudié la réponse immunitaire de la souris C3H/HeJ infestée par des *R. sanguineus* adultes. Des infestations successives de ces souris s'accompagnent d'une inhibition de la prolifération des lymphocytes quand ils sont restimulés *in vitro* par de la conA. Des cytokines Th1 (IL-12, IFN- γ et IL-2) produites *in vitro* sont aussi inhibées alors que les quantités d'IL-4, IL-10 et TGF- β augmentent ⁽³⁵⁾. Plusieurs souches de souris ont été infestées pour étudier l'influence de leur génotype sur la polarisation de la réponse et sur l'acquisition d'une éventuelle résistance contre les larves et les nymphes d'*I. ricinus*. Aucune différence

significative de résistance n'a été observée entre les souches BALB/c, C57BL/6 et C3H. D'autres souches, DBA, SJL et FVB produisent aussi une importante quantité d'IL-4 et très peu d'IFN- γ après infestations par des nymphes d'*I. ricinus* ⁽³⁶⁾. De plus, il a été montré que la piqûre des larves et adultes d'*I. ricinus* provoque également une réponse Th2 chez la souris BALB/c ⁽³⁴⁾.

1.5.1 La composante cellulaire

A l'endroit de fixation de la tique, lors d'infestations répétées, le derme est infiltré par de nombreuses cellules : éosinophiles, neutrophiles, basophiles, monocytes et lymphocytes. Même si l'infiltration cellulaire augmente lors de réinfestations, la souris BALB/c ne développe pas de résistance contre les tiques ⁽³⁷⁾. Le lapin, lui, développe une résistance contre les adultes d'*I. ricinus* dès la première infestation ⁽³⁸⁾. Il a été établi que le nombre de basophiles et de mastocytes en phase de dégranulation est important au site de fixation des tiques lors de réinfestations ⁽²²⁾. Les basophiles sont associés à l'acquisition d'une résistance ⁽³⁹⁾.

L'EGS (extrait de glandes salivaires) d'*I. ricinus* induit *in vitro* une prolifération spécifique des lymphocytes spléniques de souris BALB/c infestées par des nymphes de la même espèce ⁽⁴⁰⁾. Cette prolifération est inhibée par la présence de chloroquine dans le milieu ce qui suggère l'intervention de cellules présentatrice d'antigène (CPA) dans la stimulation car la chloroquine augmente le pH des lysosomes, interférant avec la digestion et la présentation des antigènes par les cellules ⁽⁴¹⁾.

Une fraction chromatographique d'EGS d'*I. ricinus* riche en une protéine de 65 kD stimule les lymphocytes des ganglions de BALB/c infestées. La déplétion des cellules TCD4+ montre que ces cellules sont impliquées dans la réponse immunitaire développée contre cette protéine ⁽³¹⁾.

1.5.1.1 Les cellules dendritiques

Dans mon travail, je me suis intéressé aux cellules ayant une importance dans l'induction de la réponse immunitaire de la souris contre la salive d'*I. ricinus*. Parmi celles-ci, les cellules dendritiques jouent sans doute un rôle prépondérant.

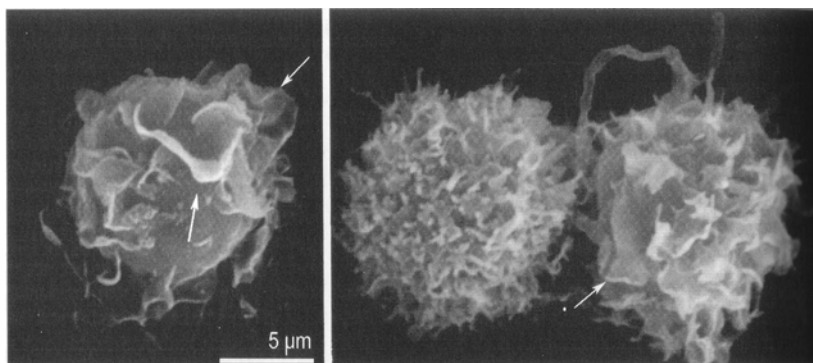


Figure 5 : Cellules dendritiques ⁽¹⁾ Image obtenue par microscopie électronique à balayage. On discerne les extensions cytoplasmiques en forme de voile typique à ce genre de cellules.

Les cellules dendritiques ont été visualisées pour la première fois en 1868 sous la forme des cellules de Langerhans (LC). Cependant, leur caractérisation n'a commencé que depuis 25 ans.

Chez la souris, nous connaissons plusieurs sous-populations de cellules dendritiques immatures. Tout d'abord, deux sous-populations ont été décrites, celles qui expriment ou non le marqueur CD8 α + ⁽⁴²⁾, ⁽⁴³⁾. Des études plus approfondies révèlent que les cellules

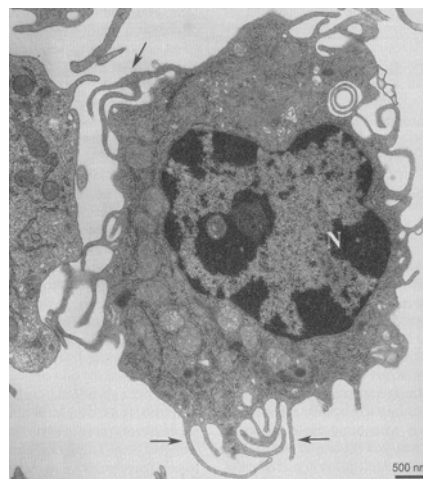


Figure 6 : Cellule dendritique ⁽¹⁾ Microscopie électronique par transmission (N=navau)

dendritiques CD8 α - sont divisées en deux sous-populations, l'une exprimant le marqueur CD4 et l'autre pas ⁽⁴⁴⁾. Nous avons travaillé avec trois sous-populations de cellules dendritiques : CD8 α + ; CD8 α -CD4+ et CD8 α -CD4-.

Les cellules dendritiques stimulent les lymphocytes T en présentant des peptides antigéniques associés au CMH. Les cellules B peuvent être stimulées par un antigène natif via leurs récepteurs ou présenter l'antigène apprêté aux cellules T. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ peuvent également être stimulés directement par certains antigènes natifs ⁽⁴⁵⁾. Parmi les cellules présentatrice d'antigène, les cellules dendritiques sont les plus spécialisées et les plus efficaces. Elles constituent un système de cellules hématopoïétiques, réparties dans tous les tissus. On les retrouve dans les organes lymphoïdes. Les cellules de Langerhans de la peau en font partie, ainsi que les cellules interstitielles de nombreux tissus. Les cellules de Langerhans représentent un stade immature de cellules dendritiques. Elles capturent des antigènes protéiniques introduits au niveau de la peau et les découpent en peptides. Elles présenteront les peptides antigéniques aux lymphocytes T en association avec les molécules codées par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Elles ne possèdent pas le marqueur CD8 α (phénotype CD8 α -) et représentent la population majeure de cellules dendritiques de l'épiderme.

D'après Banchereau *et al.*, toutes les sous-populations de cellules dendritiques semblent provenir d'un même progéniteur hémapoïétique exprimant le marqueur CD34 ⁽⁴⁶⁾. Ce progéniteur va donner naissance à différentes populations de précurseurs sanguins après avoir été stimulé par différentes cytokines (IL-4, GM-CSF et IL-3). Une lignée myéloïde exprimant le CD11c se divise en deux sous-populations, l'une exprimant CD14 en absence de CD1, l'autre exprimant au contraire CD1 mais pas CD14. La lignée dite lymphoïde n'exprime pas CD14 ni CD11c.

Actuellement, la différenciation des cellules dendritiques en lignées lymphoïde et myéloïde est mise en doute. Il semble que les cellules CD8 α + et CD8 α - proviennent des mêmes précurseurs ⁽⁴⁷⁾.

Rappelons que les cellules dendritiques sont essentielles pour l'activation des lymphocytes T et dans la régulation de la réponse immunitaire ⁽⁴⁸⁾.

De manière générale, les cellules dendritiques fonctionnent toutes selon le même schéma. La première phase de leur activation consiste en la capture de l'antigène. Différentes voies sont possibles : l'attachement de l'antigène par des récepteurs spécifiques, la fixation de complexes immuns par un récepteur spécifique aux anticorps puis par endocytose. Les cellules dendritiques folliculaires et les lymphocytes B expriment le récepteur CD21 ou CR2 dont le ligand est le C3b du système complément ⁽⁴⁹⁾. L'interaction du C3b avec la cellule dendritique va plus loin qu'une simple affinité pour un récepteur. Le C3b influence la stabilité du CMH de classe II à la surface de la cellule dendritique lors de la présentation de l'antigène et augmente les interactions cellulaires. Les cellules dendritiques CD8 α ⁺ et CD8 α ⁻ expriment toutes le Fc γ RI en faible quantité, les Fc γ RII et Fc γ RIII en grande quantité. Le Fc γ RI possède une forte affinité pour les anticorps de classe IgG2a. Les Fc γ RII et Fc γ RIII réagissent préférentiellement avec les anticorps de classes IgG1 et IgG2b mais peuvent également capter les IgG2a. En absence des récepteurs Fc γ RI et Fc γ RIII, les cellules dendritiques CD8 α ⁻ perdent leur capacité à présenter les peptides issus de la digestion de complexes immuns tandis que les cellules dendritiques CD8 α ⁺ gardent cette capacité ⁽⁵⁰⁾. De nombreux autres récepteurs ayant une affinité pour différents types d'antigènes sont également impliqués dans l'endocytose. Un récepteur typique des cellules dendritiques est le récepteur pour le mannose (DEC-205) qui a une forte affinité pour les glycoprotéines. La phagocytose ou la macropinocytose des antigènes peut également intervenir de manière directe dans la réaction des cellules dendritiques (fig 7).

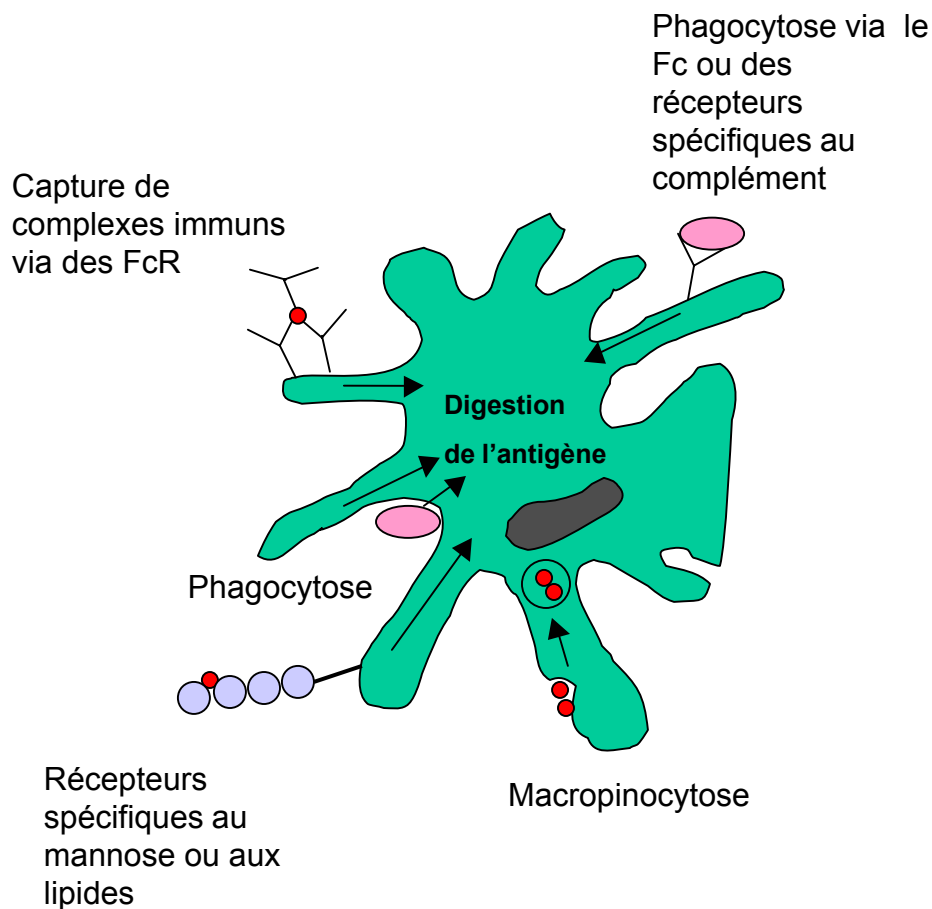


Fig. 7 : Différentes voies de capture d'antigène par les cellules dendritiques

Une fois l'antigène internalisé, la cellule dendritique va l'apprêter (processing). Les protéines sont coupées en peptides qui seront présentés à la surface de la cellule en association avec le CMH dont la synthèse aura été stimulée pendant le « processing » de l'antigène.

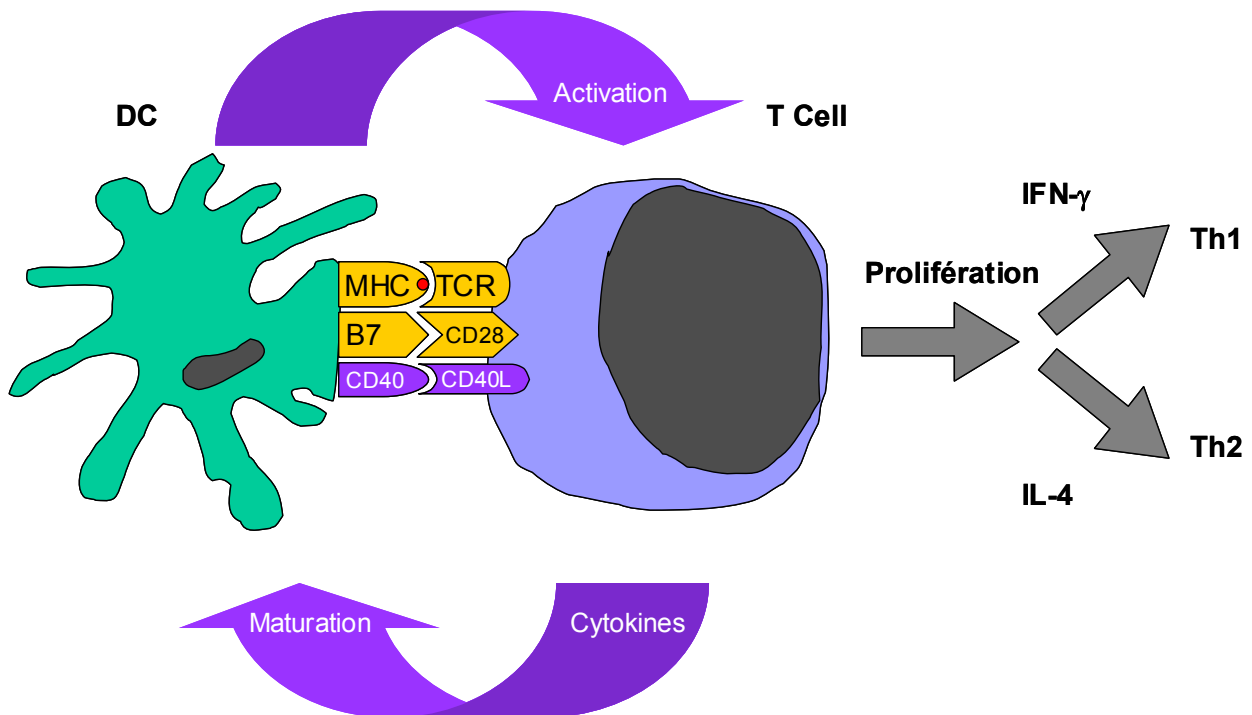


Fig. 8 : Présentation de l'antigène aux cellules T par les cellules dendritiques et activation des lymphocytes.

Le complexe CMH-antigène est reconnu par le récepteur TCR présent à la surface des lymphocytes T. La costimulation par les marqueurs B7-1 ou B7-2 des cellules dendritiques via le récepteur CD28 des lymphocytes T est requise pour que les cellules T soient activées. L'activation des cellules T génère une production de cytokines dont les effets paracrines sur les cellules dendritiques ne semblent pas avoir fait l'objet de nombreuses études. Il a été décrit que l'IFN- γ sécrété par les lymphocytes T, ainsi que par les cellules présentatrice d'antigène elle-même augmente la production d'IL-12 par ces dernières ⁽⁵¹⁾. Par contre, l'IL-4 et l'IL-10 ont un effet inhibiteur sur la production d'IL-12 par les cellules présentatrices d'antigène ^(52,53,54). Toutefois, la maturation des cellules dendritiques est d'abord activée par le « processing » de l'antigène et le contact intercellulaire.

La maturation de la cellule dendritique réduit la densité des récepteurs à sa surface et engendre une réorganisation du cytosquelette. La cellule se transforme en cellule voilée dont la surface externe est très importante (fig.5). La cellule dendritique

mature perd sa capacité à capturer l'antigène en conséquence de la diminution de ces récepteurs de surface. Par contre, elle augmente sa capacité à présenter l'antigène et exprime de nouveaux marqueurs impliqués dans l'interaction cellulaire avec la cellule T. Les CD80 et CD86 (appelé aussi B7-1 et B7-2) interagissent avec le récepteur CD28 du lymphocyte T et jouent un rôle important dans la polarisation vers une réponse respectivement Th1 ou Th2⁽⁵⁵⁾. Le CD40 se lie au CD40L de la cellule T. Ces interactions ont un effet costimulateur lors de la présentation de l'antigène en association avec le CMH. En revanche, la cellule dendritique peut aussi engendrer une tolérance contre un antigène via deux mécanismes connus. Les cellules dendritiques CD8 α + expriment le ligand CD95L en plus grande quantité que les cellules dendritiques CD8 α -. Ceci leur confère la possibilité de générer l'apoptose des lymphocytes T CD4+ via la liaison avec le récepteur CD95 présent sur ces derniers⁽⁵⁶⁾. Ce phénomène est certainement très important pour réguler la prolifération des lymphocytes T CD4+ et intervient lorsque leur nombre devient trop important. Suite à cette étude, d'autres recherches ont été menées pour vérifier si la régulation des lymphocytes T CD8+ était induite par le même mécanisme. Il a été démontré que le CD95 n'intervient pas mais que les cellules dendritiques CD8 α + limitent la prolifération des cellules T CD8+ en diminuant leur propre production d'IL-2⁽⁵⁷⁾. Une autre étude a démontré que la diminution de la production d'IL-2 est aussi importante pour la prolifération des cellules T CD4+. Cette diminution de l'IL-2 est due à la présence de la molécule CD8 α + elle-même, mais pas aux molécules de costimulation comme CD80 et CD86 ni aux facteurs solubles sécrétés par la cellule dendritique.

En plus de ces rôles de stimulation et de régulation, les sous-populations de cellules dendritiques peuvent polariser la réponse et donc entraîner la production de différentes cytokines par les cellules T selon qu'elles sont CD8 α +, CD4+ ou CD8 α -CD4-. De nombreuses études ont été menées pour déterminer l'influence du type de cellules dendritiques sur la polarisation de la réponse. En 1999, une étude démontre que lorsque l'antigène est présenté par les cellules dendritiques CD8 α + à des cellules T naïves, la réponse a tendance à être polarisée vers Th1⁽⁵⁸⁾. Ce n'est pas le cas avec les cellules dendritiques CD8 α -. Les cellules dendritiques CD8 α + issues de souris déficientes en IL-12 perdent cette propriété, indiquant que l'IL-12 est

essentielle pour l'initiation d'une réponse Th1. Les cellules dendritiques CD8 α + produisent plus d'IL-12 que les cellules dendritiques CD8 α -⁽⁵⁹⁾. Cette propriété pourrait jouer un rôle capital dans la polarisation de la réponse vers Th1.

Afin d'étudier l'effet de sous-populations particulières de cellules dendritiques sur l'induction et la polarisation de la réponse immunitaire, il est possible de les purifier, de les exposer à un antigène et de les réinjecter à un animal naïf. Des lymphocytes T cytotoxiques sont stimulés en injectant des cellules dendritiques pulsées avec de la β -galactosidase, un antigène dérivé de cellules tumorales⁽⁶⁰⁾. Les cellules dendritiques CD8 α +, pulsée avec des peptides antigéniques issus du cytochrome c de phalène, génèrent une réponse immunitaire par injection sous-cutanée⁽⁶¹⁾.

1.5.1.2 Les cellules T

Les lymphocytes T sont de petits lymphocytes portant à leur surface les molécules CD3 et TCR. Ils expriment aussi les marqueurs CD8 ou CD4. Une minorité ne présente ni CD8 ni CD4. Ils sont issus de précurseurs médullaires exprimant les marqueurs CD34 et CD44. Ils migrent ensuite vers le thymus où ils subissent une maturation. Dans le thymus ils sont sélectionnés positivement par les molécules de classe I et II du CMH. En effet, les cellules ne reconnaissant pas le CMH meurent par apoptose car elles ne présentent pas de TCR fonctionnel. Les lymphocytes T qui sont activés par les molécules du CMH seules meurent également par apoptose car ils représentent un danger. En effet, s'ils sont stimulés par le CMH de l'organisme dont ils font partie, ils s'attaquent aux cellules saines et provoquent une maladie auto-immune. Il faut donc que ces cellules soient éliminées. Les lymphocytes T quittent ensuite le thymus et, par la circulation sanguine, gagnent les territoires lymphoïdes secondaires. Les cellules T $\gamma\delta$ sont présentes surtout dans la peau et les muqueuses et, de manière moins importante, dans les organes lymphoïdes secondaires. Elles présentent la particularité de pouvoir être stimulées sans la reconnaissance des molécules du CMH alors que les cellules T $\alpha\beta$ ne reconnaissent les antigènes qu'en association avec les molécules de classe I ou II du CMH.

Les lymphocytes T, stimulés par des antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigène, prolifèrent et produisent des cytokines caractéristiques des réponses Th0, Th1 ou Th2. Certaines cellules, dont la majorité expriment le marqueur CD8+, entraînent la mort des cellules cibles.

1.5.1.3 Les cytokines

Les cytokines sont des protéines permettant la communication entre cellules. Même si le nombre de cytokines connues est très important, nous nous concentrerons dans ce travail, sur l'interféron- γ (IFN- γ), l'interleukine-4 (IL-4) et l'interleukine-10 (IL-10).

L'IFN- γ est une des cytokines produite lors de réponses Th1. Cette cytokine est produite par les « natural killer » et les lymphocytes T CD4 et CD8. Elle agit sur la différenciation des monocytes en macrophages. Elle induit l'expression des molécules du CMH de type I et joue un rôle prépondérant dans la destruction des parasites intracellulaires des macrophages en induisant la production de métabolites toxiques dérivés de l'oxygène et du monoxyde d'azote.

L'IL-4 est produite lors de réponses Th2. Elle est principalement produite par les lymphocytes T CD4+ et les mastocytes. Elle agit comme facteur de croissance des lymphocytes B et T, des mastocytes et des basophiles. Elle joue un rôle essentiel dans la production des anticorps de type IgE et IgG1 qui sont des anticorps produits lors d'hypersensibilité de type I chez la souris. Elle agit comme molécule inhibitrice sur les macrophages et intervient dans la régulation des mécanismes inflammatoires. L'IL-4 réduit la production d'IFN- γ par les « natural killer », par les cellules B et par les lymphocytes T.

Chez la souris, l'IL-10 est produite par les lymphocytes Th2. Elle est aussi produite par les monocytes et les lymphocytes B. Elle induit la différenciation des cellules B en plasmocytes et engendre une importante production d'anticorps. Elle inhibe la production d'IFN- γ . Elle agit également sur la présentation de l'antigène en altérant la costimulation des cellules T par le récepteur CD28⁽⁶²⁾. Par contre, l'IL-10 diminue la

migration des cellules de Langerhans épidermiques de la souris ⁽⁶³⁾. Il a aussi été démontré que les cellules dendritiques de type CD8 α - polarisent plus intensivement la réponse immunitaire vers Th2 en présence de l'IL-10 ⁽⁶⁴⁾.

Après une infestation de souris BALB/c par *I. ricinus*, les cellules des ganglions drainant le site de fixation des tiques produisent plus l'IL-10 que des cellules naïves, lors d'une restimulation à la conA *in vitro* ⁽⁶⁵⁾. Cette augmentation du taux d'IL-10 est plus prononcée lors d'infestations multiples. La déplétion des cellules TCD4+ réduit fortement la production d'IL-10 atteignant les valeurs des témoins négatifs. La production d'IL-10 est donc liée aux cellules TCD4+ des ganglions drainant des souris BALB/c lors de la piqûre de nymphes d'*I. ricinus*.

La salive des *Ixodidae* contient de la prostaglandine (PGE₂) ⁽⁶⁶⁾ ⁽⁶⁷⁾ qui bloque la production des cytokines Th1 mais n'affecte pas la production des cytokines Th2 ⁽⁶⁸⁾. Dans ce travail, nous avons utilisé de la salive contenant de la PGE₂. Nous avons éliminé cette substance des fractions chromatographiques d'EGS par ultrafiltration et dialyse. Ainsi, nous pouvons exclure un effet de la PGE₂ lorsque nous travaillons avec les fractions d'EGS.

1.5.2 La composante humorale

1.5.2.1 Les anticorps

Dans le système *I. ricinus* – BALB/c, la production d'anticorps de type IgG1 a été mise en évidence ⁽³⁴⁾.

Il a été démontré que les souris infestées par des nymphes d'*I. ricinus* produisent des anticorps contre une protéine de 25 kD tout comme les lapins infestés par des femelles de cette espèce ⁽⁶⁹⁾. Cette protéine est exprimée et excrétée dans la salive des nymphes et des adultes mais elle n'a pas été détectée chez les larves.

Les lapins développent progressivement une résistance contre les *I. ricinus* adultes lors d'infestations successives. Cette résistance est caractérisée par une prolongation du temps de repas, par un poids réduit des tiques gorgées et une production réduite du nombre d'œufs⁽³⁸⁾. L'immunité dure au moins 9 mois une fois acquise. Le titre d'anticorps circulants augmente chez le lapin. Le transfert de sérum de lapins résistants à des lapins susceptibles leur confère une immunité⁽⁷⁰⁾. Les IgG sont impliqués dans cette résistance et sont détectés dès le 6^{ème} jour de la première infestation⁽⁷¹⁾. Les lapins fortement infestés développent des titres d'anticorps plus élevés que les lapins faiblement infestés⁽⁷²⁾.

Le chien développe aussi des anticorps contre *I. ricinus*⁽⁷³⁾. Ces anticorps réagissent aussi avec les antigènes de *Dermacentor reticulatus*.

Le raton laveur développe une résistance contre *Ixodes scapularis* lors d'infestations répétées⁽⁷⁴⁾. Le taux d'anticorps spécifiques, détectés dans le sérum de ces animaux, augmente significativement. 90% des larves ne réussissent pas à se nourrir complètement sur ces animaux.

L'Homme produit des anticorps contre la calréticuline de tique lorsqu'il est piqué par *I. scapularis*⁽⁷⁵⁾. Ces anticorps ont été détectés par ELISA en utilisant de la calréticuline recombinante. Il existe une corrélation entre la présence d'anticorps dirigé contre *I. pacificus* et le risque d'infection par *B. burgdoferi* dont elle est le vecteur⁽⁷⁵⁾.

Deux cas d'anaphylaxie humaine ont été observés après piqûre de tique en Espagne⁽⁷⁶⁾. Afin de déterminer l'espèce responsable, des extraits de tiques molles et dures ont été utilisés dans un test cutané. Une réaction a été constatée pour certaines espèces de tiques dures seulement. Par ELISA et WB, un fort taux d'IgG spécifiques aux tiques dures a été révélé. Un des cas seulement s'est révélé positif pour les IgE. Les résultats immunologiques semblent désigner *I. ricinus* comme responsable des réactions anaphylactiques.

1.5.2.2 Le système complément

Il a été démontré une augmentation du C3 circulant (composant central du système complément) lors de l'infestation de lapins par des *Ixodes ricinus* adultes ⁽⁷⁷⁾. Lorsque l'on diminue la quantité du C3 chez les cochons d'Inde par injection de facteur de venin de cobra, l'immunité contre *D. andersoni* est diminuée ⁽⁷⁸⁾. Par contre, les cochons d'Inde déficients en C4 développent une résistance ⁽⁷⁹⁾, indiquant ainsi que seule la voie alterne est activée par la salive de tique. Lawrie et al. (1993) ont montré l'effet anti-complémentaire d'EGS d'*Ixodes* par des tests d'hémolyse. En particulier, *I. ricinus* inhibe la voie alterne du système complément chez l'Homme, le chevreuil, le hérisson et le pigeon, mais pas chez le chien ⁽⁸⁰⁾.

1.6 Buts du travail

La polarisation de la réponse anti-tique de la souris vers Th2 a été clairement mise en évidence. La nature des éléments de la salive de la tique a toujours été considérée comme le facteur déterminant de cette polarisation.

Nous désirons comprendre comment les cellules $T\gamma\delta$ et dendritiques de l'hôte contribuent à cette polarisation. L'induction de la réponse est particulièrement importante. Les cytokines produites lors d'un type de réaction Th1 ou Th2 inhibant l'autre, la polarisation est difficilement inversée une fois déterminée.

Avant d'étudier les principales cellules impliquées dans la polarisation de la réponse, nous examinons quels sont les tissus produisant de l'IL-4 durant l'infestation. Nous étudions la production de cytokines dans la peau (épiderme et derme). La peau est le premier tissu en contact avec les antigènes salivaires de tiques. Les cellules $T\gamma\delta$ n'ont pas besoin que l'antigène leur soit présenté en association avec les molécules du CMH des cellules présentatrices d'antigène pour être stimulées. Elles représentent la majorité des lymphocytes T de l'épiderme.

Les ganglions et la rate sont également impliqués dans la réponse immunitaire anti-tique. Les cytokines produites par ces organes nous informent sur l'induction et la polarisation de la réponse.

De nombreuses études ont été réalisées sur les lymphocytes dans leur ensemble et particulièrement sur les lymphocytes T. Cependant, ces études se focalisaient sur les conséquences et non les causes de la polarisation Th2. Nous voulons connaître l'évolution de la production de cytokines dans les ganglions drainant le site de fixation des tiques. Comme la rate réagit fortement, nous déterminons les cellules responsables de la production d'IL-4. L'étude des populations cellulaires séparées nous permet d'atteindre ce but.

Les récents progrès de la connaissance des cellules dendritiques montrent leur capacité à polariser la réponse en amont de la chaîne de réactions immunitaires.

Les cellules dendritiques jouent un rôle important dans la stimulation, la régulation et la polarisation de la réponse des cellules T. C'est pour cette raison que nous les avons étudiées dans le système souris *I.ricinus*. Nous pensons que si les composants de la salive de tique restent essentiels à la polarisation de la réponse, il se peut que la nature des cellules immunitaires impliquées dans cette réponse chez la souris contribue aussi à la polarisation Th2. Par conséquent, nous avons étudié l'influence des différentes populations de cellules dendritiques dans cette polarisation.

L'effet des cellules dendritiques est indirect. Elles influencent la réponse des cellules T. Il est nécessaire d'observer le comportement de ces lymphocytes pour évaluer l'importance des cellules dendritiques. Nous avons élaboré une stratégie de « pulsing » des cellules dendritiques *in vitro*. Le fait de mettre les cellules dendritiques isolées en présence de l'antigène *in vitro* nous permet d'exclure l'intervention d'autres cellules lors de la réaction des cellules dendritiques avec les antigènes. Ce n'est qu'après les avoir injectées à des animaux naïfs que nous pouvons observer l'effet des cellules dendritiques sur les cellules T. De plus, nous pouvons isoler les différentes sous-populations de cellules dendritiques. La

polarisation de la réponse des cellules T est observée, pour les cellules dendritiques CD8 α +, CD4+ et CD8 α -/CD4-.

Comme il est connu que nous pouvons constater des différences de polarisation selon les sous-populations de cellules dendritiques utilisées, nous avons pulsé ces cellules avec différentes fractions chromatographiques d'EGS d'*I. ricinus*. Ceci nous permet de mieux déterminer les protéines activant les cellules dendritiques. Les fractions chromatographiques sont composées d'une diversité plus faible de protéines que l'EGS complet. Il est ainsi plus facile de distinguer les protéines responsables de la réaction des cellules dendritiques.

2. Matériel et méthodes

2.1 Matériel

2.1.1 Souris



Fig. 9 : Souris BALB/c femelles

Les souris utilisées pour les différentes expériences sont des femelles de souche BALB/c/CBYJICO (fig 9) âgées de 5 semaines et provenant des laboratoires Charles River (Iffa Credo), Domaine des Oncins / BP 0109, Saint-Germain sur L'Arbresle, 69592 L'Arbresle (France)

2.1.2 Lapins

Les lapins nécessaires à la nutrition des tiques adultes appartiennent à la souche N.Z.W. et proviennent de l'Élevage scientifique des Dombes, ROMANS, 14000 Chatillon-sur-Chalaronne (France). Ce sont des mâles âgés d'environ 4 mois et pesant au moins 3 kg.



Fig. 10 : Lapins N.Z.W utilisés pour la nutrition des tiques *I. ricinus*. Ici en conditions stériles à l'élevage scientifique des Dombes. Photo de l'élevage scientifique des Dombes (France)

2.1.3 Tiques

Les tiques utilisées dans ce travail sont des larves et des femelles d'*I. ricinus* élevées en laboratoire ⁽³¹⁾.



Fig 11 : Femelle et larve d'*I. ricinus*.

2.1.4 « Thermocycler » (appareil à PCR)

Les PCR et les rétrotranscriptions sont effectuées à l'aide d'un « thermocycler » Eppendorf de type « Mastercycler personnel ».

2.1.5 Compteur à scintillation

Nous effectuons les mesures d'incorporation de thymidine tritiée à l'aide d'un compteur à scintillation de type Kontron MR 300.

2.1.6 Lecteur ELISA

Le lecteur ELISA utilisé est de type Dynatech MR 7000.

2.1.7 Incubateur

L'incubateur pour la culture cellulaire est de type Hera cell.

2.1.8 Chromatographie

Le dispositif est un FPLC ®, Pharmacia ® (fig 12) constitué de deux pompes



Fig. 12 : FPLC ®. Pharmacia

connectées à un contrôleur de type LCC-500, d'une colonne MonoQ 5/5[®] et d'un collecteur de fractions.

2.2 Méthodes

2.2.1 Infestation des lapins

Les tiques sont maintenues dans des tubes en verre dont le bouchon plastic est percé d'une multitude de trous permettant à l'air de circuler. Les tubes sont placés à l'intérieur d'une boîte, laquelle contient également un récipient ouvert rempli d'eau pour assurer une atmosphère suffisamment humide.

Pour éviter que les tiques ne s'échappent des tubes lors de leur ouverture, ces derniers sont préalablement placés dans de la glace pilée environ 15 minutes avant l'infestation. Le froid diminue l'activité des tiques.

Afin d'obtenir de la salive d'*I. ricinus* et d'en disséquer les glandes salivaires, les femelles sont partiellement gorgées sur des lapins qui n'ont encore jamais été piqués par des tiques. Nous plaçons des fourreaux en tissu sur les oreilles du lapin. Nous prenons soin de bien les fixer à l'aide de bande adhésive en tissu. Nous introduisons 40 femelles et une dizaine de mâles par oreille. Les mâles se nourrissent rarement mais servent à stimuler les femelles et les incitent à se gorger. Les fourreaux sont fermés à l'aide du tissu adhésif. Une minerve est placée autour du cou du lapin pour éviter qu'il n'arrache les fourreaux en se grattant. Entre la collerette et le cou du lapin, il faut pouvoir introduire un doigt mais pas davantage. Pendant toute l'opération de placement des tiques, le lapin est maintenu emmaillotté dans un linge éponge. Il est important que ce dernier soit replié sous le lapin pour lui maintenir les pattes arrières et éviter qu'il ne se blesse le dos.

On laisse les tiques se nourrir de sang pendant 5 jours et demi. Après cette période, le lapin est de nouveau placé dans le linge éponge et la collerette enlevée. Nous ôtons les fourreaux et récupérons les tiques détachées qui sont généralement peu nombreuses. Les tiques encore fixées sur les oreilles sont prélevées à l'aide d'une

pince à tique de la Migros (fig. 13) en les faisant tourner. Ainsi, le rostre est généralement intact.



Fig 13 : Pince à tique.

2.2.2 Infestation des souris

Les tubes de larves d'*I. ricinus* sont maintenus dans les mêmes conditions que les tubes d'adultes. Ils sont également placés dans la glace pilée pour éviter que les larves ne s'échappent lors de l'ouverture des tubes.

Avant l'infestation, les souris sont anesthésiées à l'aide de 0.04 ml d'un mélange de Xylasol ® et Narketan ® en proportion 5 :8. Le tour des oreilles est ensuite tondu.

Deux tubes Eppendorf™ de 0.5 ml dont le bouchon et la partie conique ont été coupés sont fixés autour des oreilles à l'aide d'un mélange de colophonium et de cire d'abeille (4 :1) préalablement fondu au bain-marie. 10 larves par oreille sont introduites dans les tubes à l'aide d'une pince. Une collerette en linoléum est placée autour du cou de la souris pendant tout le temps de l'infestation. Les souris infestées sont maintenues isolément dans des cages de type Macrolon I, lesquelles sont placées dans un bac d'eau pour récolter d'éventuelles larves échappées.

2.2.3 Mise à mort des souris

Les souris sont mises à mort par dislocation des vertèbres cervicales.

2.2.4 Dissection des souris

Lors de la dissection des souris, nous prélevons les ganglions drainants (ganglions cervicaux) qui augmentent de volume lors d'une infestation, les oreilles pour examiner l'épiderme et le derme au site de fixation des larves, ainsi que la rate. Les souris témoins ont subi les mêmes opérations mais n'ont pas été infestées.

2.2.5 Récolte de la salive d'*I. ricinus*

Les femelles *I. ricinus* nourries 5 jours et demi sur un lapin naïf sont collées sur un papier adhésif. Dans l'hémocoèle, nous leur injectons environ 5 µl d'une solution de PBS (NaCl 0.14 M, Na₂HPO₄ 8.35 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM et KCl 2.7 mM, pH7), dopamine (3-hydroxytyramine hydrochloride) 0.02 % (Fluka™) à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille fine (Microlance 3 30GA1/20.3x13, Becton Dickinson)⁽¹¹⁾. La solution de dopamine est préparée fraîchement et conservée dans la glace à l'abri de la lumière. Un capillaire de type Duran ® Ringcaps (Hirschmann Laborgeräte) coupé en pointe est alors placé autour du rostre en prenant soin de ne pas inclure les palpes. La salive est récoltée dans le capillaire. Lorsque le niveau est satisfaisant (environ 10 minutes après l'injection de la dopamine) le contenu du capillaire est récupéré dans un tube de 0.5 ml plongé dans la glace pilée. Il ne faut pas espérer récolter plus de 3 µl de salive par tique en moyenne. Dans les concentrations utilisées, la dopamine n'engendre pas d'interférence sur la prolifération cellulaire et la production de cytokine, comme démontré *in vitro* (Mejri, communication personnelle).

2.2.6 Extrait protéique de glandes salivaires d'*I. ricinus* (EGS)

Nous prenons les glandes salivaires des tiques utilisées pour la salivation. La tique est fixée à l'aide d'une épingle sur de la cire. La cuticule est alors découpée de manière radiale à l'aide d'une lame de rasoir. La partie dorsale de la cuticule est enlevée ainsi que l'intestin. La paire de glandes salivaires, alors visible sous la forme de grappes de raisin, est prélevée délicatement et plongée dans une solution PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10mM, K_2HPO_4 40mM, NaCl 120mM, pH7.4), PMSF (phenyl-methylsulphonyl-fluorid 1mM, EDTA 1mM) à 4°C à raison de 60 paires de glandes salivaires par ml de solution. Le tout est broyé à l'aide d'un homogénéisateur pour tube Eppendorf™ et centrifugé à 10'000 g pendant 20 min. Le surnageant est dialysé une nuit contre 3 litres de tampon (Tris 20mM, NaCl 50mM, pH 7.5) à l'aide d'une membrane de type Spectrapor® CE MWCO 3000. L'extrait est conservé à -20°C.

2.2.7 Dosage des protéines de l'EGS

Le dosage des protéines s'effectue par le test BCA (BCA Protein Assay kit, Pierce) selon le protocole pour microplaque du fournisseur. Chaque échantillon est testé 2 fois à 4 concentrations différentes. La concentration finale est de 40 mg/ml.

2.2.8 Fractionnement de l'EGS par chromatographie

L'EGS est fractionné par FPLC ®. Les pompes A et B sont respectivement remplies des tampons A (20mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl) et B (20mM Tris-HCl pH 7.5, 600mM NaCl). La colonne est équilibrée et activée par la méthode d'activation (voir annexe). Ces conditions ont déjà été utilisées dans des travaux antérieurs ⁽³¹⁾, ⁽³⁴⁾.

0.5 ml d'EGS dont la concentration protéique est de 40 mg/ml sont dilués dans 2 ml de tampon A. Cette solution est filtrée à travers un Acrodisc® de 0.2 µm de porosité, puis introduite dans une boucle d'échantillon de 2 ml et injectée dans la colonne à l'aide de la méthode de charge de l'échantillon (voir annexe). Les protéines qui

n'interagissent pas avec la matrice échangeuse d'anions sont éluées. Il est important de laver la colonne avec le tampon A jusqu'à ce que la ligne de base soit atteinte.

L'éluion des protéines fixées peut commencer. Nous utilisons un gradient linéaire en NaCl de 50 mM à 600 mM en 20 ml. Nous récupérons 40 fractions de 0.5 ml selon la méthode décrite dans l'annexe.

2.2.9 Dialyse des fractions

Les 40 fractions obtenues par FPLC® doivent être dialysées pour éliminer le Tris et le surplus salin. Le Tris inhibe la prolifération cellulaire et la production de cytokines en culture (Mejri, communication personnelle). Nous utilisons une membrane de type Spectrapor® CE 3000 et un tampon PBS 50 mM pH 7.4. La dialyse dure une nuit à 4°C contre 3 litres de tampon.

2.2.10 Concentration des fractions

Après un dosage des protéines par BCA, Pierce®, les fractions sont concentrées 10 fois pour atteindre une concentration optimale à la stimulation cellulaire déterminée dans un travail antérieur (100µg/ml)⁽⁹⁾. Nous les concentrons à l'aide de tubes de microfiltration de type VectaSpin Micro (MWCO 12 K), Whatman®. Le protocole du fabricant est suivi à la lettre.

Les mêmes fractions ainsi obtenues ont été utilisées pour tous les tests.

2.2.11 Enrichissement des cellules dendritiques

3 souris sont disséquées et leurs rates sont prélevées. Elles sont directement immergées à 4°C dans une solution de Hank's (HBSS sans calcium ni magnésium, Gibco BRL®) selon les conseils du fournisseur du kit d'enrichissement cellulaire StemSep®. Les rates sont dilacérées à l'aide d'une pince dans 10 ml de HBSS. La suspension cellulaire est centrifugée 10 min à 210 g à 4°C. Le surnageant est jeté et

le culot resuspendu dans 10 ml d'ACK (NH_4Cl 0.15M, KHCO_3 1mM; Na_2EDTA 0.1mM, pH 7.4). Cette suspension est centrifugée 10 min à 210 g à 4°C. Le culot est resuspendu dans du HBSS, 5 % FCS, 1mM EDTA (milieu de séparation). La suspension est passée à travers un filtre nylon de type « Toile bluter nylon », maille 37 μm , Polylabo® pour éliminer les agglomérats de cellules et les débris de tissu conjonctif. Les étapes de centrifugation, resuspension dans le milieu de séparation et filtration sont répétées jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Nous opérons ensuite un prélèvement de 10 μl de la suspension que nous mélangeons avec une solution de bleu Trypan 0.4 %, Sigma®. Les cellules vivantes sont comptées à l'aide d'une cellule de Neubauer et un microscope inversé (Olympus) avec filtre vert, au grossissement 100x. La densité de la suspension cellulaire est ajustée à $5 \cdot 10^7$ cellules par ml de milieu de séparation. Cette suspension est placée 15 min à 4°C. Nous ajoutons ensuite 10 μl de « cocktail for murine mature dendritic cell enrichment », Stemsep® par ml de suspension cellulaire. Nous mélangeons soigneusement et plaçons la suspension à 4°C pendant exactement 15 min. Pendant ce temps d'incubation, les cellules indésirables sont marquées par les anticorps biotinylés présents dans le cocktail (fig 15 A et B). La suspension est lavée (centrifugation à 210 g et resuspension dans le milieu de séparation). La densité doit rester aux alentours de $5 \cdot 10^7$ cellules par ml. Nous ajoutons 100 μl d'anticorps tétramérique anti-biotine, Stemsep® par ml de suspension cellulaire (fig 15 A et B). Nous mélangeons soigneusement et plaçons la suspension à 4°C pendant 15 min.

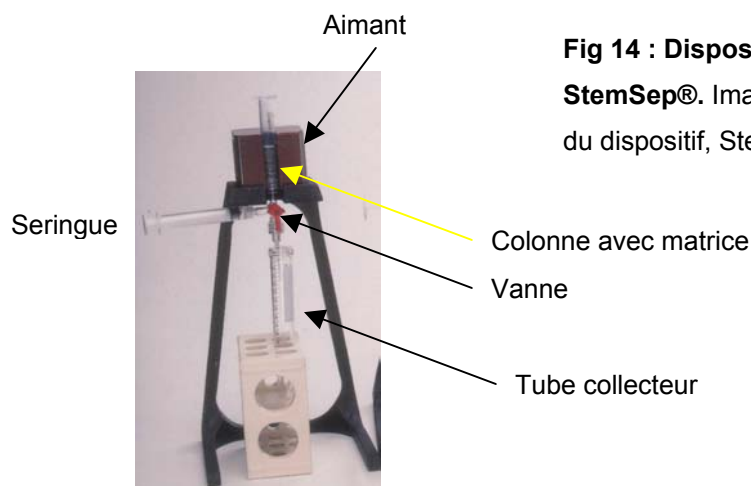


Fig 14 : Dispositif de séparation cellulaire StemSep®. Image tirée du manuel d'utilisation du dispositif, StemCep®.

60 μl de colloïde magnétique, Stemsep® sont ajoutés (fig 15 A et B). La suspension

incubée pendant 15 minutes à 4°C sous une légère agitation (agitateur alternatif). Pendant l'incubation la colonne de séparation Stemsep® est montée (voir fig. 14).

Nous remplissons la colonne de milieu de séparation via la seringue en éliminant toutes les bulles qui seraient emprisonnées dans la matrice métallique. Nous lavons la colonne avec 8 ml de milieu de séparation. La colonne ne doit sécher à aucun

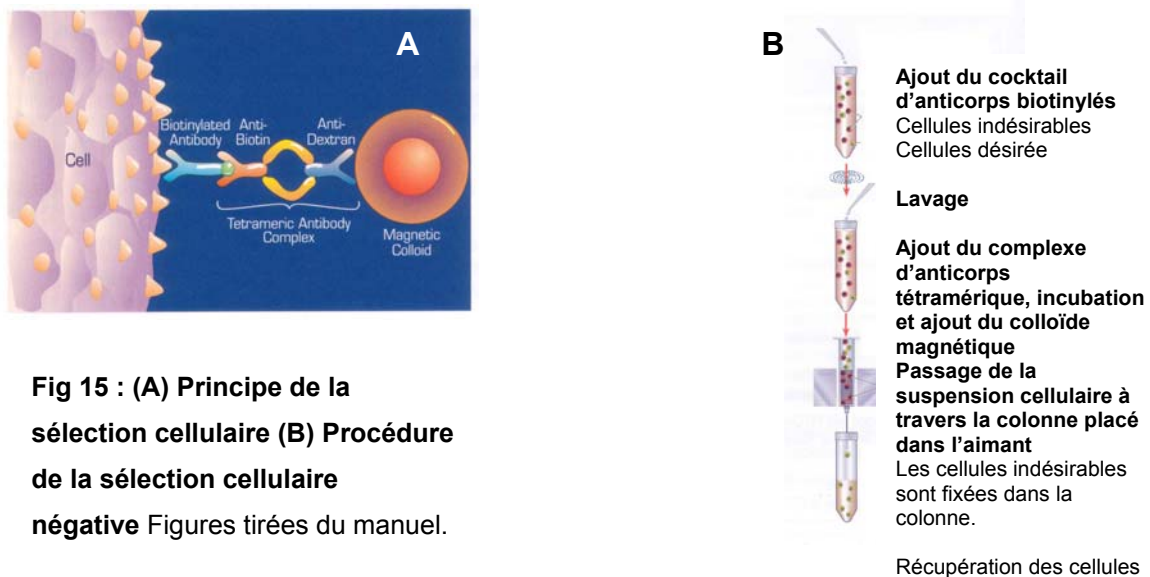


Fig 15 : (A) Principe de la sélection cellulaire (B) Procédure de la sélection cellulaire négative Figures tirées du manuel.

moment. Nous ajustons le niveau de milieu de séparation à celui de la matrice métallique. Nous chargeons la suspension cellulaire en haut de la colonne. Nous laissons ensuite l'éluat couler dans un tube collecteur (fig 14) et ajoutons 8 ml de milieu de séparation sur la colonne. L'éluat contient les cellules désirées (voir fig. 15 B). Les cellules sont à nouveau comptées et ajustées à une densité de $5 \cdot 10^7$ cellules par ml. Toutes les opérations sont répétées une fois pour obtenir une pureté de cellules supérieure à 90 % en accord avec le fournisseur du kit.

2.2.12 Enrichissement des sous-populations de cellules dendritiques

A partir d'une suspension de 10^7 cellules dendritiques enrichies par ml (chap 2.2.11), la sélection des cellules dendritiques CD8 α ⁺ se fait en ajoutant 20 μ g d'anticorps IgG purifié de rat anti-CD8 α ⁺ murin, Pharmingen®. Nous incubons le tube à 4°C pendant 45 min sous légère agitation (agitateur alternatif) afin de favoriser le contact entre les cellules et les anticorps. Nous centrifugeons la suspension à 210 g 10 min.

Nous jetons le surnageant et resuspendons le culot dans le même volume de milieu de séparation. Nous introduisons $8 \cdot 10^6$ billes magnétiques de type Dynabeads® M-450 revêtues d'anticorps de mouton anti-IgG de rat par ml de suspension. La suspension est incubée 45 min à 4°C sous légère agitation. Le tube est placé dans un aimant Dynal® adapté à son volume. Le surnageant récupéré contient les cellules dendritiques qui n'expriment pas le marqueur CD8 α à leur surface. Le culot retenu dans le tube par l'aimant contient les cellules dendritiques CD8 α +. Pour l'enrichissement des cellules dendritiques CD8 α - CD4+, nous repartons du surnageant et recommençons une isolation en remplaçant le premier anticorps par un anticorps IgG de rat anti-CD4 murin. Le culot final contient par conséquent les cellules dendritiques CD8 α - CD4+ et le surnageant les cellules dendritiques CD8 α - CD4-.

2.2.13 « Pulsing » et injection des cellules dendritiques

Les suspensions de cellules dendritiques sont centrifugées à 210 g pendant 10 min à 4°C. Elles sont resuspendues à une densité de 10^5 cellules par ml dans du milieu RPMI complet (RPMI 1640 Gibco BRL®, 10% Sérum fœtal de veau (FCS) Gibco BRL®, 2mM L-glutamine Gibco®, 1mM pyruvate de sodium, 1% acides aminés non essentiels Gibco BRL®, 0.05mM 2-mercaptoéthanol Sigma®, 10 U/ml Pénicilline/Streptomycine KCbiological®, 0.25 μ g/ml Fungizone Gibco BRL®). Ces suspensions sont réparties dans une microplaque 96 puits à raison de 100 μ l par puits. Les puits périphériques sont remplis de milieu. Nous introduisons 10 μ l d'EGS ou de fractions correspondant à 10 μ g de protéines ou 3 μ l de salive. La microplaque est placée dans l'incubateur pendant 24 h à 37°C et 5% CO₂. Le contenu de chaque puits est récupéré en décollant les cellules adhérentes à l'aide de la pointe de la pipette et centrifugé à 210 g 10 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans 50 μ l de PBS 50 mM pH7.4. Les suspensions sont injectées aux souris de manière sous-cutanée sur la nuque.

2.2.14 Prélèvement de la peau et séparation de l'épiderme et du derme

L'endroit le plus adapté au prélèvement et à la séparation de l'épiderme et du derme chez la souris est l'oreille. Le fait qu'il n'y ait pas de poil évite le rasage qui pourrait engendrer une réaction non spécifique due à l'abrasion.

Nous prélevons les oreilles de 5 souris pour obtenir suffisamment de cellules pour la séparation cellulaire, la mise en culture ou l'extraction de l'ARN. Les oreilles sont immergées dans du HBSS, puis brièvement plongées dans de l'éthanol 70% et immergées dans du HBSS. L'oreille est séparée en deux parties dorsale et ventrale, dans le sens de l'épaisseur. Le cartilage de l'oreille reste collé à la partie ventrale qui est éliminée. La partie dorsale est étendue face interne collée à un couvercle de microplaque. Il est important que la peau ne se dessèche pas. L'opération prend environ 5 min. Les peaux sont alors placées en flottation sur une solution de trypsine (Sigma, Type XI) à 0.2 % dans du HBSS pendant 30 min à 37°C. Les peaux sont à nouveau étendues face interne contre le bas sur un couvercle de microplaque en plastique. A l'aide de deux pinces, l'épiderme est séparé du derme. Les deux tissus peuvent être récupérés. Pour préparer les cellules de l'épiderme, il convient de couper ce dernier en fines lamelles que nous broyons sur un treillis métallique en inox, Cell dissociation sieve tissu grinder kit, Sigma ®. Ensuite, le broyage mécanique sur treillis métallique avec un pistil en verre permet d'isoler les cellules.

2.2.15 Enrichissement des cellules T $\gamma\delta$ et des cellules de Langerhans

Pour isoler les cellules T $\gamma\delta$, nous utilisons une sélection positive à partir des cellules de l'épiderme ou de la rate, le kit Dynal ® de sélection négative ne nous permettant pas d'isoler cette population cellulaire. La population des cellules T $\gamma\delta$ dans la rate est très minoritaire. Nous ajustons la densité de cellules à $5 \cdot 10^7$ cellules par ml de tampon HBSS, 5 % FCS, 1 mM EDTA. Nous introduisons 20 μg d'anticorps IgG biotinylés de Hamster anti- $\gamma\delta$ murin, Pharmingen ® par ml de suspension. Nous plaçons le tube 45 min à 4°C sous légère agitation, puis centrifugeons la suspension à 210g 10 min à 4°C et jetons le surnageant. Nous resuspendons le culot dans le même volume et ajoutons $4 \cdot 10^6$ Dynabeads ® M-280 revêtue de streptavidine.

Les cellules de Langerhans sont enrichies en utilisant le kit StemSep®. Une suspension cellulaire ajustée à $5 \cdot 10^7$ cellules est incubée 15 min à 4°C. Nous introduisons 10 µl de « cocktail for murine mature dendritic cell enrichment », StemSep® par ml de suspension. Nous mélangeons soigneusement et plaçons la suspension à 4°C pendant exactement 15 min. Pendant ce temps d'incubation, les cellules indésirables sont marquées par les anticorps biotinylés présents dans le cocktail (fig 15 A et B). La suspension est lavée (centrifugation à 210 g et resuspension dans le milieu de séparation). La densité doit rester aux alentours de $5 \cdot 10^7$ cellules par ml. Nous ajoutons 100 µl d'anticorps tétramérique anti-biotine, Stemsep® par ml de suspension cellulaire (fig 15 A et B). Nous mélangeons soigneusement et plaçons la suspension à 4°C pendant 15 min. 60 µl de colloïde magnétique, Stemsep® sont ajoutés (fig 15 A et B). La suspension incubée pendant 15 min à 4°C sous une légère agitation (agitateur alternatif). Pendant l'incubation la colonne de séparation Stemsep® est montée (voir fig. 14).

Nous remplissons la colonne de milieu de séparation via la seringue en éliminant toutes les bulles qui seraient emprisonnées dans la matrice métallique. Nous lavons la colonne avec 8 ml de milieu de séparation. La colonne ne doit sécher à aucun moment. Nous ajustons le niveau de milieu de séparation à celui de la matrice métallique (environ 1.5 ml de tampon). Nous chargeons la suspension cellulaire. Nous laissons ensuite l'éluat couler dans un tube collecteur (fig 14) et ajoutons 8 ml de milieu de séparation sur la colonne. L'éluat contient les cellules désirées (voir fig 15 B). Les cellules sont à nouveau comptées et ajustée à une densité de $5 \cdot 10^7$ cellules par ml. Toutes les opérations sont répétées une fois pour obtenir une pureté de cellules supérieure à 90 %.

2.2.16 Enrichissement des cellules TCD4 et TCD8

Pour l'enrichissement des deux populations de cellules, nous suivons exactement le même protocole que pour les cellules dendritiques sauf que les cocktails d'anticorps utilisés sont respectivement le « cocktail for murine CD4 T cells enrichment » et le

« cocktail for murine CD8 T cells enrichment » Stemsep ®. Nous ajustons la densité à $5 \cdot 10^7$ cellules par ml de suspension dans du HBSS, 5%FCS, 1 mM EDTA. Nous plaçons les deux tubes à 4°C. Nous ajoutons 10 µl de cocktail pour l'enrichissement des cellules TCD8+ par ml de suspension. Nous mélangeons soigneusement et laissons incuber à 4°C pendant 15 min exactement. Nous centrifugeons à 210 g pendant 10 min à 4°C. Nous jetons le surnageant. Nous resuspendons les cellules dans du HBSS 5 % FCS, 1 mM EDTA. Nous centrifugeons à nouveau à 210 g pendant 10 minutes à 4°C. Nous resuspendons les cellules dans du HBSS 5 % FCS, 1 mM EDTA. 100 µl d'anticorps tétramérique anti-biotine sont ajoutés par ml de suspension. Le tout est mélangé soigneusement et incubé 15 min à 4°C. Enfin, nous ajoutons 60 µl de colloïde magnétique par ml de suspension. Nous laissons incuber à 4°C pendant 15 min sous légère agitation (agitateur alternatif). La suite se déroule avec le Kit Stemsep (chap 2.2.11).

2.2.17 Culture cellulaire

Les cellules sont mises en culture 5 jours à 37°C et 5% CO₂ dans les puits d'une microplaque (Falcon ®, 3072) avec couvercle à raison de 100 µl de culture par puits. Les puits périphériques sont remplis de milieu RPMI complet.

2.2.18 Test de prolifération cellulaire

Le protocole décrit dans un travail antérieur est suivi ⁽⁹⁾.

Après 72h de culture cellulaire, 10 µl de RPMI complet contenant l'équivalent de 1µCi de thymidine tritiée (1µCi/µl, activité spécifique : 25 Ci/mmol), Amersham Pharmacia Biotech ® sont ajoutés par puits. 24 heures après l'ajout de la thymidine tritiée, le contenu des puits est récupéré dans des tubes de 0.5ml. Nous centrifugeons les tubes 15 min. à 14000rpm (centrifugeuse 5417 R, Eppendorf). Nous récoltons le surnageant que nous plaçons à – 20°C pour un dosage de cytokines par ELISA (chap 2.2.19). Le culot est resuspendu dans 150µl de SDS (sodium dodécyl sulfate) 1% et agité au « vortex » . Les suspensions subissent 3 min

d'ultrasons dans un bain (Elmi, Transsonic Digital) à pleine puissance. Les cellules libèrent ainsi leur ADN. Les suspensions sont ensuite déposées sur des disques en fibre de verre (22 mm de diamètre). Nous effectuons un premier lavage des filtres dans un bain d'acide trichloroacétique (TCA) 10% pendant 15 min à 4°C (volume de TCA = nombre de filtres x 10 ml). Puis, nous lavons les filtres à deux reprises dans un bain d'éthanol 80% pendant 15 min à 4°C puis dans un bain d'éthanol absolu pendant 15 min à température ambiante. L'ADN est ainsi fixé sur les disques et lavé. Il faut ensuite sécher les filtres pendant 15 min au moins en les disposant sur un papier buvard et en ménageant un léger courant d'air. Nous plaçons les filtres séparément dans des vials de comptage à scintillation (Life System Design) et ajoutons 2ml de liquide à scintillation (0.5 % de 2,5-diphényloxazol (PPO), 0.01 % de 2,2'-p-phényl-bis-(5-phényloxazol) (POPOP) dans du toluène). Les vials sont placés 1 heure à 4°C puis dans le compteur à scintillation.

Les paramètres du compteur à scintillation figurent en annexe.

Le résultat du témoin négatif est soustrait des valeurs obtenues sur les échantillons testés.

2.2.19 Dosage des cytokines par ELISA

Les cytokines présentes dans les surnageants de culture sont dosées par ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Pour chaque cytokine, le mode opératoire est le même. Seul l'anticorps primaire, biotinylé et le standard changent. Les anticorps de rats anti-cytokines murines purifiés (Pharmingen ®) sont dilués dans le « coating buffer » (0.1M NaHCO₃, pH 8.2) à une concentration de 4µg/ml. Nous distribuons 100µl de cette solution dans les cupules d'une microplaque pour test ELISA (Immulon, Dynatech ®). Le temps de fixation est d'une nuit à 4°C. La plaque est ensuite lavée 2 fois avec 200µl/puits de tampon PBS (0.14 M NaCl, 8.35 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, pH7.0)-Tween 20 (Sigma) 0.05%. A la fin des lavages, nous évacuons le liquide de rinçage en tapant la plaque sur un papier

absorbant. Dans chaque puits, nous plaçons 200µl de tampon PBS-FBS 10% pour saturer les sites de fixation libres de la microplaque. L'incubation dure 2 heures à température ambiante. Nous effectuons ensuite 3 lavages, après quoi nous introduisons 100µl de surnageant de culture non dilué ou 100µl des standards (cytokines recombinantes, Pharmingen ® et stockées à une concentration de 50 µg/ml). La courbe des standards est une dilution de 1/400 à 1/ 25600 dans du PBS-FBS 10%) et comprend les témoins négatifs (incubation avec du tampon de dilution seul). L'incubation prend une nuit à 4 °C. Ensuite, nous effectuons 3 lavages. Les anticorps anti-cytokines biotinylés sont dilués à 2µg/ml dans du PBS-FBS 10%. 100µl/puits de cette solution sont introduits y compris dans les puits de la courbe standard. La plaque est incubée 45 minutes à température ambiante. 3 lavages sont à nouveau opérés. L'avidine-peroxydase, Sigma ® (conservée à une concentration de 0.1 % dans du glycérol 50%) est diluée 400x dans du PBS-FBS, puis cette solution est répartie à raison de 100µl/puits. La plaque incube 30 min à 37°C. 4 lavages suivent cette étape. Nous préparons une solution fraîche contenant 0.03 % d'ABTS (Sigma ®) dans de l'acide citrique 0.1M, pH 4.35 et 0.1 % H₂O₂. Nous répartissons cette solution à raison de 100µl/puits. Nous laissons incuber la plaque 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. La plaque est lue à une longueur d'onde de 405nm. Cette méthode permet l'évaluation de concentration se situant entre 0.156.25 et 10 ng/ml.

2.2.20 Extraction d'ARN

2.2.20.1 Extraction d'ARN à partir de tissus

Les tissus prélevés sont directement plongés dans 1 ml de solution de stabilisation de l'ARN (RNAlater ®, Qiagen ®). Nous évitons ainsi une dégradation de l'ARN. Pour obtenir assez de matériel, nous avons utilisé une rate, 2 ganglions ou 2 oreilles pour l'épiderme et le derme par test. Les échantillons sont conservés à 4°C moins d'une semaine. Les échantillons sont incubés 30 min à température ambiante et centrifugés 5 min à 210 g. La solution de stabilisation de l'ARN est éliminée par pipetage. L'ARN est extrait à l'aide du kit d'extraction d'ARN Purescript ® , Gentra™

selon le protocole du fabricant. L'homogénéisation des tissus dans 300 µl de tampon est accélérée grâce à l'usage d'un pistil pour tube, (Polylabo), tubes « Rnase free » (Axygen). Le culot d'ARN récolté est dilué dans 30 µl d'eau sans Rnase (Gentra) est conservé à – 20°C.

2.2.20.2 Extraction d'ARN à partir de cellules isolées de tissus ou de culture cellulaire

10⁵ cellules sont centrifugées à 210 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et 1 ml de solution de stabilisation d'ARN (RNAlater, Qiagen) est ajouté dans le tube. L'échantillon est conservé à 4°C moins d'une semaine. L'échantillon est ensuite centrifugé à 210 g pendant 5 min à température ambiante. La solution de stabilisation de l'ARN est éliminée. L'ARN est extrait à l'aide du kit Rneasy mini®, Qiagen® en suivant le protocole pour l'extraction d'ARN à partir de cellules provenant de culture. Quelques modifications sont toutefois apportées. Le β-mercaptoéthanol n'est pas ajouté à la solution de lyse cellulaire. La lyse cellulaire est avantageusement effectuée à l'aide d'un Qiashreder®, Qiagen®. L'élution se fait dans 30 µl d'eau passés deux fois sur la colonne. La solution d'ARN obtenue est conservée à –20°C.

2.2.21 Rétrotranscription

La rétrotranscription s'effectue grâce au kit Omniscript®, Qiagen®. L'usage d'un inhibiteur de Rnase n'est pas nécessaire. Afin de rétrotranscrire les brins d'ARN messagers nous utilisons comme amorces une chaîne de 15 thymidines (oligo dT15), Microsynth®. Le volume final de la rétrotranscription est de 20 µl. Habituellement, une réaction est effectuée avec 5µl d'ARN.

La qualité de l'ADN complémentaire (ADNc) est testée par amplification par PCR d'une partie du gène constitutif de l'HPRT (chap 2.2.23.1). S'il apparaît une traînée d'ADN sur le gel, la quantité d'ARN utilisée au départ était trop importante. Dans ce cas la rétrotranscription est recommencée avec moins d'ARN. Si le signal est trop faible, nous utilisons le kit Sensiscript®, Qiagen® pour recommencer la transcription

inverse avec 5 µl d'ARN. Ce kit permet la rétrotranscription de faibles quantités d'ARN avec un bon rendement, mais ne permet pas de « rétrotranscrire » de fortes quantités d'ARN. Les échantillons suivants ont été traités avec le kit Sensiscript® : l'épiderme à 18, 72 et 120 heures d'infestation ; le derme à 120 heures d'infestation ; la rate à 12 heures d'infestation.

L'ADNc obtenu est stocké à – 20°C.

2.2.22 Préparation des compétiteurs

2.2.22.1 Polycompétiteur pour l'IL-4, l'IFN-γ et l'HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase)

La production du compétiteur pPQRS⁽⁸¹⁾ a été réalisée par N. Franscini (travail de diplôme).

2.2.22.2 Polycompétiteur pour l'IL-10

Le compétiteur pour l'IL-10⁽⁸²⁾ nous a été offert par L. Mbow. La quantité de départ du compétiteur a été déterminée par spectrophotométrie.

2.2.23 PCR compétitive semi-quantitative

2.2.23.1 Test de la rétrotranscription par PCR

Il s'agit d'un test préliminaire pour voir si nous avons suffisamment d'ADNc dans nos échantillons.

La composition du « master mix », les amorces ciblant le gène de l'HPRT et les cycles d'amplification se trouvent en annexe.

2.2.23.2 PCR compétitive semi-quantitative pour l'IL-4, l'IFN- γ , l'IL-10 et l'HPRT

La composition du « master mix » pour un tube, les amorces et les cycles se trouvent en annexe.

Pour chaque tube, nous ajoutons 2 μ l d'ADNc (dilué de manière à obtenir une concentration permettant l'évaluation semi-quantitative. Pour l'IL-4, l'IFN- γ ou l'IL-10, il faut généralement diluer l'ADNc 1 à 4 et pour l'HPRT 1 à 100 dans de l'eau stérile. Le gène de l'HPRT étant plus exprimé que le gène de l'IL-4, de l'IFN- γ ou de l'IL-10, nous diluons plus les échantillons lorsque nous quantifions l'HPRT. 2 μ l de compétiteur sont ajoutés par tube (0.1 ; $5 \cdot 10^{-2}$; 10^{-2} ; $5 \cdot 10^{-3}$; 10^{-3} ; $5 \cdot 10^{-4}$; $5 \cdot 10^{-4}$ pg/ μ l respectivement pour les différentes concentrations).

2.2.24 Electrophorèse des produits d'amplification et évaluation semi-quantitative

Nous préparons un gel agarose 1.5% (Electrophoresis grade, Gibco BRL ®), ajoutons du bromure d'éthidium 250.ppm, dans du tampon TBE 0.5x (Gibco BRL ®). Les bandes sont visualisées à l'aide d'un dispositif Geldoc (Biorad ®) par illumination aux ultraviolets.

Principe de l'évaluation semi-quantitative :

Plusieurs situations de compétitions d'amplification entre deux ADN d'origine différentes sont réalisées. Dans chaque tube une concentration constante mais inconnue d'ADNc (cible) est présente. Un deuxième ADN d'origine plasmidiale (compétiteur) est présent en quantité variable mais de concentration connue. Il contient les séquences complémentaires aux amorces permettant d'amplifier des fragments de taille légèrement plus grande que ceux générés par l'amplification de l'ADNc. L'ADN plasmidial est ajouté en quantité décroissante dans les différents tubes. Dans la figure 16, 7 tubes avec des concentrations décroissantes d'ADN plasmidial et une concentration constante d'ADNc sont analysés. Les deux produits

d'amplification (2 bandes) sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les quantités des deux produits d'amplification sont estimées en comparant l'intensité des deux bandes. Vu que la quantité d'ADN plasmidial est connue, le point d'équivalence d'intensité des bandes permet de semi-quantifier l'ARNm pour le gène analysé. Ici, le point d'équivalence se situe dans le troisième tube en partant de la gauche (fig 16).

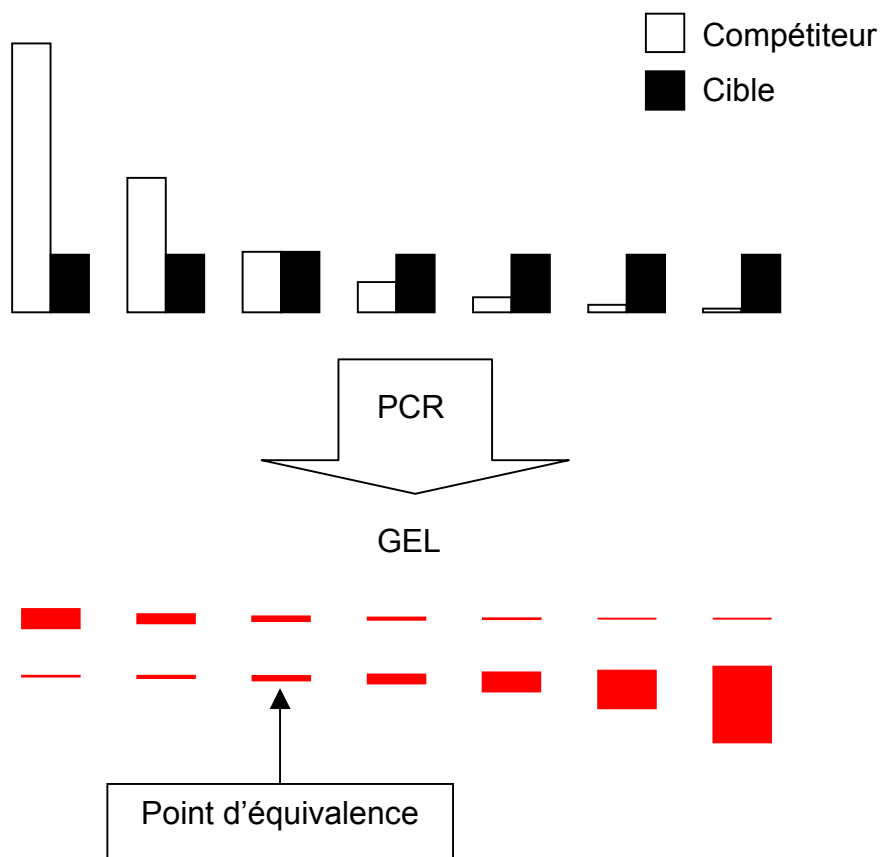


Fig 16 : Principe de la PCR semiquantitative (modifié de ⁽³⁾). La hauteur des colonnes est proportionnelle à la quantité de compétiteur présente dans les tubes.

Dix larves d'*I. ricinus* sont placées sur chaque oreille de souris BALB/c.

L'ARNm de l'épiderme, du derme, des ganglions drainant le site de fixation des tiques ou de la rate est extrait après 5, 12, 18, 24, 72 120 et 168 heures d'infestation.

Les taux de cytokines sont calculés après dosage par PCR semi-quantitative.

Comme la quantité d'ARNm extrait varie dans les échantillons, selon les conditions de manipulation, la quantité d'ADNc varie également. Ainsi, nous mesurons la

quantité de messagers pour les cytokines sus-mentionnées et pour un gène constitutif, celui de l'HPRT qui nous sert de référence. Pour chaque temps et pour chaque cytokine, le rapport cytokine/HPRT a été divisé par le rapport cytokine/HPRT d'une souris naïve. L'ajustement de la concentration de ADNc pour obtenir une concentration stable de messagers pour l'HPRT aurait pu être envisagée mais aurait engendré un nombre important de PCR supplémentaire et, par conséquent un surcoût élevé.

Les variations des messagers de cytokines sont standardisées grâce à la quantification des messagers de l'HPRT. Par définition, les rapports de cytokines pour l'IL-4, l'IFN- γ et l'IL-10 sont de 1 chez la souris naïve.

2.2.25 Western blot

2.2.25.1 Préparation des échantillons

10 μ l d'EGS, de salive ou de fractions sont dilués dans du 10 μ l tampon Laemmli (HCl 0.1 N, Tris 0.015 %, glycérol 25 %, SDS 4 %, β -mercaptoéthanol 10 %, éthanol 1 %, bleu de bromophénol 0.01 %). Ils sont ensuite bouillis 3 minutes au bain-marie.

2.2.25.2 Gel SDS

Pour la migration protéique sur gel, nous utilisons un dispositif de type Biorad Protean II XL équipé de plaques en verre pour des gels de 16 cm de hauteur et d'espateurs de 0.75 mm. Le dispositif est refroidi par un courant d'eau froide de 10 litres/heures pendant la migration.

Nous coulons tout d'abord le gel de séparation. Nous ajoutons une fine couche de butanol saturé sur le gel pour que sa surface supérieure soit plane.

Préparation du gel de séparation 14% acrylamide :

- Eau 6.1 ml
- Tampon de séparation* 5.25 ml
- Acrylamide-Bisacrylamide Biorad ® 8.4 ml

Cette solution est dégazée par ultrasons. Il est ensuite ajouté :

- Persulfate d'ammonium 1.4% 210 µl
- SDS 10 % 210 µl
- Temed Biorad ® 10 µl

*Solution de séparation : Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

La polymérisation du gel de séparation prend environ 1 heure 30. Le butanol est ensuite éliminé par rinçage à l'eau désionisée. L'eau est supprimée à l'aide d'un papier buvard. Un peigne (dents de 5 mm de large) est placé en haut du dispositif et le gel de concentration peut alors être coulé.

Préparation du gel de concentration :

- Eau 3.14 ml
- Tampon de concentration** 1.5 ml
- Acrylamide-Bisacrylamide Biorad ® 1.2 ml

Le mélange est dégazé par ultrason, puis nous ajoutons:

- Persulfate d'ammonium 1.4 % 100 µl
- SDS 10 % 60 µl
- Temed Biorad ® 5 µl

**Tampon de concentration : Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8

La polymérisation prend environ 30 minutes. Le gel peut ensuite être introduit dans la cuve de migration. Nous immergeons les deux extrémités du gel et les électrodes avec du tampon d'électrophorèse (Tris/Glycine/SDS, Biorad®). 20 µl de chaque échantillon sont introduits dans chaque puits. Une tension de 20 mA est appliquée pendant 2h30. La migration doit être arrêtée lorsque le bleu de bromophénol atteint 5 mm du bord inférieur du gel.

2.2.25.3 Transfert des protéines sur nitrocellulose

Nous utilisons une membrane de nitrocellulose Protean® « Nitrocellulose Transfer membrane » (Schleicher & Schuell®). Le dispositif de transfert provient de chez Biorad® (Transblot SD, « semi-dry transfer cell »). Nous utilisons également des buvards de transfert de type Biorad® « filter paper extra thick ».

Nous imbibons les buvards et la membrane de nitrocellulose dans du tampon de transfert***. Nous éliminons le gel de concentration et empilons un buvard, la membrane de nitrocellulose, le gel et un deuxième buvard. Nous appliquons ensuite un courant de 0.8 mA/cm² pendant une heure et demi exactement.

***Composition du tampon de transfert :

□ Tris	0.581	%
□ Glycine	0.293	%
□ SDS	0.0375	%
□ Méthanol	20	%

Pour le découpage de la membrane, les protéines peuvent être visualisées à l'aide d'une coloration réversible au rouge Ponceau (rouge Ponceau 0.01%, TCA 3%).

2.2.25.4 Coloration des protéines à l'or colloïdal

Les protéines présentes sur les membranes de nitrocellulose sont visualisées à l'aide d'une coloration à l'or colloïdal. Le kit utilisé est le colloïdal gold total protein stain (Biorad ®). Le protocole du fabricant est suivi à la lettre.

Si la coloration à l'or colloïdal donne un signal trop faible et si certaines bandes sont à peine discernables, nous appliquons le gold enhancement kit (Biorad ®). Toutefois, si ce kit permet d'augmenter fortement le contraste des bandes, le risque d'apparition d'un bruit de fond important doit être pris en considération. Aussi, nous n'utilisons ce kit que dans le cas où la coloration à l'or serait vraiment trop faible. Le protocole du fabricant est suivi mais toutes les solutions utilisées sont à 4°C et non à température ambiante. La réaction est ainsi ralentie et la coloration est plus progressive. Nous pouvons arrêter la coloration lorsqu'elle est satisfaisante sans l'apparition d'un bruit de fond trop important. Nous colorons les bandes à l'abri de la lumière.

2.2.26 Dosage de la prostaglandine (PGE₂)

La teneur en prostaglandine de l'EGS et des fractions chromatographiques a été dosée à l'aide du kit Prostaglandine E₂ EIA Kit-Monoclonal (Cayman chemical ®). Le protocole nous a été fourni par le fabricant. Nous avons testé la concentration de PGE₂ dans une plage de concentration de 1 ng/ml à environ 78 pg/ml.

2.3 Dosage des messagers d'IL-4, d'IFN- γ et d'IL-10 dans l'épiderme, le derme, les ganglions et la rate de souris BALB/c infestées par des larves d'*I. ricinus*

Les souris BALB/c sont infestées avec des larves *I. ricinus* comme décrit dans le chapitre : 2.2.2. 3 souris sont sacrifiées après 5 heures, 12 heures, 18 heures, 24 heures, 3 jours, 7 jours d'infestation. Pour chaque souris, l'épiderme, le derme, les ganglions drainants et la rate sont récupérés et l'ARN est extrait de chaque tissu. Comme contrôle négatif, des souris naïves (ayant subi le même traitement mais

sans tiques) sont utilisées. Les ARNm sont rétrotranscrits en ADNc ce qui nous permet d'observer la variation des messagers des cytokines (IFN- γ , IL-4 et IL-10) en fonction du temps d'infestation et ceci dans plusieurs tissus impliqués dans la réponse immunitaire anti-tique. Nous pouvons également isoler certaines populations cellulaires des différents tissus pour avoir une idée plus précise des cellules impliquées dans la production desdites cytokines. Dans cette étude, les cellules T $\gamma\delta$ de l'épiderme et de la rate sont étudiées ainsi que les sous-populations CD8, CD4 de la rate.

2.4 Stimulation des cellules T $\gamma\delta$ de l'épiderme par de la salive d'*I. ricinus*

Les cellules T $\gamma\delta$ et les cellules de Langerhans ont été isolées comme décrit dans le chapitre 2.2.15.

2.4.1 Cellules T $\gamma\delta$ seules

10⁵ cellules T $\gamma\delta$ naïves sont mises en culture dans 100 μ l de RPMI complet. 3 μ l de salive d'*I. ricinus* sont ajoutés. L'incubation dure 5 jours à 37°C et 5% CO₂. Après l'incubation, l'IL-4 est dosée par ELISA (chap 2.2.19). L'expérience est effectuée sur 4 puits.

2.4.2 Cellules T $\gamma\delta$ et cellules de Langerhans

10⁴ cellules de Langerhans naïves sont incubées dans 100 μ l de RPMI complet pendant 24 heures à 37°C et 5% CO₂ en présence de 3 μ l de salive d'*I. ricinus*. Après cette période, 10⁵ cellules T $\gamma\delta$ naïves sont ajoutées. Le volume de la culture passe à 200 μ l. La culture est répartie dans deux puits pour atteindre à nouveau 100 μ l. La culture est incubée 5 jours à 37°C et 5% CO₂. Après l'incubation, l'IL-4 est dosée par ELISA (chap 2.2.19). L'expérience est effectuée sur 4 puits.

2.5 Schéma de l'étude de la réponse immunitaire de la souris BALB/c stimulée par différentes sous-populations de cellules dendritiques spléniques pulsées avec des antigènes d'*I. ricinus*

Afin d'étudier séparément le comportement des sous-populations de cellules dendritiques, nous les séparons et les mettons en présence de différents antigènes. Pendant cette période d'incubation, les cellules dendritiques vont capturer les antigènes et les incorporer. Elles subissent une maturation pendant qu'elles digèrent les antigènes avant de présenter des peptides issus de cette digestion à leur surface en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. A ce stade, elles sont potentiellement capables de stimuler les cellules T. C'est alors, que nous les lavons pour éliminer l'antigène qui resterait dans le milieu. Elles sont ensuite injectées à une souris naïve. Les cellules T de la souris naïve se retrouvent en présence des cellules dendritiques « pulsées » et vont réagir en identifiant les fragments antigéniques. Nous sommes en présence d'une réaction primaire contre un antigène spécifique qui est induit par une sous-population de cellules dendritiques donnée. Nous attendons une période de 9 jours. Après cette incubation, les souris sont sacrifiées. La totalité des cellules de la rate est récupérée. Ces cellules sont mises en culture et restimulées *in vitro* par l'antigène. Les cellules T à mémoire réagissent spécifiquement. Nous obtenons donc une réaction secondaire avec la production de cytokines et une prolifération cellulaire. Il est à noter que des cellules naïves ne réagissent pas dans un tel modèle expérimental (Mejri, communication personnelle). Nous observons ainsi le comportement des cellules à mémoire lors d'une réaction secondaire. Cette étude est schématisée à la figure 17.

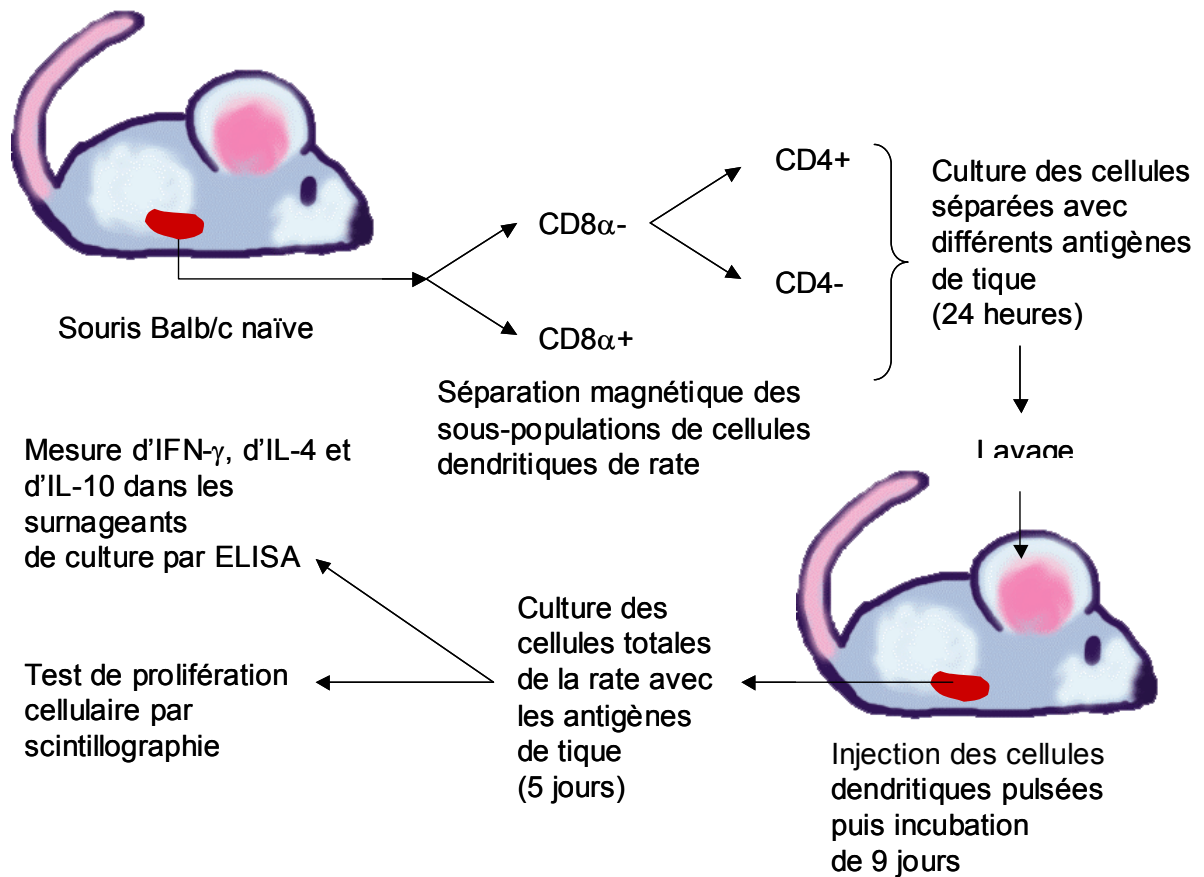


Fig 17 : Schéma de l'étude de la réponse immunitaire de la souris BALB/c stimulées par différentes sous-populations de cellules dendritiques spléniques pulsées par des antigènes d'*I. ricinus*

3 Résultats

I. Réactions des tissus de BALB/c impliqués lors de la piqûre des tiques

3.1 Evolution des rapports d'IL-4, d'IFN- γ et d'IL-10.

Dans les figures 18-29, chaque valeur a été calculée avec la formule suivante :

$$\text{Rapport} = (Qc/Qh)/(Qc0/Qh0)$$

Où Qc est la quantité de messagers pour la cytokine examinée au temps T, Qh est la quantité de messagers de l'HPRT au temps T, Qc0 est la quantité de messagers pour la cytokine examinée d'une souris naïve et Qh0 est la quantité de messagers de l'HPRT d'une souris naïve. Qc/Qh représente la quantité de la cytokine divisée par la quantité d'HPRT au temps T et Qc0/Qh0 la même mesure pour les souris témoins.

Les valeurs absolues (en annexe) de la quantification des différents messagers ne donnent aucune indication de la quantité des différentes cytokines tant qu'elles ne sont pas mises en rapport avec la quantité des messagers d'un gène constitutif comme l'est l'HPRT et comparées avec le même rapport chez une souris naïve.

Pour chaque cytokine et chaque temps, deux souris ont été examinées. Cela nous donne deux mesures nous fournissant deux résultats après calcul. Elles correspondent aux deux points à chaque temps dans les graphes (fig 18-29). Parfois, les deux points se recouvrent.

3.1.1 Evolution des rapports d'IL-4 dans l'épiderme, le derme, les ganglions et la rate

Les larves se nourrissent jusqu'à 72 heures. A 120 heures, toutes les larves se sont détachées.

3.1.1.1 Epiderme

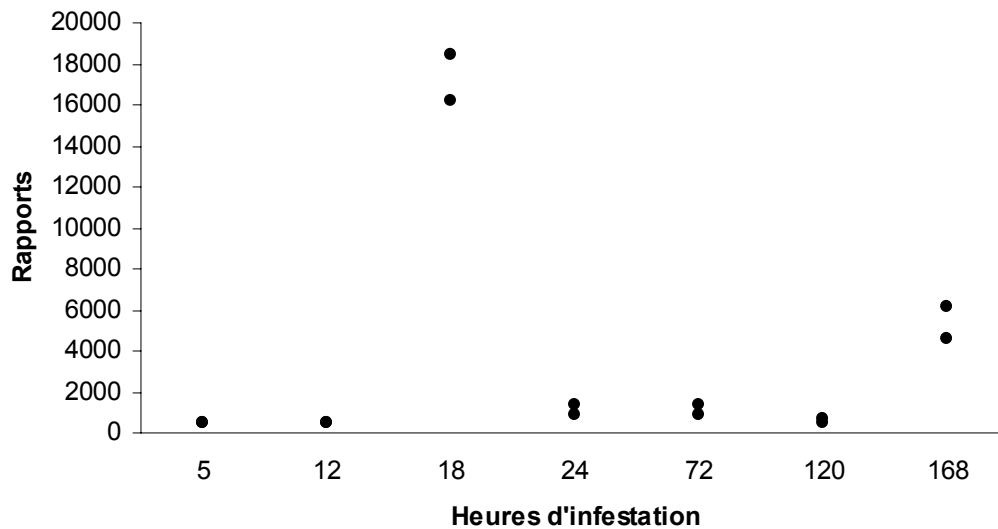


Fig 18 : Evolution du rapport d'IL-4 dans l'épiderme de souris BALB/c infestées. Les deux points à chaque temps correspondent aux deux souris examinées, les points se recouvrent parfois.

Dans l'épiderme de souris BALB/c, le rapport d'IL-4 augmente très fortement 18 heures après le début de l'infestation pour être d'environ 20'000 fois supérieur à celui mesuré chez une souris naïve (fig. 18). Ce rapport diminue pour se stabiliser et rester environ 600 fois plus élevé que dans l'épiderme d'une souris naïve. Nous constatons aussi une augmentation du rapport d'IL-4 après le détachement des larves. Le rapport d'IL-4 reste extrêmement élevé durant toute la période d'infestation et même pendant une période de 48 heures après le détachement des larves.

3.1.1.2 Le Derme

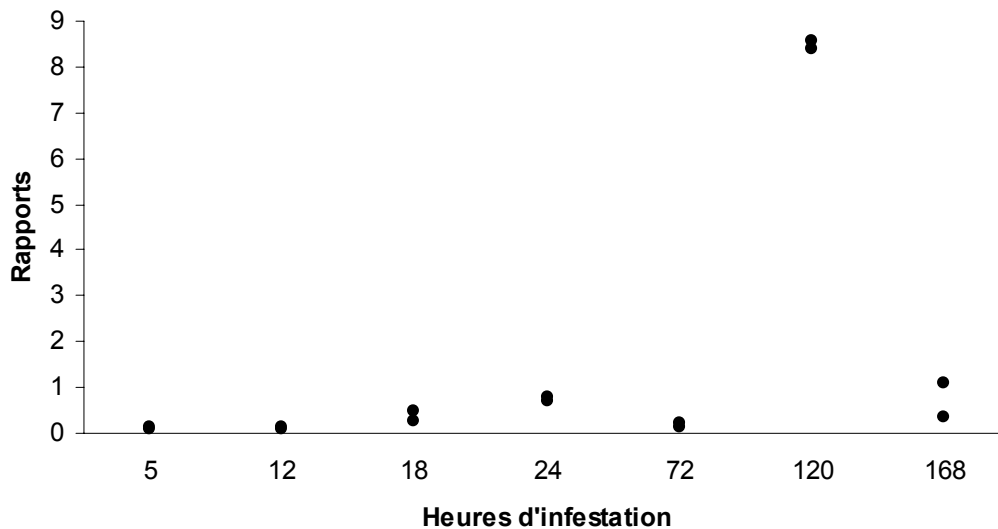


Fig 19 : Evolution du rapport d'IL-4 dans le derme de souris BALB/c infestées. Les deux points à chaque temps correspondent aux deux souris examinées. Les points se recouvrent parfois.

Durant la période d'infestation, le rapport d'IL-4 reste faible dans le derme de la souris au site de fixation des tiques (fig 19). Il commence par diminuer 5 heures après le début de l'infestation (valeur inférieure à 1). Cette diminution est suivie d'une hausse pour atteindre la valeur maximale 120 heures après le début de l'infestation. A cet instant, le rapport n'est qu'environ 8 fois supérieur à celui déterminé dans le derme d'une souris naïve. Après le détachement des dernières larves, le rapport redescend. La variation du rapport d'IL-4 dans le derme des souris infestées est minime et reste extrêmement faible dans ce tissu. L'évolution du rapport d'IL-4 dans l'épiderme (fig 18) est plus importante.

3.1.1.3 Les ganglions drainant le site de fixation des tiques

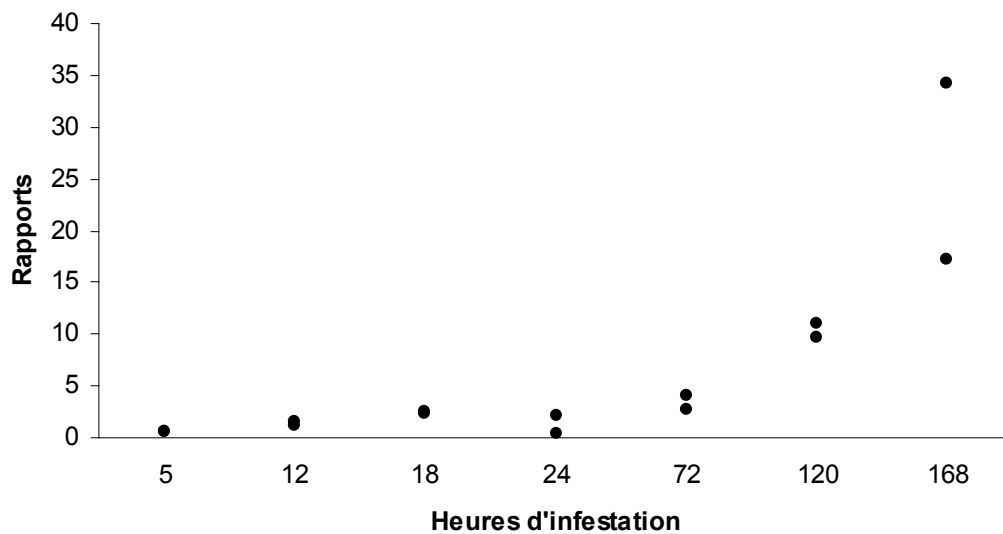


Fig 20 : Evolution du rapport d'IL-4 dans les ganglions drainant le site de fixation des tiques de souris BALB/c infestées. Les deux points à chaque temps correspondent aux deux souris examinées. Les points se recouvrent parfois.

Dans les ganglions drainant le site de fixation des tiques, les rapports d'IL-4 augmente progressivement durant le repas sanguin des larves d'*I. ricinus* (fig 20). Le rapport continue à augmenter pendant les 48 heures qui suivent le détachement des dernières larves. Jamais pendant l'infestation, le rapport d'IL-4 ne descend au-dessous du rapport déterminé dans les ganglions d'une souris naïve. Nous observons environ 23 fois le taux de départ 168 heures après le début de l'infestation. A ce moment, les larves de tiques se sont détachées.

3.1.1.4 La Rate

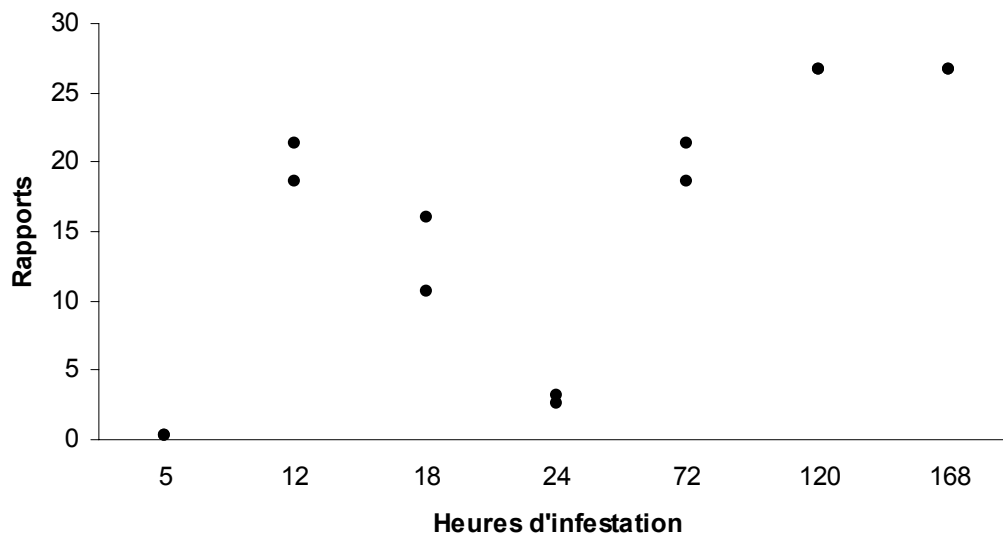


Fig 21 : Evolution du rapport d'IL-4 dans la rate de souris BALB/c infestées. Les deux points à chaque temps correspondent aux deux souris examinées. Les points se recouvrent parfois.

Après 12 heures d'infestations, le rapport d'IL-4 est fortement augmenté dans la rate de la souris infestée pour atteindre une valeur environ 22 fois supérieure à celle obtenue dans la rate d'une souris naïve (fig. 21). Cette augmentation est très rapide. Elle est suivie d'une diminution constatée 24 heures après le début de l'infestation. Le rapport baisse mais reste environ 3 fois supérieur à celui de la rate d'une souris naïve. Après 24 heures d'infestation, le rapport d'IL-4 augmente progressivement jusqu'à 120 heures et se stabilise après que les larves se sont détachées.

Cette réaction en deux temps nous laisse supposer que deux populations de cellules spléniques sont impliquées dans l'augmentation de la production de l'IL-4. Nous avons déterminé les cellules réagissant après 12 heures d'infestation de souris BALB/c infestées par *I. ricinus* (chap. 3.4), moment du premier temps de réaction.

La réponse est plus rapidement polarisée vers Th2 dans la rate que dans les ganglions drainant le site de fixation des tiques. Nous supposons que des antigènes salivaires parviennent à la rate rapidement par la circulation sanguine.

De manière globale, l'IL-4 est fortement exprimée dans les différents tissus et organes lymphoïdes de la souris BALB/c infestée par des larves d'*I. ricinus*. La présence de messagers de l'IL-4 dans l'épiderme n'avait à ce jour jamais été mise en évidence chez les souris infestées.

3.1.2 Evolution des rapports d'IFN- γ dans l'épiderme, le derme, les ganglions et la rate

3.1.2.1 L'épiderme

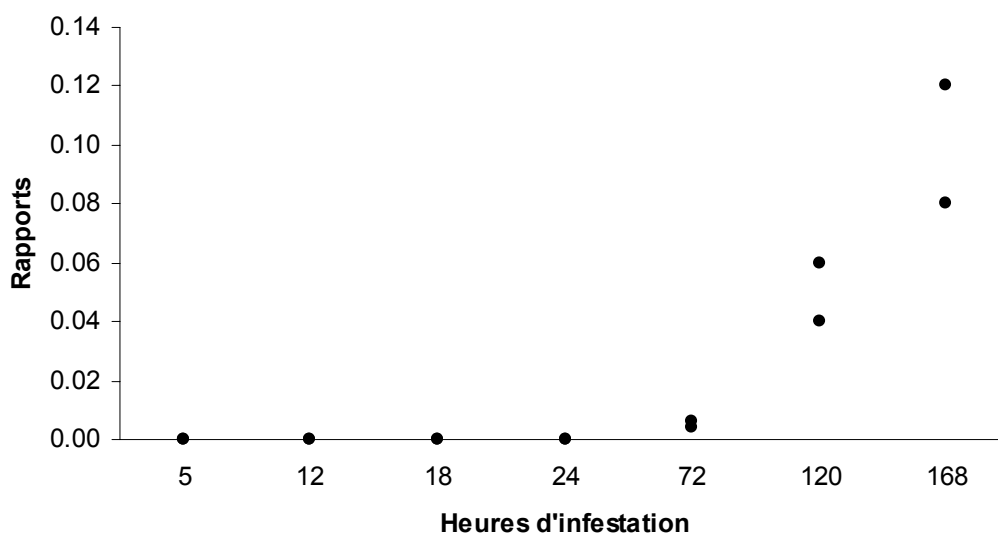


Fig 22 : Evolution du rapport d'IFN- γ dans l'épiderme de souris BALB/c infestées. Les deux points à chaque temps correspondent aux deux souris examinées. Les points se recouvrent parfois.

Alors que le rapport d'IL-4 augmente rapidement dans l'épiderme et reste élevé durant toute l'infestation (fig 18), le rapport d'IFN- γ est indétectable au début de l'infestation et présente une légère augmentation 72 heures plus tard pour atteindre

un maximum après 120 heures (fig 22). Ce rapport maximal d'IFN- γ correspond au détachement des larves de tiques. Après cette période, le rapport d'IFN- γ diminue. Le rapport d'IFN- γ reste toutefois plus faible que celui d'une souris naïve. La production d'IFN- γ dans l'épiderme est donc inhibée durant l'infestation.

3.1.2.2 Le derme

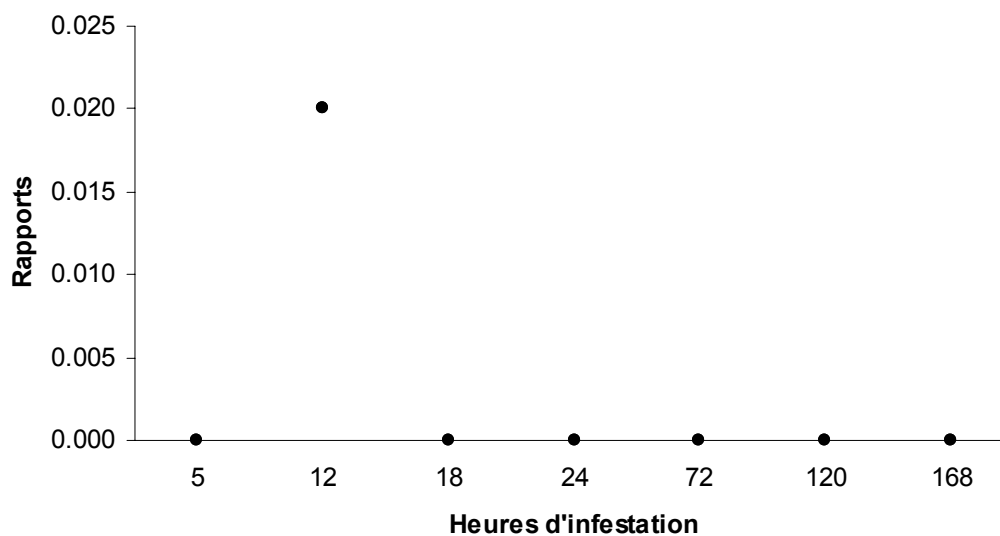


Fig 23 : Evolution du rapport d'IFN- γ dans le derme de souris BALB/c infestées. Les deux points à chaque temps correspondent aux deux souris examinées. Les points se recouvrent parfois.

Comme pour l'épiderme et les ganglions drainants, toutes les valeurs obtenues pour le derme de souris BALB/c infestées sont inférieures à 1. L'expression d'IFN- γ est ainsi toujours réduite par rapport à l'expression d'IFN- γ dans le derme d'une souris naïve (fig 23). 12 heures après le début de l'infestation, nous obtenons un très faible rapport d'IFN- γ . 18 heures après le début de l'infestation, les messagers de l'IFN- γ deviennent indétectables. La production d'IFN- γ est inhibée tout au long de l'infestation. En ce qui concerne l'IL-4 dans ce tissu (fig 19), le rapport reste plus élevé pendant l'infestation.

3.1.2.3 Les ganglions drainant le site de fixation des tiques

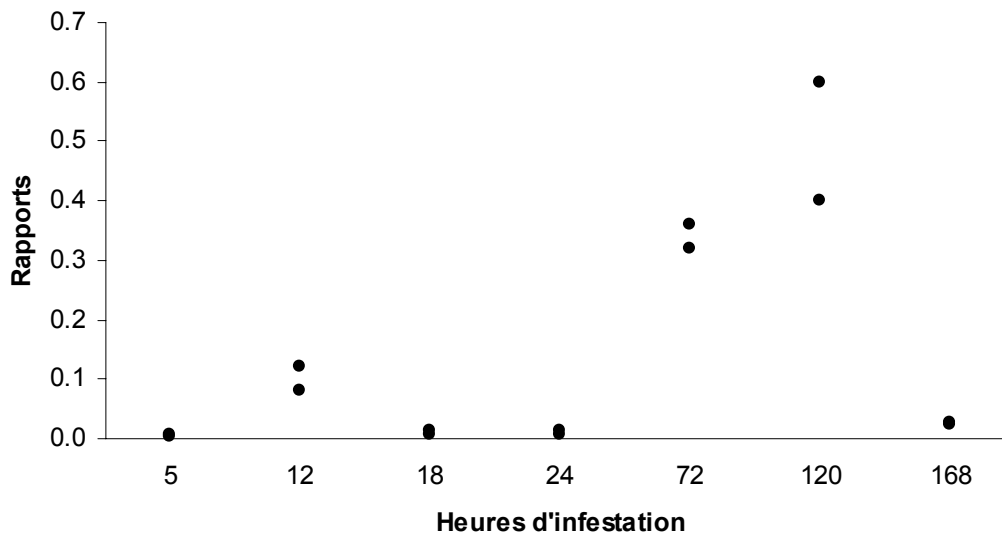


Fig 24 : Evolution du rapport d'IFN- γ dans les ganglions drainant le site de fixation des tiques de souris BALB/c infestées. Les deux points à chaque temps correspondent aux deux souris examinées. Les points se recouvrent parfois.

Le rapport d'IFN- γ des ganglions drainant le site de fixation des larves de tique reste faible durant l'infestation (fig 24). Après 5 heures, la production des messagers de l'IFN- γ est inhibée. Le rapport calculé est inférieur à 1. Après 72 heures, période à laquelle les larves se détachent massivement, nous observons un rapport d'IFN- γ proche de celui des ganglions d'une souris naïve. Après ce laps de temps, le rapport d'IFN- γ diminue à nouveau. Le rapport d'IFN- γ dans les ganglions drainant le site de fixation des tiques est faible en comparaison de celui de l'IL-4 (fig. 20). La réponse immunitaire au niveau des ganglions drainant le site de fixation des tiques est progressivement polarisée vers Th2.

3.1.2.4 La rate

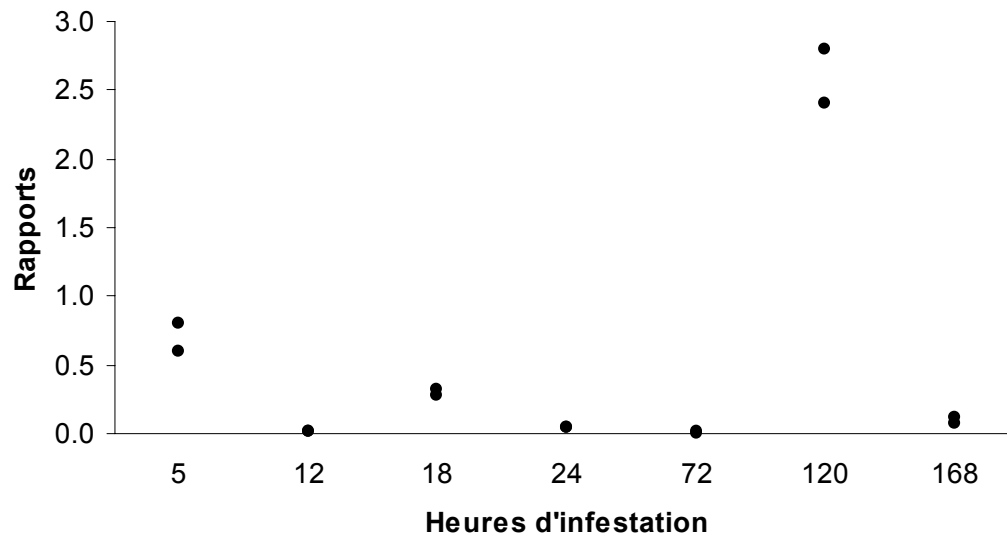


Fig 25 : Evolution du rapport d'IFN- γ dans la rate de souris BALB/c infestées. Les deux points à chaque temps correspondent aux deux souris examinées. Les points se recouvrent parfois.

Dans la rate de souris infestées, la production d'IFN- γ est tout d'abord partiellement inhibée (fig 25). Une légère élévation du rapport d'IFN- γ est constatée 120 heures après le début de l'infestation. Cette période correspond à la fin du détachement des tiques. Le rapport d'IFN- γ reste plus faible que le rapport d'IL-4 (fig 21). Enfin, après le détachement des dernières tiques le rapport d'IFN- γ chute. Les rapports de l'IFN- γ sont moins élevés que ceux de l'IL-4 durant l'infestation.

3.1.3 Evolution des rapports d'IL-10 dans l'épiderme, le derme, les ganglions et la rate

Dans ce chapitre, nous montrons que la production des messagers de l'IL-10 mesurée est fortement inhibée pendant le repas sanguin des larves d'*I. ricinus* dans tous les tissus examinés.

3.1.3.1 L'épiderme

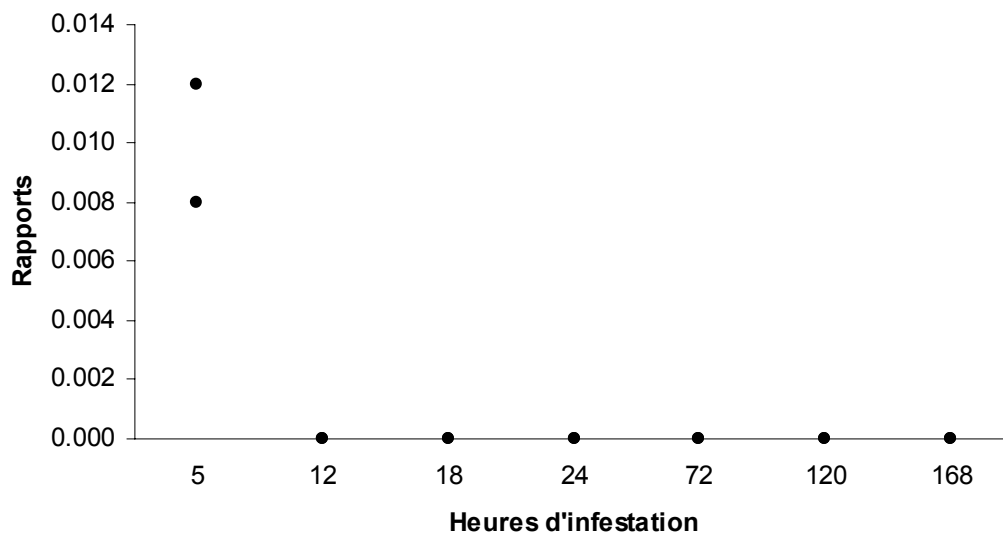


Fig 26 : Evolution du rapport d'IL-10 dans l'épiderme de souris BALB/c infestées. Les deux points à chaque temps correspondent aux deux souris examinées. Les points se recouvrent parfois.

Le rapport d'IL-10 dans l'épiderme de souris infestées diminue fortement dès 5 heures d'infestation (fig 26). Ensuite, ces messagers ne sont plus détectables. L'inhibition de la production des messagers de l'IL-10 dans l'épiderme d'une souris BALB/c infestée par des larves d'*I. ricinus* est forte.

3.1.3.2 Le derme

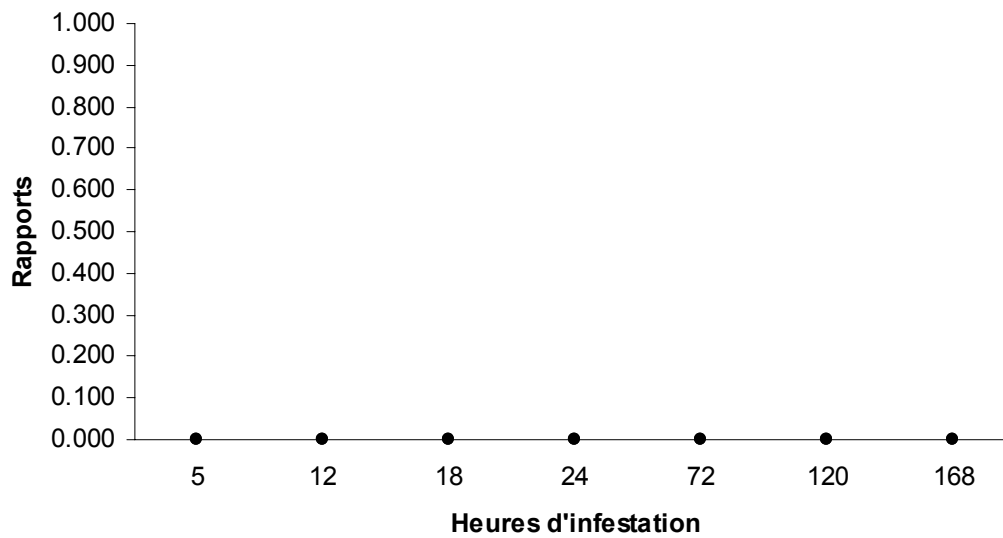


Fig 27 : Evolution du rapport d'IL-10 dans le derme de souris BALB/c infestées. Les deux points à chaque temps correspondent aux deux souris examinées. Les points se recouvrent.

Dans le derme, les messagers de l'IL-10 ne peuvent être détectés durant toute la période d'infestation (fig 27).

3.1.3.3 Les ganglions drainant le site de fixation des tiques

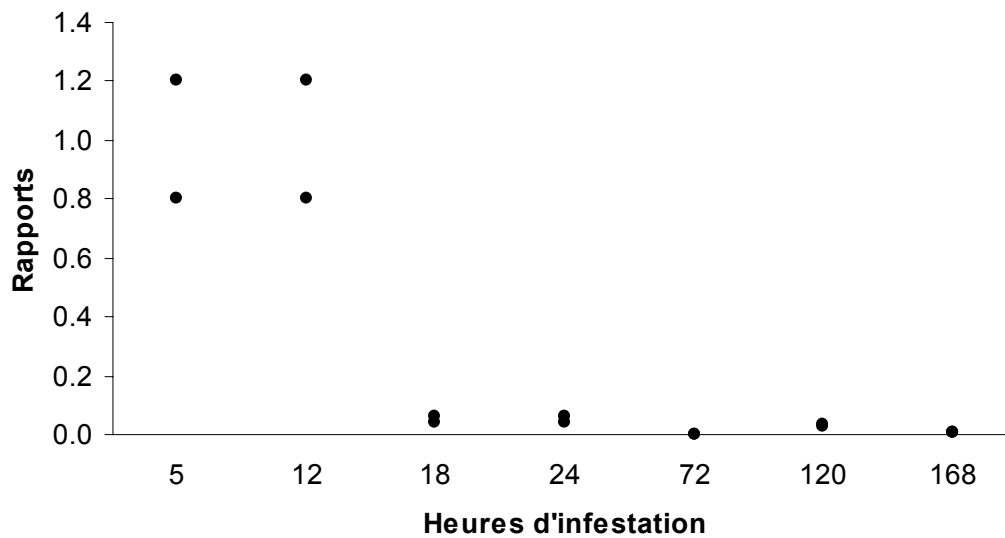


Fig 28 : Evolution du rapport d'IL-10 dans les ganglions drainant le site de fixation des tiques de souris BALB/c infestées. Les deux points à chaque temps correspondent aux deux souris examinées. Les points se recouvrent parfois.

Dans les ganglions drainant le site de fixation des larves de tiques, la production des messagers de l'IL-10 reste stable pendant les 12 premières heures de l'infestation. Elle avoisine la valeur obtenue chez une souris BALB/c naïve (fig 28). Ensuite, nous constatons une diminution du rapport d'IL-10 pendant le repas sanguin des larves. Le rapport reste ensuite extrêmement bas pendant la durée entière de l'expérience.

3.1.3.4 La rate

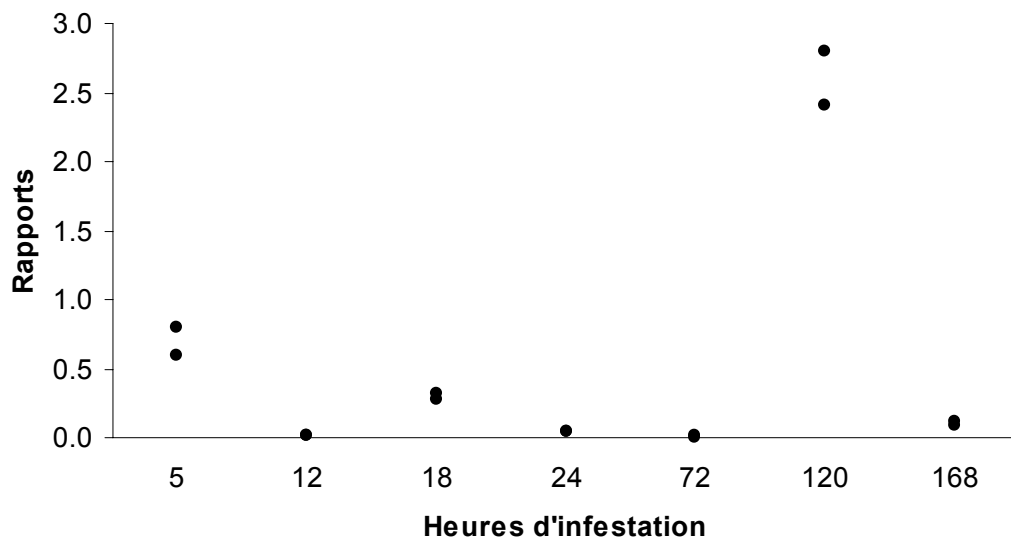


Fig 29 : Evolution du taux de l'IL-10 dans la rate de souris BALB/c. Les deux points à chaque temps correspondent aux deux souris examinées. Les points se recouvrent parfois.

Dans les cellules de la rate, le rapport d'IL-10 diminuent dès les premiers instants de l'infestation (fig 29). La diminution du rapport d'IL-10 commence plus tôt dans la rate que dans les ganglions (fig 28). A 120 heures, le rapport d'IL-10 est supérieur à 1. Cette période suit le détachement des dernières larves. La diminution de la charge antigénique pourraient induire une éventuelle production d'IL-10.

3.2 Production de l'IL-4 par les cellules $T\gamma\delta$ de l'épiderme de la souris BALB/c lors d'une infestation par des larves d'*I. ricinus*

L'augmentation du rapport d'IL-4 est importante dans l'épiderme lors d'une infestation par des larves d'*I. ricinus* (fig 18). Les résultats qui suivent démontrent que cette cytokine est principalement sécrétée par les cellules $T\gamma\delta$, les autres cellules T et les cellules n'exprimant pas de CD3 (molécule présente à la surface de toutes les cellules T murines) comme les kératinocytes, mélanocytes et cellules de Langerhans.

Trois souris infestées ont été sacrifiées 18 et 168 heures après le début de l'infestation. Les cellules de l'épiderme ont été préparées et séparées en 3 groupes : les cellules $T\gamma\delta$, les autres cellules T ($T\alpha\beta$, TCD4+, TCD8+) et le reste des cellules de l'épiderme. Pour chaque groupe, les messagers de l'IL-4 et de l'HPRT ont été

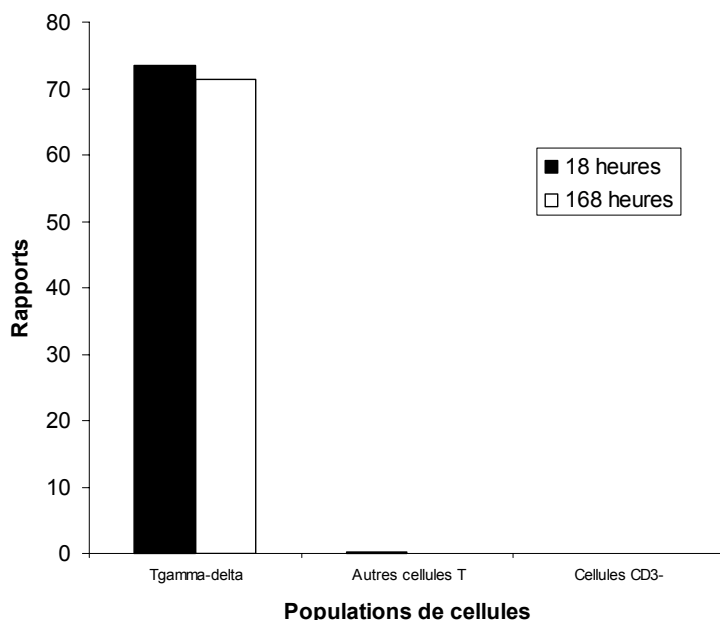


Fig 30 : Rapports de messagers d'IL-4 produits par différentes populations cellulaires de l'épiderme de la souris BALB/c infestée. Mesures faites à 18 heures et 168 heures après le début de l'infestation par des larves d'*I. ricinus*.

quantifiés par PCR semi-quantitative. Seules les cellules $T\gamma\delta$ augmentent leur production d'IL-4 après 18 et 168 heures (fig 30) alors que les autres cellules T n'interviennent pas dans cette hausse. La quantité des messagers de l'IL-4 produite par le reste des cellules (kératinocytes, mélanocytes) est trop faible pour être détectable par cette méthode. Les valeurs brutes sont indiquées en annexe (7.5.5).

3.3 Expérience de stimulation in vitro des $T\gamma\delta$

10^5 cellules $T\gamma\delta$ ont été incubées *in vitro* pendant 5 jours en présence de 3 μ l de salive d'*I. ricinus* pour 100 μ l de milieu. La détection d'IL-4 par ELISA dans le surnageant de culture (100 μ l) est négatif.

L'expérience a été recommencée. 10^4 cellules de Langerhans ont été incubées pendant 24 heures en présence de 3 μ l de salive d'*I. ricinus*. 10^5 cellules $T\gamma\delta$ ont été ajoutée au milieu après la période d'incubation. Après une période d'incubation de 5 jours, nous avons essayé de détecter l'IL-4 dans le surnageant (100 μ l) par ELISA. La détection est négative.

Nous pensons qu'un élément manque dans le milieu pour que la stimulation des cellules $T\gamma\delta$ ait lieu. Il pourrait s'agir de l'IL-1 β , cytokine stimulatrice des cellules T lors d'un priming *in vitro* par des cellules dendritiques spléniques en présences de salive d'*I. ricinus* ⁽⁸³⁾.

3.4 Production de l'IL-4 par les cellules T $\gamma\delta$, TCD4+, TCD8+ de la rate d'une souris BALB/c lors d'une infestation par des larves d'*I. ricinus*

Nous avons isolé différentes populations de lymphocytes T 18 heures après le début de l'infestation. C'est à cet instant que nous avons également dosé l'IL-4 dans les différentes populations cellulaires de l'épiderme (chap 3.2). 18 heures après le début de l'infestation le rapport d'IL-4 est important (chap 3.1.1) Les cellules T $\gamma\delta$ de la rate sont les cellules T les plus réactives (fig 31). Elles produisent 8 fois plus d'IL-4 que les cellules T $\gamma\delta$ de souris naïves. Les cellules TCD4+, également stimulées, produisent une fois et demi la dose d'IL-4 produite par les cellules TCD4+ d'une souris naïve. Au contraire, les cellules TCD8+ produisent moins de messagers de l'IL-4 que les cellules d'une souris naïve. En effet, le rapport obtenu est inférieur à 1. Les valeurs brutes figurent en annexe (7.5.6)

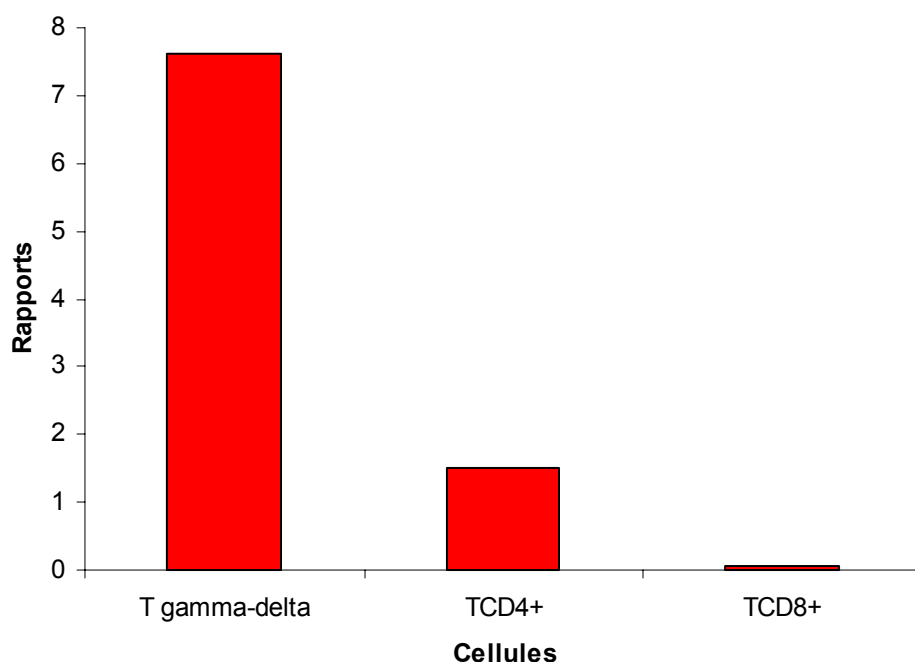


Fig 31 : Production de l'IL-4 par les populations de cellules T de la rate de souris BALB/c infestées.

II. Influence des antigènes de tiques et des cellules dendritiques sur la polarisation de la réponse

Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, la rate de la souris BALB/c répond rapidement lors de l'infestation par des larves d'*I. ricinus*. Cette réponse se traduit par une forte production d'IL-4. La production de cette cytokine est une conséquence de l'injection de la salive des tiques dans l'hôte. Or la salive est un mélange de protéines. Nous avons fractionné un extrait de glandes salivaires d'*I. ricinus* par FPLC. L'effet stimulateur diffère d'une fraction chromatographique à une autre. Selon les analyses subséquentes, chaque fraction reste complexe (chap 3.6.1).

En stimulant les différentes sous-populations de cellules dendritiques avec des fractions chromatographiques d'EGS, nous étudions le comportement des cellules dendritiques contre les différents antigènes présents dans l'EGS. A cet effet, nous avons réalisé les expériences suivantes :

3.5 Sélection des fractions

Il était impossible de tester toutes les fractions avec l'ensemble des sous-populations de cellules dendritiques. Nous avons par conséquent sélectionné les fractions produisant une prolifération cellulaire sans tenir compte de la polarisation de la réponse. Les cellules dendritiques ont été pulsées puis injectées à des souris naïves. Après 9 jours d'incubation, les cellules de la rate de ces souris sont préparées et restimulées *in vitro* avec les mêmes fractions. Dans la figure 32, l'incorporation de thymidine tritiée est représentée. Les coups par minute indiquent la prolifération des lymphocytes après restimulation *in vitro*. Une valeur témoin a été obtenue en mesurant la prolifération cellulaire des cellules de la rate d'une souris à laquelle nous avons injecté des cellules dendritiques naïves (non « pulsées » par l'antigène). Ces cellules ont été stimulées *in vitro* par de la salive pour être au plus proche de la réalité. La valeur des coups par minute obtenue (217 cpm) a été soustraite des valeurs obtenues avec les souris ayant été inoculées avec des cellules dendritiques

"pulsées". Ainsi, nous pouvons sélectionner les fractions ayant un réel pouvoir à « pulser » les cellules dendritiques en éliminant un éventuel bruit de fond.

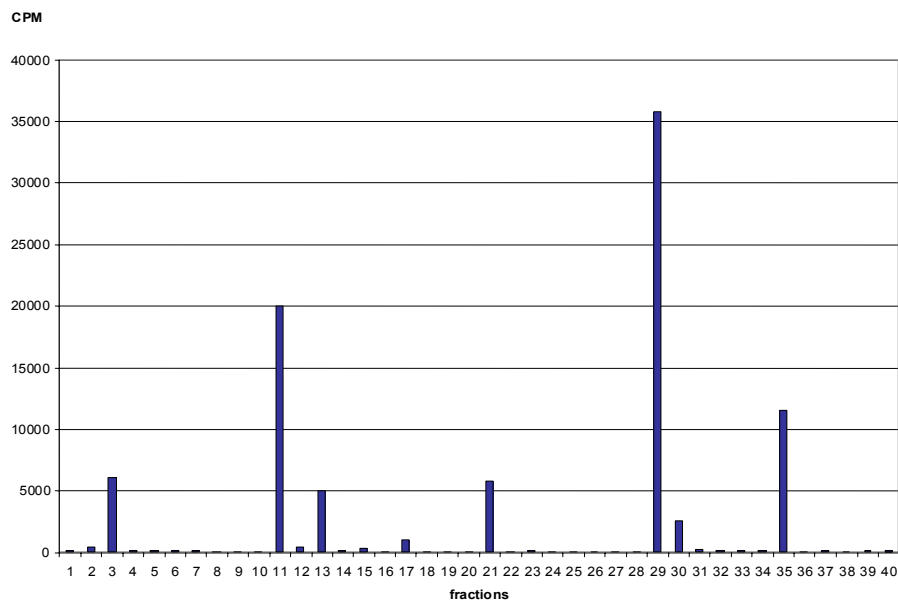


Fig 32 : Prolifération lymphoblastique après injection de cellules dendritiques pulsées avec les fractions d'EGS à des souris BALB/c naïves et stimulation secondaire *in vitro* par les mêmes fractions. En abscisse, les fractions FPLC de l'EGS. En ordonnée, les coups par minutes obtenus par mesure du rayonnement β .

A l'exception de la fraction 3 qui stimule plus fortement les lymphocytes, les fractions 1 à 10 ne les stimulent pas. Nous n'avons pas retenu ces fractions peu stimulatrices.

La fraction 3 n'a pas été sélectionnée parce qu'aucune protéine n'a été révélée par Western blot.

Nous constatons que les fractions 11,13, 17, 21,29,30 et 35 produisent une prolifération lymphocytaire significative. Nous les avons sélectionnées pour « pulser » les cellules dendritiques, ainsi que les fractions 12 et 31 qui contiennent probablement les mêmes protéines que les fractions voisines.

Chaque fraction a été testée sur une souris.

3.6 Prolifération lymphocytaire après « pulsing » des différentes sous-populations de cellules dendritiques avec les fractions d'EGS

Les cellules de présentation des antigènes pourraient jouer un rôle dans la polarisation. Nous avons séparé les sous-populations CD8 α +, CD4+ et CD8 α -/CD4-, afin de déterminer l'importance de chacune d'elles dans la polarisation de la réponse anti-tique chez la souris BALB/c.

Nous avons « pulsé » durant 24 heures l'ensemble des cellules dendritiques avec les fractions sélectionnées (fig 32). Nous les avons injectées à des souris naïves. Après 9 jours, les cellules des rates ont ensuite été restimulées *in vitro* dans un test de transformation lymphoblastique.

Ici, le test a été répété pour chaque sous-population de cellules dendritiques spléniques (fig 33).

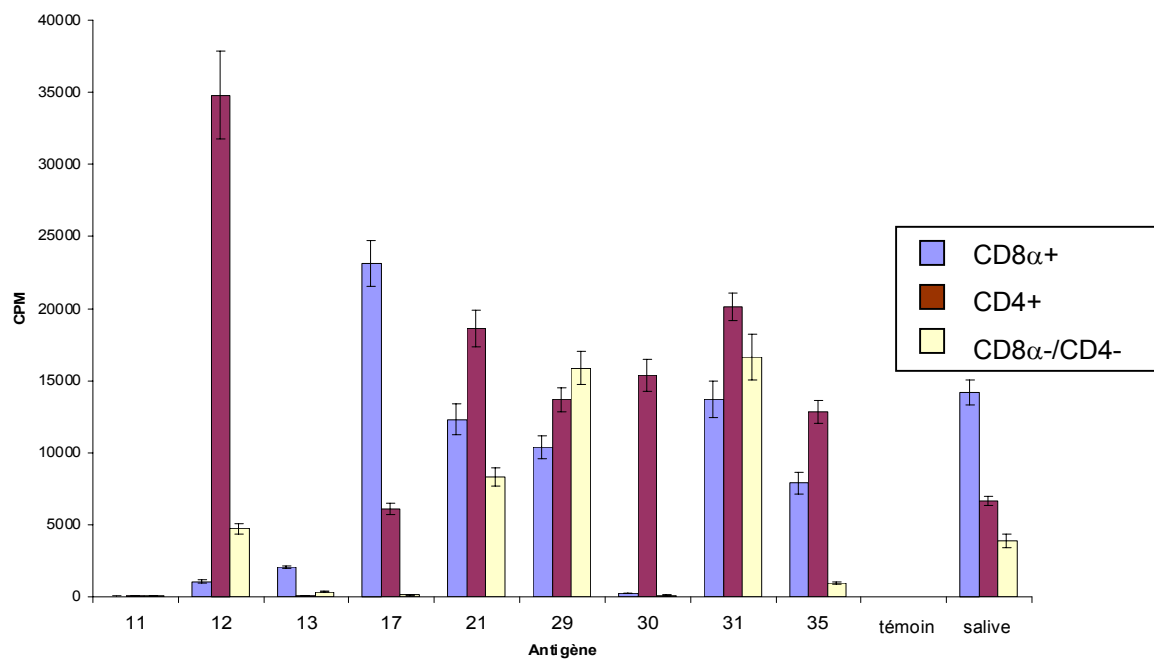


Fig 33 : Prolifération des cellules de la rate de souris stimulées par différentes sous-populations de cellules dendritiques pulsées par différents antigènes. CPM = coups par minutes. Témoin = prolifération *in vitro* de cellules de rate d'une souris injectées avec des cellules dendritiques non « pulsées ». Chaque test a été effectué avec 3 souris. Les barres d'erreur indiquent l'écart type entre les 3 valeurs ainsi obtenues.

La figure 33 montre des différences très nettes de stimulation entre les différentes fractions utilisées et les sous-populations de cellules dendritiques. Les fractions 11 et 13 n'induisent que peu de prolifération cellulaire lorsqu'elles « pulsent » les sous-populations de cellules dendritiques séparées alors qu'elles induisent une bonne réponse lorsqu'elles « pulsent » l'ensemble des cellules dendritiques (fig 32).

L'effet est inverse pour la fraction 12. Alors qu'elle ne stimule que très peu les lymphocytes avec l'ensemble des cellules dendritiques (fig 32), nous observons une forte prolifération lors du « pulsing » des cellules dendritiques CD4+. Le mélange des cellules dendritiques ne favorise donc pas la stimulation des lymphocytes dans ce cas.

Il en est de même pour la fraction 31 qui stimule bien les lymphocytes lors du « pulsing » des trois sous-populations séparées de cellules dendritiques. La fraction 17 provoque une bonne prolifération des lymphocytes lorsqu'elle pulse les cellules

dendritiques CD8 α + et une prolifération modeste lorsqu'elle pulse les cellules dendritiques CD4+. Lorsque cette fraction est utilisée pour le "pulsing" de l'ensemble des cellules dendritiques, elle produit une prolifération relativement modeste (fig 32). La salive provoque une bonne prolifération en stimulation secondaire lorsqu'elle pulse les cellules dendritiques CD8 α +. Son effet sur les cellules dendritiques CD4+ est moins important et il est encore plus faible avec les cellules dendritiques CD8-/CD4-. La salive semble avoir moins d'effet stimulateur que certaines fractions isolées de l'EGS.

Le témoin a été effectué de la manière suivante. Les sous-populations de cellules dendritiques naïves ont été injectées directement dans une souris naïve et les lymphocytes de la rate de cette souris ont été préparés après le même temps d'incubation que ceux des autres souris. Ces cellules ont été mises en présence de salive et nous ne constatons aucune prolifération pour chaque sous-population de cellules dendritiques.

3.6.1 Analyse des fractions d'EGS et de la salive par Western blot

Un Western blot a été effectué avec les fractions sélectionnées. Après séparation par SDS-PAGE et transfert sur nitrocellulose, les protéines ont été colorées à l'or colloïdal et contrastées à l'argent.

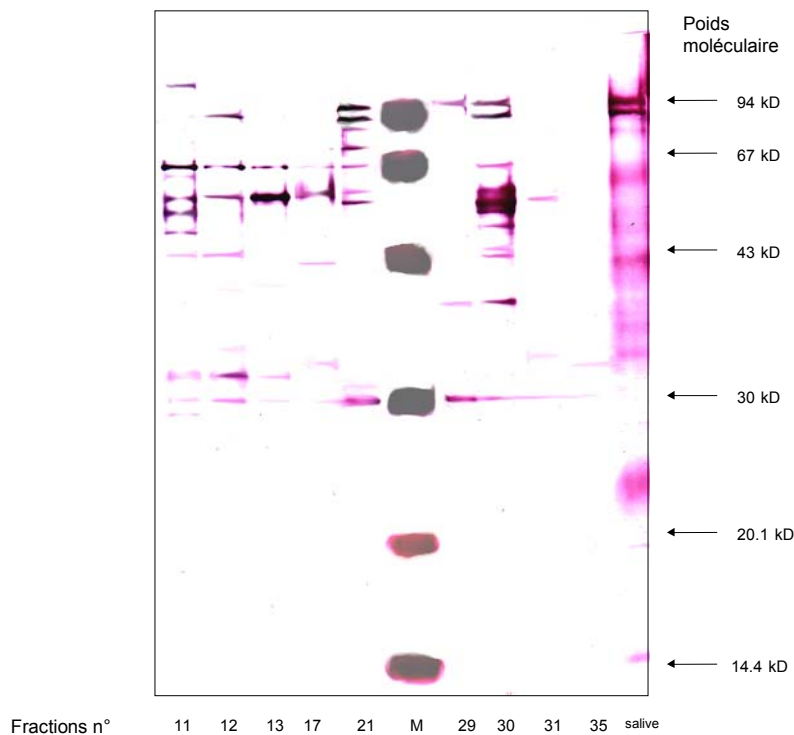


Fig 34 : Western blot des fractions 11, 12, 13, 21, 29, 30, 31, 35 et de la salive. Coloration à l'or colloïdal contrastée à l'argent. M = marqueur. Les masses moléculaires des protéines contrôles sont indiquées à droite de la figure.

La plupart des protéines présentes dans les fractions de l'EGS comigrent avec celles de la salive. On peut supposer qu'elles sont également sécrétées par la salive. Étant donné la méthode d'extraction de ces protéines, seules les protéines solubles sont présentes sur ce blot.

La fraction 11 contient de nombreuses protéines. Elle est la seule à contenir une protéine de haute masse moléculaire (env. 100 kD) absente de la salive. Nous y retrouvons une protéine de 65 kD, présente dans la salive également et une protéine

de 30 kD qui se retrouve dans toutes les fractions sélectionnées. La protéine de 65 kD n'est probablement pas la protéine étudiée par Ganapamo ⁽³¹⁾

La fraction 12 contient moins de protéines ; toutes comigrent avec la fraction 11 à l'exception d'une protéine d'environ 90 kD. On retrouve cette dernière dans les fractions 21, 29, 30 et dans la salive.

Dans la fraction 13, on ne distingue que 4 protéines qui comigrent avec la fraction 12.

La fraction 17 est également simple, seules 5 bandes sont visibles.

La fraction 21 présente deux protéines de haute masse moléculaire (90 et 94 kD). Ces protéines sont également fortement exprimées dans la salive. Entre 67 et 94 kD, deux protéines sont détectées. Seule la fraction 21 les contient. L'une des deux (à environ 85 kD) comigre avec une protéine de la salive. L'autre (environ 76 kD) n'est pas détectée dans la salive.

La fraction 29 ne compte que trois protéines qui sont aussi présentes dans d'autres fractions.

La fraction 30 est très complexe. Elle comporte de nombreuses protéines à environ 45 kD.



Fig 35 : Chromatogramme obtenu par mesure de l'absorbance à $\lambda=280$ nm de l'éluat pendant la FPLC.

La droite rouge représente le pourcentage du gradient linéaire du tampon d'éluat. Le graphe bleu représente la quantité de protéines récoltées. Les points situés en haut de figure marquent les changements de fractions. Les flèches indiquent les fractions sélectionnées pour la suite du travail. Les numéros correspondent aux fractions sélectionnées.

La fraction 35 est la moins riche en protéines. Seules deux bandes sont visibles aux alentours de 29 et 32 kD.

Lors du fractionnement de l'EGS (40 mg de protéines) par FPLC, nous avons obtenu un chromatogramme (fig 35) à une sensibilité de lecture de 0.5.

Même si les fractions sélectionnées correspondent à des pics du chromatogramme, nous remarquons que ces derniers sont rarement symétriques. Cela confirme ce que nous avons déjà visualisé à l'aide du Western blot : les fractions sont composées de plusieurs protéines.

3.6.2 Dosage de la prostaglandine PGE₂

La prostaglandine PGE₂ pourrait provoquer une polarisation Th2 de la réponse immunitaire⁽⁶⁸⁾. Afin d'écarter cette hypothèse, nous avons vérifié l'absence de cette molécule dans nos fractions, l'EGS (avant dialyse) et la salive nous servant de contrôles positifs. La prostaglandine de l'EGS et de la salive a été détectée. Les différentes étapes de préparation des fractions d'EGS l'éliminent (dialyse et

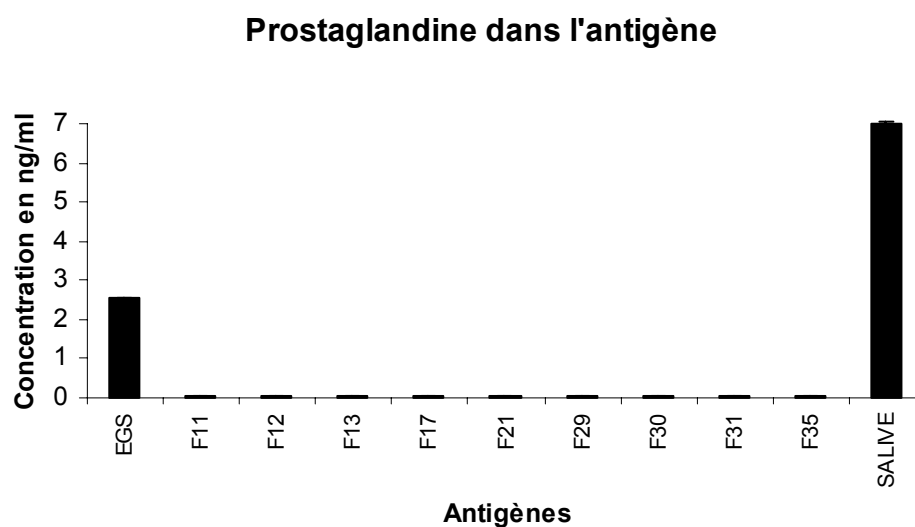


Fig 36 : Dosage de la prostaglandine (PGE₂) dans l'antigène. En abscisse, les antigènes examinés. En ordonnée, la concentration de PGE₂ en ng/ml. Les petites barres d'erreur sont données par l'écart type entre les valeurs (N=3).

concentration). La faible masse moléculaire (353) de la prostaglandine (PGE₂) lui permet de passer à travers les membranes de dialyse et des microfiltres de concentration. Elle n'est plus détectable dans les fractions, le seuil de détection étant de 2 pg/ml.

3.7 IL-4 et IFN- γ dans le surnageant de cultures des lymphocytes de souris BALB/c naïve receveuses de différentes sous-populations de cellules dendritiques pulsées

3.7.1 Production d'IL-4

Les différentes sous-populations de cellules dendritiques ont été incubées avec différents antigènes, soit les fractions sélectionnées (chapitre 3.5) et la salive. Ces cellules ont été injectées à des souris naïves. Les cellules de rates ont été préparées

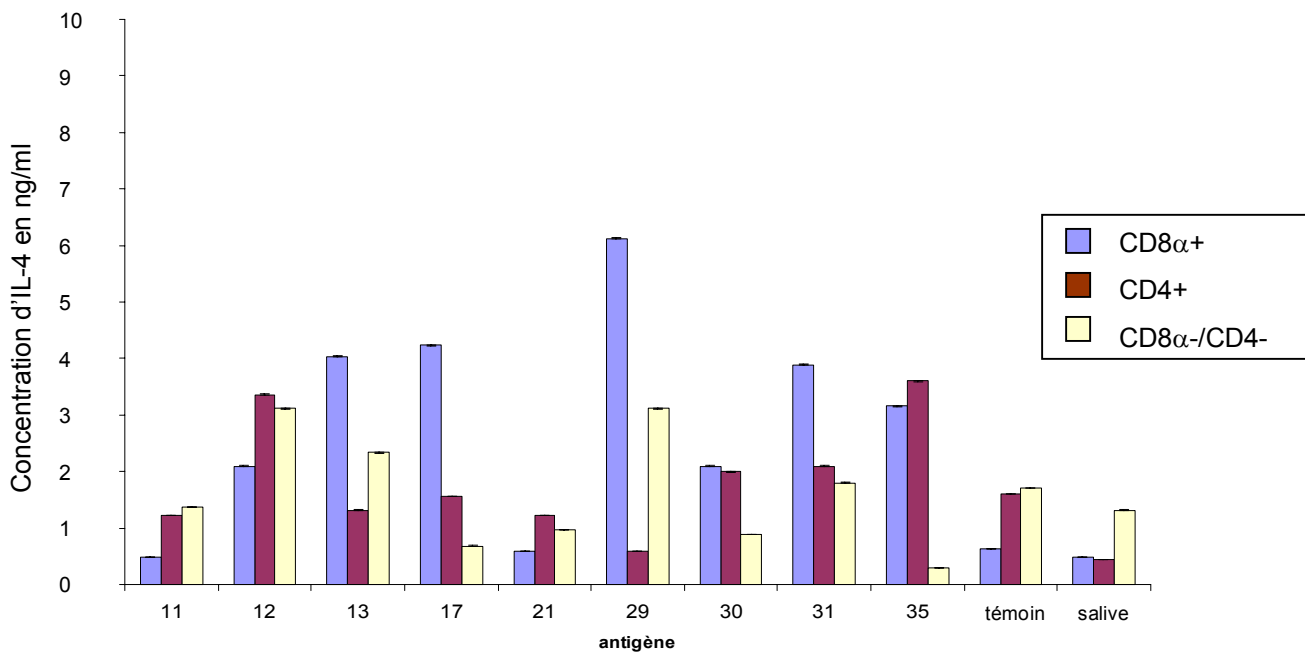


Fig 37 : IL-4 dans le surnageant de culture des lymphocytes de rate de souris après stimulation par les différentes sous-population de cellules dendritiques pulsées par différents antigènes de tiques. Les barres d'erreur indiquent l'écart type entre les valeurs obtenues chez trois souris donc 3 cultures différentes.

et restimulées *in vitro* avec le même antigène. L'IL-4 a été dosée par ELISA dans les surnageants de culture.

L'injection de cellules dendritiques CD8 α - pulsées par les fractions 11, 12 et 21 provoque une production d'IL-4 plus élevées que les cellules CD8 α +. La situation est inversée avec les fractions 13, 17, 29, 30, 31 et 35.

Toutes les sous-populations de cellules dendritiques pulsées avec la salive provoquent une faible production d'IL-4. Ceci est surprenant étant donné que la piqûre de tique et l'injection de sa salive provoque une réponse Th2 de la souris BALB/c⁽³²⁾.

Si nous considérons les fractions dans leur ensemble, nous avons tout de même une production d'IL-4 supérieure au témoin. Cela semble logique étant donnée la réponse Th2 de la souris infestée par *I. ricinus*.

Le témoin correspond à trois souris auxquelles ont été injectées des cellules dendritiques naïves.

3.7.2 Production d'IFN- γ

Les différentes sous-populations de cellules dendritiques naïves ont été incubées avec différents antigènes, soit les fractions sélectionnées (chapitre 3.5) et la salive. Ces cellules ont été injectées à des souris naïves, puis les cellules de rates ont été récupérées et restimulées *in vitro* avec le même antigène. Le surnageant de culture a été récupéré pour chaque puits et l'IFN- γ a été dosé par ELISA.

On remarque que la plupart des fractions n'engendre pas de production d'IFN- γ pour chacune des sous-populations de cellules dendritiques pulsées (fig 38).

L'injection de cellules dendritiques CD4+ naïves (témoin) provoque la production d'une grande quantité d'IFN- γ après restimulation *in vitro* avec de l'EGS.

Seule la fraction 21 provoque une forte production d'IFN- γ en pulsant les cellules dendritiques CD8 α +. Cette production dépasse les valeurs du témoin.

La salive engendre une plus forte production d'IFN- γ que le témoin avec les populations de cellules dendritiques CD8 α + et CD8 α -/CD4-. Seules les cellules dendritiques CD4+ pulsées par la salive ne produisent que peu d'IFN- γ .

Par rapport au témoin, la fraction 35 provoque une plus forte production d'IFN- γ avec les cellules dendritiques CD8 α + mais une plus faible production avec les deux autres sous-populations.

La fraction 17 engendre une plus forte quantité d'IFN- γ que le témoin seulement avec les cellules dendritiques CD8 α +

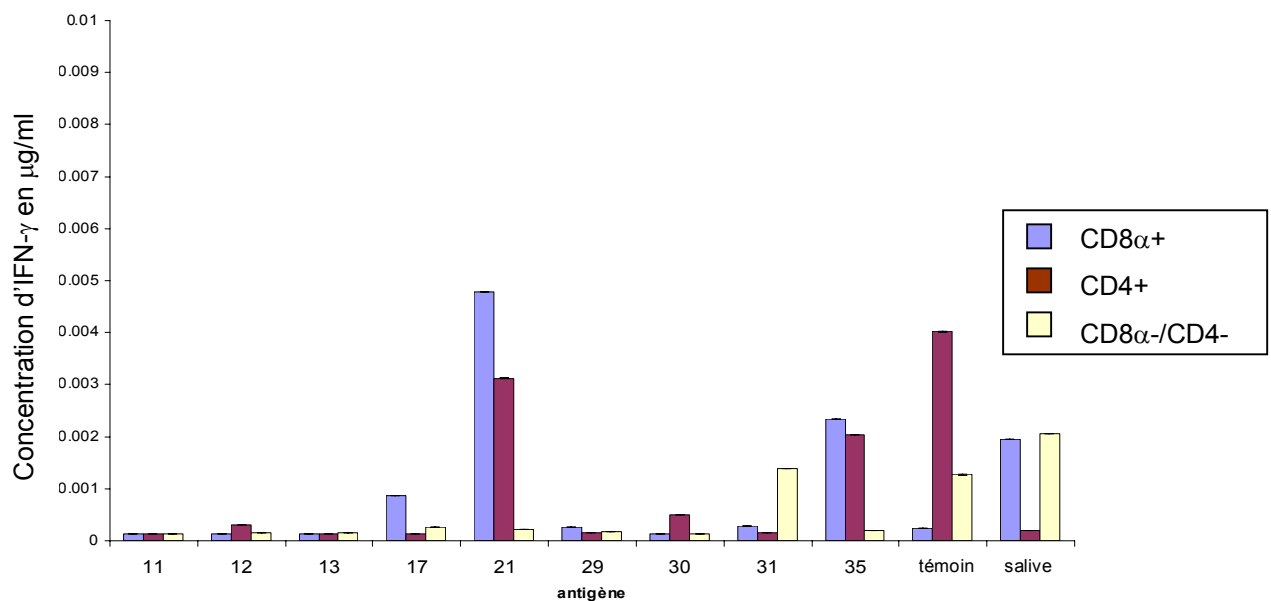


Fig 38 : IFN- γ dans le surnageant de culture de lymphocytes de rate de souris après stimulation par les différentes sous-population de cellules dendritiques pulsées par différents antigènes de tiques. Les petites barres d'erreur indiquent l'écart type entre les valeurs obtenues avec trois souris donc trois cultures différentes.

3.7.3 Rapport IL-4/IFN- γ pour chaque antigène de tiques et chaque sous-population de cellules dendritiques

Dans ce chapitre, nous présentons des rapports de production d'IL-4 et d'IFN- γ . Un résultat supérieur à 1 indique que la proportion d'IL-4 est plus importante que celle d'IFN- γ dans les surnageants de culture analysés.

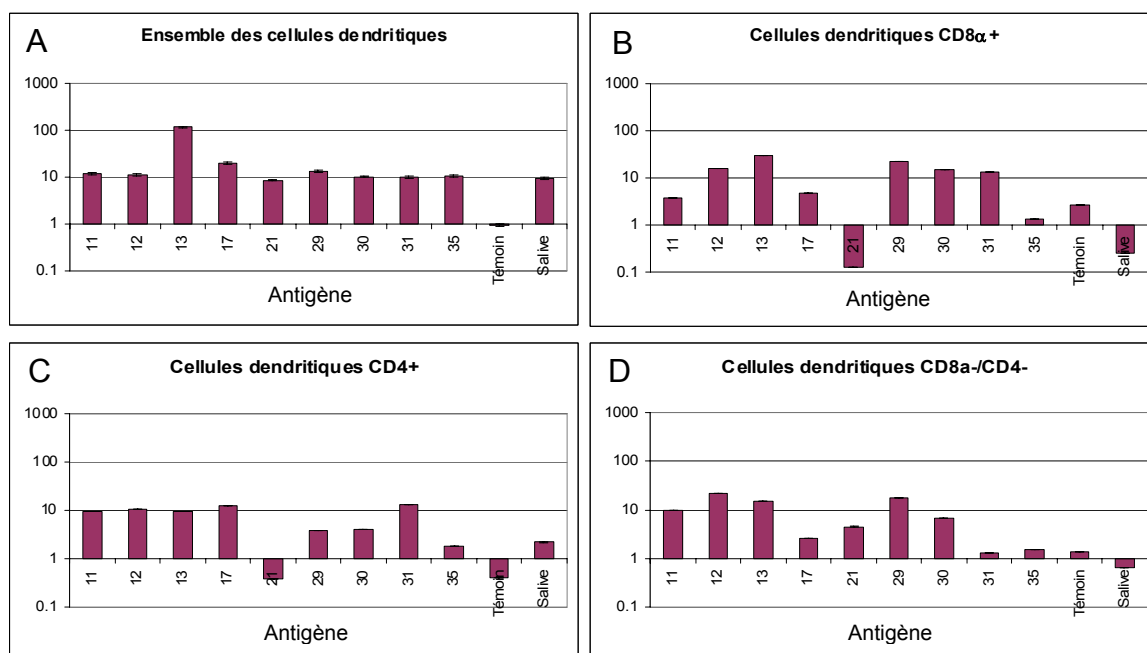


Fig 39 : Rapports IL-4/IFN- γ dans le surnageant de culture des lymphocytes de souris stimulées avec différentes sous-populations de cellules dendritiques pulsées par différents antigènes de tiques. Abscisse : antigène utilisé. Ordonnée : rapport IL-4/IFN- γ .

Avec l'ensemble des cellules dendritiques (fig 39 A) et pour tous les antigènes une plus forte proportion d'IL-4 que d'IFN- γ est observée. Les souris injectées avec des cellules dendritiques non « pulsées » produisent la même quantité d'IL-4 que d'IFN- γ . La réponse n'est pas polarisée après restimulation *in vitro* avec de l'EGS.

Les cellules dendritiques CD8 α (fig 39 B) pulsées par la fraction 21 et la salive provoquent une plus forte proportion d'IFN- γ que d'IL-4. Pour la première fois, nous

parvenons à induire une proportion plus importante d'IFN- γ que d'IL-4 avec un antigène de tique en stimulation secondaire de cellules spléniques. Le rapport IL-4/IFN- γ avec la fraction 21 est environ 50 fois plus petit que le rapport obtenu avec le témoin.

Avec les cellules dendritiques CD4⁺ (fig 39 C), toutes les fractions (sauf la fraction 21) montrent une proportion plus importante d'IL-4 que d'IFN- γ . Avec la fraction 21, la proportion IL-4/IFN- γ est identique à celle obtenue avec le témoin ayant reçu des cellules CD4⁺ naïves.

Toutes les fractions montrent un rapport IL-4/IFN- γ supérieur à 1 avec les cellules dendritiques CD8 α -/CD4- (fig 39 D). La salive provoque une proportion légèrement inférieure à 1.

4 Discussion

4.1 Production de cytokines et polarisation de la réponse

L'augmentation ou la diminution de certaines cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-4, IL-13, IL-5, IL-6) nous informe sur la polarisation de la réponse de la souris BALB/c ⁽⁸⁴⁾. Dans ce travail, nous avons porté l'accent sur la détection de l'IFN- γ qui est une cytokine typique d'une réponse Th1 et sur l'IL-4 qui caractérise une réponse Th2. Comme l'induction de la réponse nous intéresse et que l'IL-10 montre un effet synergique avec l'IL-4 ⁽⁸⁵⁾, elle a également été quantifiée. L'IL-10 polarise la réponse immunitaire vers Th2 en inhibant la production d'IL-12 par les cellules dendritiques ⁽⁸⁶⁾ ⁽⁸⁷⁾. L'expression d'IL-10 est due aux cellules T, B et monocytes, lesquels d'infiltrerent dans la peau lors d'une troisième réinfestation ⁽⁸⁸⁾

4.1.1 Etude de l'évolution d'IL-4, d'IFN- γ et IL-10

Il a été montré que la réponse immunitaire de la souris BALB/c est polarisée vers Th2 lors d'une infestation par tous les stades d'*I. ricinus* ⁽³⁴⁾. Une forte production d'IL-4 a été démontrée dans les ganglions drainant le site de fixation des tiques. La rate produit également de l'IL-4. La réponse Th2 des souris contre les tiques n'engendre pas de résistance contre ces ectoparasites. Dans notre travail, nous avons suivi l'évolution dans le temps de l'IFN- γ , de l'IL-4 et de l'IL-10 dans l'épiderme, le derme, les ganglions et la rate de souris BALB/c infestées par des larves *I. ricinus*. Nous avons infesté les oreilles des souris sans devoir les raser car imberbe à cet endroit. Nous avons ainsi diminué les risques de production d'IL-4 lors d'une éventuelle cicatrisation ⁽⁸⁹⁾.

4.1.2 L'épiderme

Lors d'une infestation, l'épiderme est transpercé par le rostre des larves de tiques, les antigènes sont ainsi injectés très superficiellement dans ce tissu. Nos résultats montrent une forte augmentation du rapport d'IL-4 au niveau de l'épiderme après 18

heures d'infestations par les larves d'*I. ricinus* (chap 3.1.1). Chez le cochon d'Inde, les antigènes de *Derma-centor andersoni* sont apprêtés par les cellules de Langerhans et présentés dans les ganglions drainant le site de fixation des tiques⁽⁹⁰⁾. Nous avons montré que la production d'IL-4 est due aux cellules T $\gamma\delta$, population de cellules T majoritaire dans ce tissu. Comme les cellules T $\gamma\delta$ sont activées sans l'intervention de CPA, la stimulation est sans doute obtenue par un effet direct de l'antigène sur ces cellules⁽⁹¹⁾. Les cellules T $\gamma\delta$ n'ont, en effet, pas besoin de reconnaître l'antigène en association avec les molécules du CMH pour être activées. Nous avons essayé sans succès de stimuler *in vitro* des cellules T $\gamma\delta$ naïves isolées avec de la salive d'*I. ricinus*. Nous avons également échoué dans la stimulation des cellules T $\gamma\delta$ avec de l'antigène apprêté par des cellules de Langerhans qui sont les seules cellules productrices d'IL-1 β dans l'épiderme⁽⁹²⁾. Il est possible que les cellules T $\gamma\delta$ soient stimulées par la blessure due à la pénétration du rostre dans l'épiderme. Toutefois, un effet des antigènes sécrétés ne peut être exclu puisque nous observons une forte production d'IL-4 par les T $\gamma\delta$ de la rate (chap 3.4).

L'IL-4 produite dans l'épiderme a sans doute deux effets. Elle intervient certainement dans le processus de cicatrisation de la lésion due à la pénétration du rostre et inhibe la migration des cellules de Langerhans vers les ganglions drainants^{(63) (93)}. Il est probable que l'inhibition de la migration des cellules de Langerhans est favorable aux tiques. En effet, retenant ces cellules dans l'épiderme, la tique peut ainsi empêcher une réaction rapide de la souris contre les antigènes qu'elle injecte pendant son repas. Ceci pourrait également expliquer la réponse tardive dans les ganglions drainants par rapport aux autres tissus examinés (chap 3.1). Nous ne prétendons pas que la production épidermique d'IL-4 participe à la polarisation systémique de la réponse immunitaire contre les tiques mais il est possible que l'IL-4 produite dans l'épiderme, emporté par le sang ait un effet sur la réponse de la rate. Des études supplémentaires sont nécessaires.

Comme nous n'avons pas pu induire de production d'IL-4 par les cellules T $\gamma\delta$ *in vitro*, nous pensons que d'autres facteurs interviennent dans l'induction *in vivo*. Dans notre système, l'IL-1 β favorise certainement la production d'IL-4. Nous savons qu'en culture, la stimulation des cellules TCD4+ naïves issues de la rate de souris BALB/c

par des cellules dendritiques en présence de salive de tique est favorisée si de l'IL-1 β est ajoutée au milieu de culture ⁽⁸³⁾. Il est possible que l'IL-1 β joue un rôle similaire sur les cellules T $\gamma\delta$ de l'épiderme. Dans l'épiderme de la souris, cette cytokine est exclusivement produite par les cellules de Langerhans ⁽⁹²⁾.

Si l'effet de l'IL-4 a été démontré sur les cellules de Langerhans, l'effet sur les cellules T de l'épiderme ⁽⁹⁴⁾ n'a pas fait l'objet d'études approfondies à notre connaissance.

Nous constatons que la production d'IFN- γ et d'IL-10 est inhibée dans l'épiderme lors du repas sanguin des larves d'*I. ricinus*. L'IL-4 ayant un effet négatif sur la production d'IFN- γ , il est logique d'observer une diminution de cette cytokine lorsque le taux d'IL-4 augmente. Il a été démontré que la production d'IL-10 des ganglions drainant le site de fixation des tiques après restimulation avec de la conA et des antigènes de glandes salivaires de tiques est due aux cellules TCD4+ ⁽⁶⁵⁾. Or ces cellules représentent une population minoritaire dans l'épiderme, la plus grande partie des cellules T étant des cellules T $\gamma\delta$.

4.1.3 Le derme

Même si le derme est en contact étroit avec l'épiderme, les différences de réaction entre ces deux tissus sont importantes. Le derme est soumis massivement à la salive injectée par les larves d'*I. ricinus*. En effet, le rostre des larves pénètre jusqu'au derme où est libérée la majeure partie de la salive. Ce tissu est infiltré par des éosinophiles, neutrophiles, basophiles, monocytes lors d'une troisième réinfestation ⁽⁸⁸⁾.

Dans notre travail, nous montrons que l'IL-4 augmente dans le derme à la fin de l'infestation (72-120 heures après le début de l'infestation) et baisse immédiatement après que les larves se sont détachées. L'augmentation du rapport d'IL-4 est moins importante dans le derme que dans l'épiderme (chap 3.1.1)

Le rapport d'IL-10 augmente aussi progressivement à la fin de l'infestation (chap 3.1.3). Cette cytokine est notamment produite par les cellules B, T et les monocytes, lesquels infiltreront le derme des souris infestées lors d'une troisième infestation ⁽⁸⁸⁾.

L'IL-10 a un effet synergique avec l'IL-4 ⁽⁸⁵⁾ dans la polarisation de la réponse vers Th2 entraînant une inhibition de la production de l'IFN- γ . Nos observations montrent que production de l'IFN- γ est inhibée dans le derme des souris pendant l'infestation par les larves (chap 3.1.2).

4.1.4 Les ganglions drainants

Le rapport d'IL-4 augmente progressivement durant le repas sanguin des larves de tiques (chap 3.1.1). Cette augmentation se poursuit 48 heures après le détachement des larves. La polarisation Th2 de la réponse immunitaire anti-tiques dans les ganglions drainant le site de fixation des tiques a été largement décrite ⁽³²⁾. Nos résultats confirment que l'IL-4 est sécrétée en grande quantité dans cet organe. Nous montrons aussi que le rapport d'IFN- γ reste bas (chap 3.1.2). L'augmentation du rapport d'IL-4 est plus tardive que dans la rate car les antigènes doivent être présentés aux lymphocytes ganglionnaires par les CPA. Les CPA apprêtent les antigènes et subissent une maturation pendant laquelle elles vont migrer dans les ganglions. Ce n'est qu'après l'achèvement de ce processus que les ganglions drainant le site de fixation des tiques sont stimulés. Les antigènes peuvent être présentés par les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques et les lymphocytes B ⁽⁹⁵⁾.

Dans notre travail, nous observons une diminution de l'IL-10 dans les ganglions drainants (chap 3.1.3). Lors d'une première infestation, il a été montré que le taux d'IL-10 n'augmentait pas de manière significative ⁽⁶⁵⁾. Ganapamo avait prélevé les cellules ganglionnaires à la fin du repas sanguin des tiques et les avait restimulées *in vitro*. Dans notre travail, la mesure d'IL-10 a été effectuée sur les cellules prélevées directement à partir des ganglions drainants pendant le repas sanguin. Le peu d'IL-

10 détecté pourrait inhiber la présentation des antigènes aux cellules Th1 par les cellules de Langerhans ⁽⁹⁶⁾.

4.1.5 La rate

Dans la rate, l'évolution de la quantité de messagers de l'IL-4 est très intéressante (chap 3.1.1). Nous constatons une première hausse de la production de cette cytokine après 12 heures d'infestation, puis le taux d'IL-4 diminue avant d'augmenter à nouveau 72 heures après le début de l'infestation. Comme la rate est un organe profond, il est surprenant qu'elle soit déjà stimulée après 12 heures d'infestation. Les antigènes doivent parvenir à la rate rapidement, sans doute, par voie sanguine. Il est envisageable que les cellules T sont directement stimulées par les antigènes sans être présentés par des cellules spécialisées. Les résultats décrits dans le chapitre 3.4 montrent que les cellules T $\gamma\delta$ sont les principales productrices d'IL-4 dans cet organe, celle-ci ne nécessitent pas de présentation d'antigène pour être activées ⁽⁹⁷⁾ ⁽⁹⁸⁾. Une seconde augmentation de l'IL-4 splénique est observée après 72 heures d'infestation. Il est probable que celle-ci est due à une stimulation à la suite d'une présentation des antigènes par les cellules dendritiques de la rate. Comme nous avons démontré que l'ensemble des cellules dendritiques engendre une réponse Th2 lorsqu'elles sont en contact de la salive de tique (chap 3.7.3), cette hypothèse semble plausible. A partir du moment où les tiques se détachent et n'injectent plus de salive l'augmentation de la production d'IL-4 s'arrête. Les cellules T $\gamma\delta$ de la rate produisent de l'IL-4 et pourraient jouer un rôle essentiel dans la polarisation de la réponse de la souris BALB/c contre les larves d'*I. ricinus* ⁽⁹⁹⁾.

4.2 Etudes des sous-populations de cellules dendritiques pulsées avec différents antigènes salivaires d'*Ixodes ricinus*

Il est possible d'induire une réponse immunitaire en injectant des cellules dendritiques « pulsées » avec certains peptides ⁽⁶¹⁾ ou de la β -galactosidase ⁽⁶⁰⁾. Nous avons provoqué une réponse immunitaire en injectant des cellules pulsées avec des antigènes d'*I. ricinus*. Certaines fractions d'EGS entraînent une prolifération

cellulaire plus importante que d'autres (chap 3.5). Nous avons sélectionné les fractions qui induisaient la prolifération de cellules spléniques la plus élevée lors d'une stimulation secondaire *in vitro*. Ces cellules provenaient de souris BALB/c qui avaient été inoculées avec des cellules dendritiques pulsées par les mêmes fractions. Une prolifération ne signifie pas forcément une production de cytokines.

La PGE₂ inhibe une éventuelle réponse Th1 favorisant ainsi la polarisation vers Th2⁽⁶⁸⁾. La prostaglandine E₂ (PGE₂), détectée dans la salive des tiques et dans l'EGS non fractionné, est absente des fractions utilisées dans notre travail. Nous pouvons ainsi exclure une influence de la PGE₂ dans notre expérience. La dialyse des fractions et l'utilisation de l'ultrafiltration pour les concentrer élimine la PGE₂.

La plupart des fractions provoquent une réponse Th2, soit une production plus importante d'IL-4 comparée à l'IFN- γ . Toutefois, nous constatons que la fraction 21 induit une forte production d'IFN- γ . La salive contient de la PGE₂⁽⁶⁶⁾. Cependant, elle aussi, induit une augmentation du rapport d'IFN- γ en pulsant les cellules dendritiques CD8 α + (chap 3.7.2).

4.2.1 Rôle des cellules dendritiques de la souris BALB/c dans l'immunité anti-*I. ricinus*

Comme nos résultats le montrent, les cellules dendritiques capturent et apprêtent les antigènes de la salive d'*I. ricinus* (chap 3.6). L'appartenance des cellules dendritiques aux différentes sous-populations a une importance fondamentale dans la polarisation de la réponse⁽¹⁰⁰⁾. Soumises aux antigènes salivaires d'*I. ricinus*, les différentes sous-populations polarisent la réponse de différentes manières (chap 3.6).

Des études ont montré que les cellules TCD4+ produisent de l'IL-4 dans les ganglions drainant le site de fixation des tiques. Nous avons montré que les cellules T $\gamma\delta$ de l'épiderme et de la rate produisent aussi de l'IL-4 en réponse à la piqûre des larves d'*I. ricinus*. La nature des composants de la salive de cet ectoparasite n'est

pas le seul facteur induisant une réponse systémique Th2. Nous observons que les cellules dendritiques CD8 α + provoquent une production importante d'IFN- γ lorsqu'elles sont soumises à la salive de la tique (fig 39C). De nombreuses études ont été menées pour déterminer l'influence du type de cellules dendritiques sur la polarisation de la réponse. En 1999, une étude démontre que lorsque l'antigène est présenté par les cellules dendritiques CD8 α + à des cellules T naïves, la réponse a tendance à être déviée vers Th1⁽⁵⁸⁾. Ce n'est pas le cas avec les cellules dendritiques CD8 α -. Les cellules dendritiques CD8 α + issues de souris déficientes en IL-12 perdent cette propriété, indiquant que l'IL-12 est essentielle pour l'initiation d'une réponse Th1. Les cellules dendritiques CD8 α + produisent plus d'IL-12 que les cellules dendritiques CD8 α -⁽⁵⁹⁾. Cette propriété pourrait jouer un rôle capital dans la polarisation de la réponse vers Th1.

Dans un modèle naturel, nous envisageons que la salive d'*I. ricinus* stimule préférentiellement les cellules dendritiques CD8 α - et, par conséquent, induit une réponse Th2 *in vivo*.

Si les cellules dendritiques jouent un rôle clef dans l'induction et la polarisation de la réponse immunitaire, nous ne devons pas oublier que le système *in vivo* est extrêmement complexe et que la régulation de la réponse des différentes sous-populations de cellules dendritiques est gérée par l'environnement de ces cellules. Dans nos expériences, l'antigène est délivré aux cellules dendritiques dans un milieu simple. *In vivo*, les antigènes sont captés et apprêtés alors que l'ensemble des cellules dendritiques est présent. De plus, les cellules dendritiques sont soumises aux cytokines secrétées par les autres cellules comme les cellules T. Il a été démontré que l'IL-12 est déterminante dans l'induction d'une réponse Th1 par les cellules dendritiques alors que l'IL-10 inhibe les cellules CD8 α + impliquées dans cette polarisation⁽⁶⁴⁾. L'IL-12 est importante pour induire la production d'IFN- γ par les cellules dendritiques CD8 α +⁽¹⁰¹⁾. Or, lors de l'infestation de la souris par *I. ricinus*, l'IL-4 produit dans l'épiderme par les cellules T $\gamma\delta$ (chap 3.2), dans les ganglions par les cellules TCD4+⁽³²⁾ et dans la rate par les cellules T $\gamma\delta$ (chap 3.4) inhibe la production d'IL-12. La production rapide d'IL-4 dans la rate empêche sans doute les cellules CD8 α + de polariser la réponse vers Th1.

Certains animaux, comme les lapins, développent une résistance contre les femelles d' *I. ricinus* ⁽³⁸⁾. Cette résistance semble liée à l'activation des basophiles ⁽²²⁾. Actuellement, aucune corrélation entre la polarisation Th1 de la réponse immunitaire et la résistance contre les tiques n'a été démontrée. Dans ce travail nous montrons que les cellules dendritiques CD8 α + induisent une forte production d'IFN- γ lorsqu'elles sont pulsées par de la salive d'*I. ricinus* (fig 39C). Des études montrent que le changement de polarisation de la réponse immunitaire de Th2 vers Th1 entraîne une résistance contre *Leishmania major* ⁽¹⁰²⁾ ⁽¹⁰³⁾. Si nous considérons que la réponse Th2 de la souris contre la tique favorise le repas sanguin, nous pouvons envisager que la polarisation Th1 détermine une résistance en empêchant que la tique se nourrisse avec succès.

4.3 Limite du travail et voie future

Nous avons vu qu'une production importante d'IL-4 au niveau de la peau était détectée rapidement. Nous avons également constaté que les cellules T $\gamma\delta$ étaient responsables de la production de cette cytokine. Même si nous avons émis quelques hypothèses, nous ignorons à quel point cette production d'IL-4 peut polariser la réponse de la souris BALB/c contre la piqûre de tiques. Il est probable que l'IL-4 produite par les cellules T $\gamma\delta$ inhibe la migration des cellules de Langerhans et favorise le repas sanguin de la tique. Il serait intéressant d'examiner ce qui se passe avec des souris déficientes en T $\gamma\delta$. Il est également possible que l'IL-4 produite dans la rate empêche l'induction d'une réponse Th1 par les cellules dendritiques CD8 α +

La rate produit rapidement de l'IL-4, même plus rapidement que les ganglions drainants (chap 3.1.1). Des antigènes parviennent rapidement à la rate, sans doute, par voie systémique.

Les ganglions drainant le site de fixation des tiques réagissent plus tardivement que la rate. Dans ce cas, il est probable que les antigènes sont pris en charge par les cellules dendritiques de la peau. Ces cellules subissent une maturation qui va

engendrer leur migration dans les ganglions. Ces cellules présentent alors l'antigène aux cellules T et provoquent leur prolifération et une production d'IL-4.

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur l'IL-4, l'IFN- γ et l'IL-10. D'autres cytokines pourraient aussi interagir avec les cellules actives dans la réponse anti-tiques de la souris.

Nous avons montré que les cellules dendritiques peuvent être « pulsées » *in vitro* avec la salive d'*I. ricinus* ainsi que par des fractions d'EGS. Nous avons examiné 9 fractions d'EGS, le travail pourrait être étendu à d'autres fractions. Les fractions étant encore des mélanges complexes de protéines (chap 3.6.1), une purification plus fine des protéines de l'EGS ou l'utilisation de protéines salivaires recombinantes permettraient d'étudier plus précisément le comportement des différentes sous-populations de cellules dendritiques face à des antigènes mieux caractérisés.

L'usage de protéines induisant une réponse Th1 après injections de cellules pulsées pourraient éventuellement induire une résistance de la souris BALB/c qui est normalement susceptible aux tiques.

Comme certains travaux le montrent, la polarisation de la réponse immunitaire est très importante lors de la transmission de pathogènes par les tiques⁽²⁸⁾. Une meilleure connaissance de la modulation de la réponse par les cellules dendritiques pourrait nous donner de précieuses informations pour limiter la transmission de pathogènes.

5 Résumé

Il est connu que la piqûre de la tique *I. ricinus* induit une réponse Th2 chez la souris BALB/c. Cette réponse se traduit par une production importante d'IL-4 dans les ganglions drainant le site de fixation des tiques et la rate.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la production d'IL-4, d'IFN- γ et d'IL-10 dans différents tissus : épiderme, derme, ganglions et rate. De plus, nous avons cherché quelles populations cellulaires produisent de l'IL-4 dans l'épiderme et la rate.

Alors qu'une autre étude a montré que l'IL-4 produite dans les ganglions était due aux cellules TCD4⁺ ⁽³²⁾, nos résultats mettent en évidence que l'augmentation importante et rapide du rapport d'IL-4 dans l'épiderme et la rate est principalement due aux cellules T $\gamma\delta$ présentes dans ces deux tissus.

Nous montrons que l'appartenance des cellules dendritiques à certaines sous-populations influence l'induction et la polarisation de la réponse immunitaire anti-tiques de la souris.

Nous réussissons à induire une réponse immunitaire en injectant à des souris naïves des cellules dendritiques « pulsées » avec la salive et diverses fractions d'EGS. Les cellules dendritiques CD8 α ⁺ « pulsées » avec la salive et la fraction 21 de l'EGS provoquent une forte production d'IFN- γ lorsque les cellules de la rate sont restimulées *in vitro* avec le même antigène. Il paraît donc possible d'induire une réponse Th1 avec de l'antigène de la tique *I. ricinus*.

Le lien entre une réponse Th1 et une résistance de la souris contre la tique n'est pas établi. Une résistance se traduirait par des problèmes de nutrition, de mue et de ponte de la tique et ainsi interromprait le cycle de vie de l'ectoparasite.

Il se pourrait également que la polarisation de la réponse vers Th1 empêche ou limite la transmission de pathogènes comme *Borrelia burgdoferi sensu lato*, agent de la borréliose de Lyme.

6 Remerciements

Mes premiers remerciements vont au jury de thèse qui m'a fait passer un examen agréable et convivial. Mm. Maestroni, Betschart, Brossard et Rutti ont pris beaucoup de leur temps pour lire et relire mon manuscrit et m'ont fait part de remarques toutes plus constructives les unes que les autres.

Je tiens à remercier le Professeur Michel Brossard qui m'a accueilli dans son laboratoire. Sa disponibilité, son soutien et son amabilité m'ont permis d'arriver au terme de cette thèse dans des conditions les plus agréables. Je le remercie pour sa confiance et son soutien quotidien.

Mes remerciements vont également au Professeur Bruno Betschart qui m'a confié le poste d'assistant en parasitologie. Ce poste m'a permis d'effectuer cette thèse au sein du laboratoire d'immunologie. Les contacts que j'ai établis avec lui ont toujours été cordiaux.

Je remercie le Docteur Bernard Rutti avec lequel il m'a été possible d'échanger des idées et de collaborer dans d'excellentes conditions.

Merci à Géraldine Robert, Laurent Burnier et Nicola Franscini qui ont fourni un travail précieux pendant leur travail de diplôme. Leurs résultats m'ont donné les bases nécessaires pour commencer mon travail.

Je remercie également le Dr. Naceur Mejri, qui m'a initié à certaines techniques de laboratoire et qui m'a toujours encouragé au début de ma thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi à Jessica Chopard, Samoa Trolliet et Carol Martins, qui ont participé à certaines étapes du travail.

Je remercie Olivier Rais dit Pitou pour les nombreuses tiques dont j'ai eu besoin, les secrétaires Brigitte Cattin et Natacha Schneiter pour leur travail exemplaire et Dr. Jacqueline Moret pour ses conseils en statistique.

Enfin mes remerciements à mes parents Sylvie et Denis Lorimier qui m'ont toujours encouragé à poursuivre des études et m'ont soutenu pendant mon long périple universitaire et à ma compagne Karine Nobs qui a fait preuve de beaucoup de patience et de compréhension tout au long de cette thèse. Denis Lorimier a aussi pris beaucoup de son temps pour veiller à la bonne forme grammaticale et orthographique de ce document.

Mes remerciements vont à Geoges Nobs qui s'est occupé des copies et de la reliure des exemplaires imprimés.

7 Annexe

7.1 FPLC

Méthode d'activation :

0.0	CONC %B	0.0	(seul le tampon A passe dans le système)
0.0	ML/MIN	1.0	(débit de 1 ml/min)
0.0	VALVE.POS	1.2	(faire passer du tampon par la boucle d'échantillon)
5.0	CONC %B	0.0	(jusqu'à 5 ml)
5.0	CONC %B	100.0	(à 5 ml, fait passer le tampon B)
15.0	CONC %B	100.0	(jusqu'à 15 ml)
15.0	CONC %B	0.0	(fait passer le tampon A)
20.0	CONC %B	0.0	(jusqu'à 20 ml)
20.0	VALVE.POS	1.1	(remet la valve en position de charge)
22.0	CONC %B	0.0	(arrête le système à 22 ml)

Cette méthode effectue un gradient linéaire du tampon A ou tampon B puis du tampon B au tampon A. Elle permet à d'éventuelles protéines de se détacher et équilibre la colonne avec le tampon A.

Méthode de charge de l'échantillon :

Il faut tout d'abord régler le volume d'échantillon récupéré par le collecteur de fractions à 10 ml/tube.

0.0	CONC %B	0.0	(seul le tampon A passe dans le système)
0.0	ML/MIN	1.0	(débit de 1 ml/min)
0.0	CM/ML	0.50	(avance du papier de l'imprimante : 0.5 cm/ml)
0.0	VALVE.POS	1.1	(valve en position de charge)
1.0	PORT.SET	6.1	(active le carrousel de récupération)
1.0	CLEAR DATA		(efface les données stockées)
1.0	VALVE.POS	1.2	(injecte l'échantillon dans la colonne)

1.0	MONITOR	1	(active l'impression de l'absorbance)
1.0	LEVEL %	5.0	(indique quel niveau d'absorbance indique un pic)
1.0	ML/MARK	1.0	(imprime une marque à chaque ml écoulé)
1.0	INTEGRATE	1	(intègre les données)
10.0	CONC %B	0.0	(arrête le système à 10 ml)
10.0	INTEGRATE	0	(arrête l'intégration des données)

L'échantillon est injecté dans la colonne et les protéines qui ne se fixent pas sont éluées par le passage d'un volume de tampon 10 fois supérieur au volume de la colonne.

Méthode d'élution :

Il faut tout d'abord régler le volume d'échantillon récupéré par le collecteur de fractions à 0.5 ml/tube.

0.0	CONC %B	0.0	(pompe A uniquement)
0.0	ML/MIN	1.0	(débit : 1 ml/min)
0.0	CM/ML	0.50	(déroulement du papier de l'imprimante : 0.5 cm/ml)
0.0	PORT.SET	6.1	(activation du carrousel de récupération)
0.0	VALVE.POS	1.1	(valve en position de charge)
1.0	CLEAR DATA		(effacement des données stockées)
1.0	ML/MARK	1.0	(marque sur le papier à chaque ml écoulé)
1.0	MONITOR	1	(active l'impression de l'absorbance UV $\lambda=280$ nm)
1.0	LEVEL %	5.0	(indique quel niveau d'absorbance indique un pic)
1.0	CONC %B	0.0	(début du gradient : pompe A uniquement)
1.0	INTEGRATE	1	(intègre les données)
21.0	CONC %B	100	(fin du gradient : pompe B uniquement)
21.0	INTEGRATE	0	(fin de l'intégration des données)

La méthode effectue un gradient linéaire du tampon A vers le tampon B. Les protéines sont éluées. Un graphe est imprimé. Il indique l'absorbance à 280 nm de l'éluat. Les fractions de 0.5 ml sont récoltées.

7.2 Comptage de la scintillation :

Paramètre du compteur à scintillation :

- Display B
- Time 0.5
- K-Counts 800
- LCR Off
- Windows H³
- Lower level 100
- Upper level 750
- Attenuator 100 (L-U)

7.3 PCR

7.3.1 “Master Mix”

	Test de rétrotranscription	PCR compétitives
Eau	15.87 µl	35.75 µl
Tampon 10x	2.5 µl	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)		2 µl
DNTPs (10mM)	0.5 µl	1 µl
Amorce 1 (20 µM)	0.5 µl	1 µl
Amorce 2 (20 µM)	0.5 µl	1 µl
Taq-polymérase 5U/µl (Bioline)	0.13 µl	
Hotstartaq (Qiagen)		0.25 µl

L'utilisation de la taq-polymérase Bioline ne nécessite pas d'adjonction de MgCl₂. Les PCR compétitives sont effectués dans un milieu réactionnel final de 50 µl alors que le test de la rétrotranscription est effectué dans 20 µl.

7.3.2 Cycles de PCR

Programmation du Mastercycler, Eppendorf®

Test de la rétrotranscription	PCR compétitive IL-4, HPRT, IFN-γ	PCR compétitive IL-10
CTRL BLOCK	CTRL BLOCK	CTRL BLOCK
LID = 110°	LID = 110°	LID = 110°
1 T=94° 0:3:00	1 T=95° 0:15:00	1 T=95° 0:15:00
2 T=94° 0:0:40	2 T=94° 0:0:40	2 T=94° 0:0:30
3 T=60° 0:0:20	3 T=60° 0:0:20	3 T=52° 0:0:30
4 T=72° 0:0:40	4 T=72° 0:0:40	4 T=72° 0:0:30
5 GOTO 2 REP 35	5 GOTO 2 REP 35	5 GOTO 2 REP 35
6 T=72° 0:10:0	6 T=72° 0:10:0	6 T=72° 0:10:0
7 HOLD 4.0° ENTER	7 HOLD 4.0° ENTER	7 HOLD 4.0° ENTER
end	end	end

La Hotstartaq Qiagen nécessite une incubation d'activation à 95°C pendant 15 min. La température « d'annealing » des amorces de l'IL-10 diffère de celle des amorces de l'IL-4, IFN-γ et IL-10.

7.3.3 Séquences des amorces

<u>Cible</u>	<u>Amorce 1 (5'-3')</u>	<u>Amorce 2 (5'-3')</u>
HPRT	GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG	GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT
IFN-γ	CATTGAAAGCCTAGAAAGTCTG	CTCATGAATGCATCCTTTTTTCG
IL-4	CATCGGCATTTTGAACGAGGTCA	CTTATCGATGAATCCAGGCATCG
IL-10	TACTTGGGTTGCCAAGCCTT	TTCACAGAGAAGCTCAGTAAAT

7.4 Résultats des mesures de messagers chez la souris BALB/c naïve

	Epiderme		Derme		Ganglions		Rate	
Quantité	2 oreilles		2 oreilles		2 ganglions		1 rate	
Dilution de l'ARN pour la rétrotranscription	1 : 4		1 : 4		1 : 4		1 : 20	
Messagers de l'IL-4 en pg/ μ l	$2.8 \cdot 10^{-5}$	$3.2 \cdot 10^{-5}$	0.02	0.02	0.004	0.004	0.004	0.004
Messagers de l'IFN- γ en pg/ μ l	$8 \cdot 10^{-6}$	$1.2 \cdot 10^{-5}$	0.4	0.4	0.28	0.32	0.8	1.2
Messagers de l'IL-10 en pg/ μ l	0.08	0.12	$8 \cdot 10^{-5}$	$1.2 \cdot 10^{-4}$	0.8	1.2	0.4	0.6
Messagers de l'HPRT en pg/ μ l	1.5	2	3	4	0.3	0.4	1	2
	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2

7.5 Résultats des mesures de messagers chez la souris BALB/c infestée

7.5.1 Epiderme

Temps d'infestation en heures	5		12		18		24		72		120		168	
Messagers de l'IL-4 en pg/ μ l	0.002	0.002	0.00008	0.00012	0.0014	0.0014	0.0008	0.0012	0.0008	0.0012	0.0004	0.0006	0.08	0.016
Messagers de l'IFN- γ en pg/ μ l	0	0	0	0	0	0	0	0	0.004	0.006	0.04	0.06	0.08	0.12
Messagers de l'IL-10 en pg/ μ l	0.008	0.012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Messagers de l'HPRT en pg/ μ l	0.25	0.25	0.01	0.15	0.005	0.005	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	1	1.5
	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2

7.5.2 Derme

Temps d'infestation en heures	5		12		18		24		72		120		168	
Messagers de l'IL-4 en pg/ μ l	0.002	0.002	0.002	0.002	0.0028	0.0032	0.0014	0.0016	0.0014	0.0016	0.02	0.022	0.05	0.16
Messagers de l'IFN- γ en pg/ μ l	0	0	0.02	0.02	0	0		0	0	0	0	0	0	0
Messagers de l'IL-10 en pg/ μ l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Messagers de l'HPRT en pg/ μ l	3	4	3	4	1	2	0.3	0.4	1	2	0.4	0.45	25	25
	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2

7.5.3 Ganglions

Temps d'infestation en heures	5		12		18		24		72		120		168	
Messagers de l'IL-4 en pg/ μ l	0.002	0.002	0.004	0.006	0.008	0.012	0.006	0.0012	0.008	0.012	0.28	0.32	0.4	0.4
Messagers de l'IFN- γ en pg/ μ l	0.004	0.006	0.08	0.12	0.008	0.012	0.008	0.012	0.32	0.36	0.4	0.6	0.024	0.028
Messagers de l'IL-10 en pg/ μ l	0.8	1.2	0.8	1.2	0.04	0.06	0.04	0.06	0.002	0.002	0.028	0.032	0.005	0.007
Messagers de l'HPRT en pg/ μ l	0.3	0.35	0.3	0.35	0.3	0.4	0.25	0.25	0.25	0.25	2.5	2.5	1	2
	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2

7.5.4 Rate

Temps d'infestation en heures	5		12		18		24		72		120		168	
Messagers de l'IL-4 en pg/ μ l	0.004	0.004	0.0014	0.0016	0.008	0.012	0.0028	0.0032	0.00028	0.00032	0.08	0.16	0.04	0.04
Messagers de l'IFN- γ en pg/ μ l	0.6	0.8	0.02	0.02	0.28	0.32	0.04	0.04	0.006	0.008	2.4	2.8	0.08	0.12
Messagers de l'IL-10 en pg/ μ l	0.4	0.6	0.002	0.002	0.008	0.012	0.014	0.016	0.00008	0.00012	0.005	0.007	0.00008	0.00012
Messagers de l'HPRT en pg/ μ l	5	5	0.025	0.025	0.25	0.25	0.3	0.4	0.005	0.005	1	2	0.05	0.05
	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2	Souris 1	Souris 2

7.5.5 Valeurs des messagers d'IL-4 et HPRT produits par différentes populations cellulaires de l'épiderme de souris BALB/c infestées

Types de cellules	T $\gamma\delta$	Autres cellules T	Cellules non T
IL-4 à 18 heures	0.51	0.04	0
HPRT à 18 heures	1.5	4	3
IL-4 à 168 heures	0.5	0.0125	0
HPRT à 168 heures	1.5	1.5	1.5
IL-4 souris naïve	0.007	0.5	0.8
HPRT souris naïve	1.5	6	2.5

7.5.6 Valeurs des messagers d'IL-4 et HPRT produits par différentes populations cellulaires de rate de souris BALB/c infestée

Types de cellules	T $\gamma\delta$	TCD4+	TCD8+
IL-4 avec infestation	0.008	0.4	0.028
HPRT avec inf.	0.35	100	10
IL-4 souris naïve	0.03	0.04	0.4
HPRT souris naïve	10	15	10

8 Bibliographie

1. Salter , R. D. and Dong , X. Regulation of antigen capture, MHC biosynthesis, and degradation by dendritic cells. 2001. Dendritic cells. Academic Press(11): 151-163
2. Schmidt , G. D and Roberts , L. S. Parasitic arachnids: order acari, the ticks and mites. 1985. Foundation of parasitology. Third Edition(40): 715-741
3. Becker-Andre, M. and Hahlbrock, K. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). Nucleic Acids Res. 1989. 17(22): 9437-9446
4. Aeschlimann, A. *Ixodes ricinus*, Linné 1758 (*Ixodoidea*, *Ixodidae*). Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. Acta Tropica. 1972. 29:321-340
5. Ribeiro, J. M. C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. Ann Rev Entomol. 1987. 32:463-478
6. Ribeiro, J. M. C., Makoul, G. T., Levine, J., Robinson, D. R., and Spielman, A. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. J Exp Med. 1985. 161:332-344
7. Fezza, F., Dillwith, J. W., Bisogno, T., Tucker, J. S., Di, Marzo, V, and Sauer, J. R. Endocannabinoids and related fatty acid amides, and their regulation, in the salivary glands of the lone star tick. Biochim Biophys Acta. 2003. 1633(1): 61-67
8. Bennett , G. F. *Boophilus microplus* (*Acari: Ixodidae*): experimental infestations on cattle restrained from grooming. Expl Parasitol. 1969. (26): 323-328
9. Mejri, N., Rutti, B., and Brossard, M. Immunosuppressive effects of *Ixodes ricinus* tick saliva or salivary gland extracts on innate and acquired immune response of BALB/c mice. Parasitol Res. 2002. 88(3): 192-197
10. Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., and Godfroid, E. Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. J Biol Chem. 2002. 277(12): 10083-10089
11. Ferreira, B. R. and Silva, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. Vet Immunol Immunopathol. 1998. 64(3): 279-293

12. Brossard, M. and Rais, O. Passage of hemolysins through the midgut epithelium of female *Ixodes ricinus* L. fed on rabbits infested or reinfested with ticks. *Experientia*. 1984. 40(6): 561-563
13. Wang, H. and Nuttall, P. A. Immunoglobulin-G binding proteins in the ixodid ticks, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* and *Ixodes hexagonus*. *Parasitology*. 1995. 111:161-165
14. Gillespie, R. D., Dolan, M. C., Piesman, J., and Titus, R. G. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *J Immunol*. 2001. 166(7): 4319-4326
15. Hajnicka, V., Kocakova, P., Slavikova, M., Slovak, M., Gasperik, J., Fuchsberger, N., and Nuttall, P. A. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunol*. 2001. 23(9): 483-489
16. Zeilhofer, H. U. and Schorr, W. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. *Curr Opin Hematol*. 2000. 7(3): 178-182
17. Paesen, G. G., Adams, P. L., Harlos, K., Nuttall, P. A., and Stuart, D. I. Tick Histamine-Binding Proteins: Isolation, Cloning, and Three-Dimensional Structure. *Molecular Cell*. 1999. 3:661-671
18. Brossard, M. Rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L.: effects of mepyramine on acquired resistance. *Experientia*. 1982. 38:702-704
19. Wikel, S. K. Histamine content of tick attachment sites and the effects of H1 and H2 histamine antagonists on the expression of resistance. *Ann Trop Med Parasitol*. 1982. 76:179-185
20. Valenzuela, J. G., Charlab, R., Mather, T. N., and Ribeiro, J. M. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem*. 2000. 275(25): 18717-18723
21. Dizij, A. and Kurtenbach, K. *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquired resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. *Parasite Immunol*. 1995. 17
22. Brossard, M. and Fivaz, V. *Ixodes ricinus* L.: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or re-infested rabbits. *Parasitology*. 1982. 85:583-592

23. Barbour, A. G., Burgdorfer, W., Hayes, S. F., Péter, O., and Aeschlimann, A. Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Curr Microbiol.* 1983. 8:123-126
24. Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., Peter, O., Hayes, S. F., and Philip, R. N. *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Tropica.* 1979. 36: 357367-
25. Liz, J. and Pfister, K. Enquête sur l'Ehrlichiose bovine (fièvre de pâture) en Suisse. *Revue suisse de médecine vétérinaire.* 1989. 67-68
26. Foppa, I. M., Krause, P. J., Spielman, A., Goethert, H., Gern, L., Brand, B., and Telford, S. R. Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, eastern Switzerland. *Emerg Infect Dis.* 2002. 8(7): 722-726
27. Gern, L. and Brossard, M. [Annual evolution of the infestation of cattle with the tick *Ixodes ricinus* L. and infestation of these ectoparasites by *Babesia divergens* in Clos-du-Doubs (Jura, Switzerland)]. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 1986. 128(7): 361-363
28. Wikel, S. K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int J Parasitol.* 1999. 29(6): 851-859
29. Christe, M., Rutti, B., and Brossard, M. Cytokines (IL-4 and IFN-gamma) and antibodies (IgE and IgG2a) produced in mice infected with *Borrelia burgdorferi sensu stricto* via nymphs of *Ixodes ricinus* ticks or syringe inoculations. *Parasitol Res.* 2000. 86(6): 491-496
30. Crippa, M., Rais, O., and Gern, L. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2002. 2(1): 3-9
31. Ganapamo, F., Rutti, B., and Brossard, M. Identification of an *Ixodes ricinus* salivary gland fraction through its ability to stimulate CD4+ T cells present in BALB/c mice lymph nodes draining the tick fixation site. *Parasitol.* 1997. 115:91-96
32. Ganapamo, F., Rutti, B., and Brossard, M. *In vitro* production of interleukin-4 and interferon-gamma by lymph node cells from BALB/c mice infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Immunology.* 1995. 85:120-124

33. Mbow, M. L., Rutti, B., and Brossard, M. IFN-gamma IL-2, and IL-4 mRNA expression in the skin and draining lymph nodes of BALB/c mice repeatedly infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Cell Immunol.* 1994. 156:254-261
34. Mejri, N., Franscini, N., Rutti, B., and Brossard, M. Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. *Parasite Immunol.* 2001. 23(2): 61-69
35. Ferreira, B. R. and Silva, J. S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology.* 1999. 96(3): 434-439
36. Christe, M., Rutti, B., and Brossard, M. Influence of the genetic background and parasite load of mice on the immune response developed against nymphs of *Ixodes ricinus*. *Parasitol Res.* 1999. 85(7): 557-561
37. Mbow, M. L., Christe, M., Rutti, B., and Brossard, M. Absence of acquired resistance to nymphal *Ixodes ricinus* ticks in BALB/c mice developing cutaneous reactions. *J Parasitol.* 1994. 80:81-87
38. Bowessidjaou, J., Brossard, M., and Aeschlimann, A. Effects and duration of resistance acquired by rabbits on feeding and egg laying in *Ixodes ricinus* L. *Experientia.* 1977. 33:548-550
39. Allen, J. R. Tick resistance: basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. *Int J Parasitol.* 1973. 3:195-200
40. Ganapamo, F., Rutti, B., and Brossard, M. Spleen accessory cell antigen processing and *in vitro* induction of specific lymphocyte proliferation in BALB/c mice infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Adv Exp Med Biol.* 1995. 378:195-197
41. Lee, K.-C., Wong, M., and Spitzer, D. Chloroquine as a probe for antigen processing by accessory cells. *Transplantation.* 1982. 34:150-153
42. Anjuere, F., Martin, P., Ferrero, I., Fraga, M. L., del Hoyo, G. M., Wright, N., and Ardavin, C. Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood.* 1999. 93(2): 590-598
43. Vremec, D. and Shortman, K. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and

- differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol.* 1997. 159(2): 565-573
44. Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol.* 2000. 164(6): 2978-2986
 45. Holoshitz, J., Romzek, N. C., Jia, Y., Wagner, L., Vila, L. M., Chen, S. J., Wilson, J. M., and Karp, D. R. MHC-independent presentation of mycobacteria to human gamma delta T cells. *Int Immunol.* 1993. 5(11): 1437-1443
 46. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000. 18:767-811
 47. Martin, P., del Hoyo, G. M., Anjuere, F., Ruiz, S. R., Arias, C. F., Marin, A. R., and Ardavin, C. Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors. *Blood.* 2000. 96(7): 2511-2519
 48. Banchereau, J. and Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 2001. 392:245-252
 49. Villiers, C. L., Villiers, M. B., and Marche, P. N. [Role of the complement C3 protein in the control of the specific immune response]. *Ann Biol Clin.* 1999. 57(2): 127-135
 50. den Haan, J. M. and Bevan, M. J. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells *in vivo*. *J Exp Med.* 2002. 196(6): 817-827
 51. Frucht, D. M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J. J., and Koyasu, S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 2001. 22(10): 556-560
 52. Schindler, H., Lutz, M. B., Rollinghoff, M., and Bogdan, C. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol.* 2001. 166(5): 3075-3082
 53. Fukao, T., Frucht, D. M., Yap, G., Gadina, M., O'Shea, J. J., and Koyasu, S. Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J Immunol.* 2001. 166(7): 4446-4455

54. Fukao, T., Matsuda, S., and Koyasu, S. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J Immunol.* 2000. 164(1): 64-71
55. Kuchroo, V. K., Das, M. P., Brown, J. A., Ranger, A. M., Zamvil, S. S., Sobel, R. A., Weiner, H. L., Nabavi, N., and Glimcher, L. H. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell.* 1995. 80(5): 707-718
56. Suss, G. and Shortman, K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1996. 183(4): 1789-1796
57. Kronin, V., Winkel, K., Suss, G., Kelso, A., Heath, W., Kirberg, J., von Boehmer, H., and Shortman, K. A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J Immunol.* 1996. 157(9): 3819-3827
58. Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., and Moser, M. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells *in vivo*. *J Exp Med.* 1999. 189(3): 587-592
59. Merad, M., Fong, L., Bogenberger, J., and Engleman, E. G. Differentiation of myeloid dendritic cells into CD8alpha-positive dendritic cells *in vivo*. *Blood.* 2000. 96(5): 1865-1872
60. Cayeux, S., Richter, G., Becker, C., Pezzutto, A., Dorken, B., and Blankenstein, T. Direct and indirect T cell priming by dendritic cell vaccines. *Eur J Immunol.* 1999. 29(1): 225-234
61. Smith, A. L. and de St Groth, B. F. Antigen-pulsed CD8alpha+ dendritic cells generate an immune response after subcutaneous injection without homing to the draining lymph node. *J Exp Med.* 1999. 189(3): 593-598
62. Joss, A, Akdis, M, Faith, A, Blaser, K, and Akdis, C A. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol.* 2000. 30:1683-1690
63. Wang , B., Zhuang , L., Fujisawa , H., Shinder , G. A., Feliciani , C., Shivji , G. M., Suzuki , H., Amerio , P., Toto , P., and Sauder , D. N. Enhanced Epidermal Langerhans Cell Migration in IL-10 Knockout Mice. *J Immunol.* 1999. 162:277-283

64. Maldonado-Lopez, R., Maliszewski, C., Urbain, J., and Moser, M. Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells *in vivo*. *J Immunol.* 2001. 167(8): 4345-4350
65. Ganapamo, F., Rutti, B., and Brossard, M. Immunosuppression and cytokine production in mice infested with *Ixodes ricinus* ticks: a possible role of laminin and interleukin- 10 on the *in vitro* responsiveness of lymphocytes to mitogens. *Immunology.* 1996. 87:259-263
66. Bowman, A. S., Sauer, J. R., Shipley, M. M., Gengler, C. L., Surdick, M. R., and Dillwith, J. W. Tick salivary prostaglandins: their precursors and biosynthesis. *Med Vet Entomol.* 1993. 169-177
67. Ribeiro, J. M. C., Evans, P. M., MacSwain, J. L., and Sauer, J. *Amblyomma americanum*: Characterization of salivary prostaglandins E2 and F2a by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography- mass spectrometry. *Exp Parasitol.* 1992. 74:112-116
68. Betz, M. and Fox, B. S. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol.* 1991. 146:108-113
69. Rutti, B. and Brossard, M. Repetitive detection by immunoblotting of a 25 kDa antigen in *Ixodes ricinus* and a 20 kDa antigen in *Rhipicephalus appendiculatus* with sera of pluriinfested mice and rabbits. *Parasitol Res.* 1989. 75:325-329
70. Brossard, M. and Girardin, P. Passive transfer of resistance in rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L: Humoral factors influence feeding and egg laying. *Experientia.* 1979. 351:395-1396
71. Brossard, M., Monneron, J. P., and Papatheodorou, V. Progressive sensitization of circulating basophils against *Ixodes ricinus* L. antigens during repeated infestations of rabbits. *Parasite Immunol.* 1982. 4:355-361
72. Schorderet, S. and Brossard, M. Changes in immunity to *Ixodes ricinus* by rabbits infested at different levels. *Med Vet Entomol.* 1993. 7
73. Martinod, S., Brossard, M., and Moreau, Y. Immunity of dogs against *Babesia canis*, its vector tick *Dermacentor reticulatus*, and *Ixodes ricinus* in endemic area. *J Parasitol.* 1985. 71(3): 269-273
74. Craig, L. E., Norris, D. E., Sanders, M. L., Glass, G. E., and Schwartz, B. S. Acquired resistance and antibody response of raccoons (*Procyon lotor*) to

- sequential feedings of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). Vet Parasitol. 1996. 63(3-4): 291-301
75. Sanders, M. L., Glass, G. E., Nadelman, R. B., Wormser, G. P., Scott, A. L., Raha, S., Ritchie, B. C., Jaworski, D. C., and Schwartz, B. S. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to *Ixodes scapularis* (Say) and are correlated with tick engorgement indices. Am J Epidemiol. 1999. 149(8): 777-784
76. Fernandez-Soto, P., Davila, I., Laffond, E., Lorente, F., Encinas-Grandes, A., and Perez-Sanchez, R. Tick-bite-induced anaphylaxis in Spain. Ann Trop Med Parasitol. 2001. 95(1): 97-103
77. Papatheodorou, V. and Brossard, M. C3 levels in sera of rabbits infested and reinfested with *Ixodes ricinus* L. and in midgut of fed ticks. Experimental & Applied Acarology. 1987. 353-59
78. Wikel, S. K. and Allen, J. R. Acquired resistance to ticks.III.Cobra venom factor and the resistance response. Immunology. 1977. 32:457-465
79. Wikel, S. K. Acquired resistance to ticks. Expression of resistance by CD4 deficient guinea pigs. Am J Trop Med Hyg. 1979. 28:586-590
80. Lawrie, C. H., Randolph, S. E., and Nuttall, P. A. Ixodes ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. Exp Parasitol. 1999. 93(4): 207-214
81. Reiner, S. L., Zheng, S., Corry, D. B., and Locksley, R. M. Constructing polycompetitor cDNAs for quantitative PCR. J Immunol Methods. 1994. 173(1): 133
82. Rottman, J. B., Tompkins, W. A., and Tompkins, M. B. A reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qcPCR) technique to measure cytokine gene expression in domestic mammals. Vet Pathol. 1996. 33(2): 242-248
83. Mejri, N., Rutti, B., and Brossard, M. Induction of Th2 cell differentiation in primary immune response *in vitro* and *in vivo*: splenic dendritic cells incubated with *Ixodes ricinus* tick saliva prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. 2003. Submitted
84. O'Garra, A. and Murphy, K. Role of cytokines in development of Th1 and Th2 cells. Chem Immunol. 1996. 631-13

85. Powrie, F., Menon, S., and Coffman, R. L. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity *in vivo*. *Eur J Immunol.* 1993. 23:3043-3049
86. Liu, L. M., Rich, B. E., Inobe, J., Chen, W. J., and Weiner, H. L. A potential pathway of Th2 development during primary immune response - IL-10 pretreated dendritic cells can prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *Adv Exp Med Biol.* 1997. 417:375-381
87. Liu, L. M., Rich, B. E., Inobe, J., Chen, W. J., and Weiner, H. L. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *Int Immunol.* 1998. 10(8): 1017-1026
88. Allen, J. R., Doube, B. M., and Kemp, D. H. Histology of bovine skin reactions to *Ixodes holocyclus*, Neuman. *Can J Comp Med.* 1977. 41:26-35
89. Revillard, J. P. Stress cellulaire, inflammation et cicatrisation. *Immunologie. De Boeck.* 1995. 2(14): 157-168
90. Allen, J. R., Khalil, H. M., and Graham, J. E. The location of tick salivary antigens, complement and immunoglobulin in the skin of guinea-pigs infested with *Demacantor andersoni* larvae. *Immunology.* 1979. 38:467-472
91. Weintraub, B. C., Jackson, M. R., and Hedrick, S. M. Gamma delta T cells can recognize nonclassical MHC in the absence of conventional antigenic peptides. *J Immunol.* 1994. 153(7): 3051-3058
92. Matsue, H., Cruz Jr, P. D., Bergstresser, P. R., and Takashima, A. Langerhans cells are the major source of mRNA for IL-1 beta and MIP-1 alpha among unstimulated mouse epidermal cells. *J Invest Dermatol.* 1992. 99:537-541
93. Takayama, K., Yokozeki, H., Ghoreishi, M., Satoh, T., Katayama, I., Umeda, T., and Nishioka, K. IL-4 inhibits the migration of human Langerhans cells through the downregulation of TNF receptor II expression. *J Invest Dermatol.* 1999. 113(4): 541-546
94. Matsue, H., Bergstresser, P. R., and Takashima, A. Reciprocal cytokine-mediated cellular interactions in mouse epidermis: promotion of gamma delta T-cell growth by IL-7 and TNF alpha and inhibition of keratinocyte growth by gamma IFN. *J Invest Dermatol.* 1993. 101(4): 543-548

95. Constant , S., Schweitzer , N., West , J., Ranney , P., and Bottomly , K. B Lymphocytes Can Be Competent Antigen-Presenting Cells for Priming CD4+ T Cells to Protein Antigens *In Vivo*. J Immunol. 1995. 155:3734-3741
96. Ozawa, H., Aiba, S., Nakagawa, S., and Tagami, H. Interferon-gamma and interleukin-10 inhibit antigen presentation by Langerhans cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7-1) expression. Eur J Immunol. 1996. 26:648-652
97. Chien, Y. H., Jores, R., and Crowley, M. P. Recognition by gamma/delta T cells. Annu Rev Immunol. 1996. 14:511-532
98. Schild, H., Mavaddat, N., Litzemberger, C., Ehrich, E. W., Davis, M. M., Bluestone, J. A., Matis, L., Draper, R. K., and Chien, Y. H. The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. Cell. 1994. 76(1): 29-37
99. Seixas, E., Fonseca, L., and Langhorne, J. The influence of gammadelta T cells on the CD4+ T cell and antibody response during a primary *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. Parasite Immunol. 2002. 24:131-140
100. Everson, M. P., Koopman, W. J., McGhee, J. R., and Beagley, K. W. Dendritic cells regulate development of alloantigenic and mitogenic TH1 versus TH2 responses. Adv Exp Med Biol. 1995. 378:347-349
101. Ohteki, T., Fukao, T., Suzue, K., Maki, C., Ito, M., Nakamura, M., and Koyasu, S. Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. J Exp Med. 1999. 189(12): 1981-1986
102. Nabors, G. S., Afonso, L. C. C., Farrell, J. P., and Scott, P. Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam. Proc Natl Acad Sci. 1995. 92:3142-3146
103. Padigel, U. M., Perrin, P. J., and Farrell, J. P. The development of a Th1-type response and resistance to *Leishmania major* infection in the absence of CD40-CD40L costimulation. J Immunol. 2001. 167(10): 5874-5879