

**Modulation de l'immunité de lapins contre les
tiques *Ixodes ricinus* L.: effets de la charge
parasitaire et de traitements par les cytokines
IL-2 et TNF- α**

par
Sandra Schorderet
Licenciée en Biologie

Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel pour
l'obtention du grade de docteur ès sciences.

1993

à Jean-Marc

à mes parents

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Modulation de l'immunité de lapins contre
les tiques *Ixodes ricinus* L.: effets de
la charge parasitaire et de traitements
par les cytokines IL-2 et TNF- α
de Mademoiselle Sandra Schorderet

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

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

MM. M. Brossard, B. Rutti, K. Pfister

(Berne) et S. Martinod (Lincoln, Nebraska)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 12 août 1993

Le doyen:



A. Robert

TABLE DES MATIÈRES

1. Introduction	1
1.1. Présentation du parasite	1
1.2. Les hôtes développent une résistance contre les tiques	1
1.3. La peau de l'hôte, organe-cible des tiques	2
1.4. La piqûre des tiques provoque une inflammation locale de la peau de l'hôte	4
1.5. La piqûre des tiques induit chez l'hôte une réponse immunologique spécifique	7
1.6. Les tiques peuvent prévenir les défenses de l'hôte	10
1.7. Caractérisations d'antigènes	12
1.8. Les cytokines, un nouvel outil pour comprendre et moduler la réponse immunologique d'un hôte face à un parasite	13
1.8.1. IL-2	13
1.8.2. Le TNF- α , médiateur des réactions inflammatoires	14
1.9. Buts du travail	18
2. Matériel et méthodes	19
2.1. Animaux	19
2.1.1. Tiques	19
2.1.2. Lapins	19
2.2. Antigènes	19
2.2.1. Extrait de glandes salivaires (EGS)	19
2.2.2. Extrait tégumentaire (ET)	20
2.2.3. Récolte de salive	20
2.3. Effets de la charge parasitaire sur l'acquisition de la résistance et la réponse immunitaire cellulaire et humorale du lapin	21
2.3.1. Expérience préliminaire	21
2.3.2. Infestations en continu	21
2.3.3. Modulation de la réponse cellulaire et humorale du lapin par deux degrés d'infestation différents, et conséquences sur le développement de la résistance	21
2.4. Effets d'un traitement à l'IL-2 recombinante humaine sur l'acquisition de la résistance chez des lapins infestés, et sur leur réponse cellulaire et humorale contre les tiques	22
2.4.1. Antigène	22
2.4.2. IL-2	22
2.4.3. Première expérience	22
2.4.4. Expérience complémentaire	23
2.5. Effets du TNF- α sur l'acquisition de la résistance et sur la réponse immunitaire des lapins infestés	23
2.5.1. Antigène	23
2.5.2. TNF- α	23
2.5.3. Vaccination contre le TNF- α	23
2.5.4. Traitement des lapins au TNF- α	24
2.6. Effets <i>in vitro</i> des antigènes de tiques sur les lymphocytes et les neutrophiles de lapins indemnes ou sensibilisés par les tiques	24
2.6.1. Effet sur les lymphocytes	24
2.6.2. Effet sur les neutrophiles	25

2.7. Effets du sérum de lapins sensibilisés aux tiques sur la prolifération de lymphocytes d'animaux indemnes ou sensibilisés	25
2.8. Statistique	26
3. Résultats et discussions	28
3.1. Effets de la charge parasitaire sur l'acquisition de la résistance et la réponse immunitaire cellulaire et humorale du lapin	28
3.1.1. Expérience préliminaire	28
3.1.1.1. Remarques générales	26
3.1.1.2. Biologie des tiques	26
3.1.1.3. Sérologie	28
3.1.2. Infestations en continu	28
3.1.2.1. Remarques générales	28
3.1.2.2. Biologie des tiques	29
3.1.2.3. Sérologie	29
3.1.3. Commentaire intermédiaire	31
3.1.4. Modulation de la réponse cellulaire et humorale du lapin par deux degrés d'infestation différents, et conséquences sur la développement de la résistance	31
3.1.4.1. Biologie des tiques	31
3.1.4.2. Réponse cellulaire des lapins: analyse par transformation lymphoblastique	32
3.1.4.3. Sérologie	33
3.1.5. Discussion	33
3.1.6. Conclusion	37
3.2. Effets d'un traitement à l'IL-2 recombinante humaine sur l'acquisition de la résistance chez des lapins infestés, et sur leur réponse cellulaire et humorale contre les tiques	37
3.2.1. Remarques générale	37
3.2.2. Première expérience	38
3.2.2.1. Effet du traitement à l'IL-2 sur la biologie des tiques	38
3.2.2.2. Sérologie	38
3.2.2.3. Transformation lymphoblastique	39
3.2.3. Considérations intermédiaires	40
3.2.4. Expérience complémentaire	40
3.2.4.1. Remarque préliminaire	40
3.2.4.2. Réponse cellulaire des lapins	40
3.2.4.3. Biologie des tiques	42
3.2.5. Discussion	43
3.2.6. Conclusion	46
3.3. Effets du TNF- α sur l'acquisition de la résistance et sur la réponse immunitaire des lapins infectés	47
3.3.1. Remarque préliminaire	47
3.3.2. Vaccination contre le TNF- α	47
3.3.2.1. Titres d'anticorps anti-TNF- α	47
3.3.2.2. Réponse humorale contre l'EGS	47
3.3.2.3. C3 sérique	48
3.3.2.4. Réponse cellulaire des lapins: analyse par transformation lymphoblastique	48
3.3.2.6. Biologie des tiques	49
3.3.3. Remarques	49

3.3.4. Traitement avec le TNF- α	60
3.3.4.1. Remarque préliminaire	60
3.3.4.2. Réponse humorale contre l'EGS	60
3.3.4.3. C3 sérique	60
3.3.4.4. Réponse cellulaire des lapins: transformation lymphoblastique	50
3.3.4.5. Réponse cellulaire des lapins: migration de neutrophiles	61
3.3.4.6. Biologie des tiques	61
3.3.4. Discussion	51
3.3.5. Conclusion	55
3.4. Effets <i>in vitro</i> des antigènes de tiques sur les lymphocytes et les neutrophiles de lapins indemnes ou sensibilisés par les tiques	56
3.4.1. Remarque préliminaire	56
3.4.2. Effet sur les lymphocytes	56
3.4.2.1. EGS	56
3.4.2.2. Salive	57
3.4.2.3. ET	57
3.4.3. Effet sur les neutrophiles	57
3.4.4. Discussion	59
3.5. Effets du sérum de lapins sensibilisés aux tiques sur la prolifération de lymphocytes d'animaux indemnes ou sensibilisés	61
3.5.1. Remarque	61
3.5.2. Effet sur des lymphocytes de lapins indemnes	61
3.5.3. Effet sur des lymphocytes de lapins sensibilisés	62
3.5.4. Discussion	62
4. Discussion générale et conclusions	64
5. Résumés	87
5.1. Résumé	67
5.2. Summary	69
Annexes	71
Annexe I: Infestation des lapins et récolte des tiques	71
Annexe II: Prélèvement et isolation du plasma et des cellules	72
Annexe III: Tests cellulaires	74
Annexe IV: Tests sérologiques	78
Remerciements	83
Bibliographie	84

1. INTRODUCTION

1.1. Présentation du parasite

Les tiques, principalement les Ixodides, sont des ectoparasites importants de l'homme et des animaux. Certaines espèces sont directement responsables de pertes économiques substantielles dans le domaine de la production de viande, de cuir ou de laine (Steelman, 1976): soit en raison d'infestations massives, comme dans le cas de *Boophilus microplus* en Australie (Springell, 1983), soit à cause de substances toxiques, généralement paralysantes, contenues dans leur salive (Gothe *et al.*, 1979), à l'exemple d'*Ixodes rubicundus* en Afrique du Sud (Stamps, 1959; Spickett et Heyne, 1988). Cependant, la majorité des tiques d'importance économique ou médicale le sont pour leur rôle dans la transmission de maladies. Les Ixodides sont classés au premier rang des vecteurs d'agents pathogènes pour le bétail, et se trouvent en seconde position derrière les moustiques, en ce qui concerne la transmission de parasites à l'homme (Balashov, 1972; Bram, 1975).

Ixodes ricinus est la tique la plus répandue en Suisse et en Europe septentrionale. Elle colonise les milieux abrités à hygrométrie élevée (forêts, bosquets, haies) jusqu'à une altitude de 1200m (Aeschlimann, 1972). Elle parasite aussi bien les Reptiles et les Oiseaux que de nombreux Mammifères, dont l'Homme. Cette tique sert de vecteur à de nombreux pathogènes affectant les animaux domestiques: *Coxiella burnetii*, *Babesia divergens*, ou encore *Ehrlichia phagocytophila*, agents respectifs de la fièvre Q (Brossard et Aeschlimann, 1976), des piropalamoses bovines en Suisse (Aeschlimann *et al.*, 1975), et de la fièvre de pâture (Liz et Pfister, 1989; Liz *et al.*, 1991). Elle transmet également des microorganismes responsables de maladies humaines comme le virus de l'encéphalite à tiques (FSME; Aeschlimann *et al.*, 1979), ou *Borrelia burgdorferi*, agent de la borréliose de Lyme (Burgdorfer *et al.*, 1983).

1.2. Les hôtes développent une résistance contre les tiques

Le contact répété entre une tique et un animal aboutit très souvent à l'apparition d'une résistance de l'hôte dirigée contre la tique. Le premier rapport d'un tel phénomène date de 1918, par Johnston et Bancroft, et concerne les bovins. La résistance peut être le résultat d'une action mécanique de l'hôte sur les tiques: si

l'on prévient le grattage chez des bovins infestés par *B. microplus*, le nombre de tiques gorgées sur ces animaux augmente considérablement (Bennett, 1969). Le grattage, moyen de défense utilisé également contre d'autres ectoparasites (Murray, 1987), n'est cependant pas le composant principal de la résistance. Trager (1939), dans une étude sur des cobayes infestés par *Dermacentor variabilis*, met en évidence son caractère avant tout immunologique. La réponse immune (mode et intensité) peut varier considérablement suivant l'hôte et l'espèce de tiques étudiés (Ribeiro, 1989). Des phénomènes de résistance ont surtout été décrits chez des animaux domestiques (chiens, bovins, ovins), ou de laboratoire (cobayes et lapins principalement). Les effets sur les tiques sont divers. Ils peuvent se limiter à un simple rejet de l'ectoparasite, à l'exemple des larves de *B. microplus* infestant des bovins de la race *Bos taurus* (Roberts, 1968). Cependant, dans la plupart des cas, ils provoquent de graves perturbations du cycle de vie des tiques: prolongation du temps de gorgement, diminution du poids d'engorgement, perturbations de la mue et de la ponte, diminution de la viabilité des oeufs, mort de la tique sur l'hôte. Le sujet a fait l'objet de multiples publications et de nombreuses revues (Willadsen, 1980; Wikel, 1982a, 1984; Wikel et Allen, 1982; Wikel et Whelen, 1986; Brown, 1985, 1988c; Allen, 1986, 1989; Brossard *et al.*, 1991).

1.3. La peau de l'hôte, organe-cible des tiques

Les tiques, en tant qu'ectoparasites, ne sont en contact direct avec leur hôte que sporadiquement au moment du repas sanguin, et par l'unique intermédiaire de leurs pièces buccales. Les relations tiques/hôte (besoins nutritionnels du parasite/défense de l'hôte) se déroulent au niveau de la peau.

La peau des Mammifères est un organe complexe composé de trois couches de tissus superposées (Wheater et Burkitt, 1988):

a) L'épiderme

C'est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé, dont la cellule de base est le kératinocyte. Il constitue la première barrière du corps face à l'environnement. Il est formé de plusieurs sous-couche définies d'après le degré de kératinisation des cellules. Le kératinocyte n'est pas une cellule inerte du point de vue immunologique (Kupper, 1990). Il synthétise de nombreuses cytokines (interleukine(IL)-1, IL-6 et plusieurs "colony stimulating factors" (CSF)). Par sa production d'IL-1, d'IL-6 et de GM-CSF (granulocyte macrophage-CSF), il semble seconder les cellules de Langerhans dans leur fonction de présentation d'antigènes au niveau local en optimisant leur environnement. Dans des conditions pathologiques, il peut lui-même exprimer des antigènes d'histocompatibilité de classe II et pourrait fonctionner comme cellule présentatrice d'antigènes (CPA).

Les cellules de Langerhans, situées dans le *stratum spinosum* (couche moyenne), sont dérivées des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse, et participent à l'initiation de la réponse immunitaire. Ce sont avant tout des CPA. Elles expriment à leur surface des protéines du complexe d'histocompatibilité de classe II, et peuvent sécréter de l'IL-1. Elles ont la capacité de quitter l'épiderme, et, via la circulation lymphatique, d'aller présenter l'antigène qu'elles auront métabolisé aux lymphocytes T helper (CD4⁺) situés dans les ganglions lymphatiques (Unanue, 1992). Dans le *stratum basale* (couche profonde) se situent les mélanocytes, participant à la protection du corps contre le rayonnement ultraviolet.

b) Le derme

C'est un tissu conjonctif fibroélastique dense non orienté, principalement composé de fibres (collagène et élastine) noyées dans une substance fondamentale (glycosaminoglycanes), le tout formant la matrice extracellulaire. Il contient peu de cellules résidentes.

Les fibroblastes sont responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire. Ils peuvent intervenir dans des processus immunitaires, notamment lors de réactions inflammatoires, par la sécrétion de cytokines (IL-6, transforming growth factor (TGF)- β) ou de prostaglandines (PG). Ces substances peuvent agir en retour sur les fibroblastes soit par l'inhibition (PG) soit par l'activation (TGF- β , IL-1) de la synthèse de collagène.

Le derme est un tissu richement vascularisé. Les cellules endothéliales des capillaires constituent une barrière entre le milieu extra- et intravasculaire. Elles peuvent sécréter des cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, etc.) et jouent un rôle actif dans les processus d'extravasation des cellules immunitaires circulantes.

Les mastocytes, présents également dans d'autres tissus conjonctifs, s'accumulent aux alentours des capillaires dermiques, dans des zones proches de l'épiderme (Siraganian, 1992). Ils produisent et répondent à différentes cytokines. Par les médiateurs contenus dans leurs granules (histamine, etc.), ils exercent un contrôle sur la perméabilité capillaire.

Le derme comprend encore des cellules dendritiques et des macrophages tissulaires (histiocytes), éléments de défense de l'organisme. D'autres cellules faisant partie du système immunitaire sont présentes dans ce tissu, mais restent rares en conditions normales: les neutrophiles et les lymphocytes T et B. Ces cellules infiltrent massivement le derme en cas d'agression externe.

Enfin, c'est dans le derme que se trouvent les nombreux récepteurs sensoriels que possède la peau.

c) L'hypoderme

C'est un tissu conjonctif fibroélastique lâche, en continuité avec le derme. En plus des cellules mentionnées ci-dessus, il comprend un grand nombre d'adipocytes servant au stockage d'énergie (graisses), au maintien de l'homéothermie (isolant), et à la protection contre les chocs.

Les annexes épidermiques (glandes sudoripares et sébacées, poils, ongles) sont insérées dans le derme et l'hypoderme.

1.4. La piqûre des tiques provoque une inflammation locale de la peau de l'hôte

Les piqûres de tiques provoquent une infiltration de cellules inflammatoires et immunitaires dans les tissus cutanés entourant le rostre des ectoparasites. L'étude séquentielle des événements cellulaires se déroulant aux sites de fixation des tiques pendant leur repas sur des hôtes indemnes ou sensibilisés donne de précieux renseignements sur les modalités de la réponse anti-tiques.

Le rostre des femelles d'*I. ricinus* (hypostome et chélicères) pénètre profondément dans le derme des hôtes, allant jusqu'à percer le cartilage sous-jacent d'une oreille de lapin (Brossard et Fivaz, 1982). Dès le premier jour d'une primo- ou d'une réinfestation, des mastocytes proches du site de fixation dégranulent. Ils sont plus nombreux à dégranuler en réinfestation, alors que leur nombre total dans la lésion ne varie pas (Brossard et Fivaz, 1982). Abdul-Amir et Gray (1987) et Mbow *et al.* (1993a) obtiennent des résultats similaires chez des moutons et des souris infestés par *I. ricinus* (adultes et nymphes respectivement), de même que Gill et Walker (1985) et Gill (1986), pour des lapins et des bovins infestés par des adultes de *Hyalomma anatolicum anatolicum*. La participation des mastocytes à la résistance anti-tiques semble dépendre du modèle étudié. Des souris BALB/c infestées à plusieurs reprises par des larves de *D. variabilis* deviennent résistantes dès la troisième infestation (DenHollander et Allen, 1985a). Des biopsies prélevées aux sites de fixation révèlent la présence massive de mastocytes et d'éosinophiles, dont un grand nombre sont dégranulés. Par contre, ces mêmes souris ne développent pas de protection contre des nymphes de *I. ricinus* (Mbow *et al.*, 1993a). Des souris déficientes en mastocytes (WBB6F₁/J-W/W^o), infestées par des larves de *Haemaphysalis longicornis*, ne deviennent pas résistantes (Matsuda *et al.*, 1985; 1990). Par contre, ces mêmes souris le sont contre des larves de *D. variabilis* (DenHollander et Allen, 1985b; Steeves et Allen, 1991). L'immunité acquise dans ce cas semble associée à la présence et à l'activité de basophiles (Steeves et Allen, 1990). Même si l'intervention des mastocytes dans les phénomènes de résistance n'est pas vraiment prouvée, ces cellules participent certainement aux réactions inflammatoires générées par la piqûre des tiques. En primo-infestation, ces cellules peuvent dégranuler sous l'effet d'une agression physique due au rostre, ou biochimique due à des estérases salivaires (Gegzy *et al.*, 1971; Gill *et al.*, 1986; Willadsen *et al.*, 1987), ou à des anaphylatoxines comme le C5a, libérées sous l'action de la salive des tiques (Berenberg *et al.*, 1972). En réinfestation, la dégranulation des mastocytes dépendrait plutôt de la présence d'anticorps IgE spécifiques d'antigènes ectoparasitaires. Il existe plusieurs sous-populations de mastocytes, différenciables d'après leur apparence microscopique, leur localisation dans l'organisme et les médiateurs qu'ils produisent (Siraganian, 1992). La majorité des cellules se trouvant dans le derme sont des mastocytes des tissus conjonctifs (par opposition aux mastocytes muqueux). Ils libèrent des médiateurs tels que l'histamine, qui augmente la perméabilité vasculaire et qui est chimiotactique pour les éosinophiles; l'héparine, à l'action

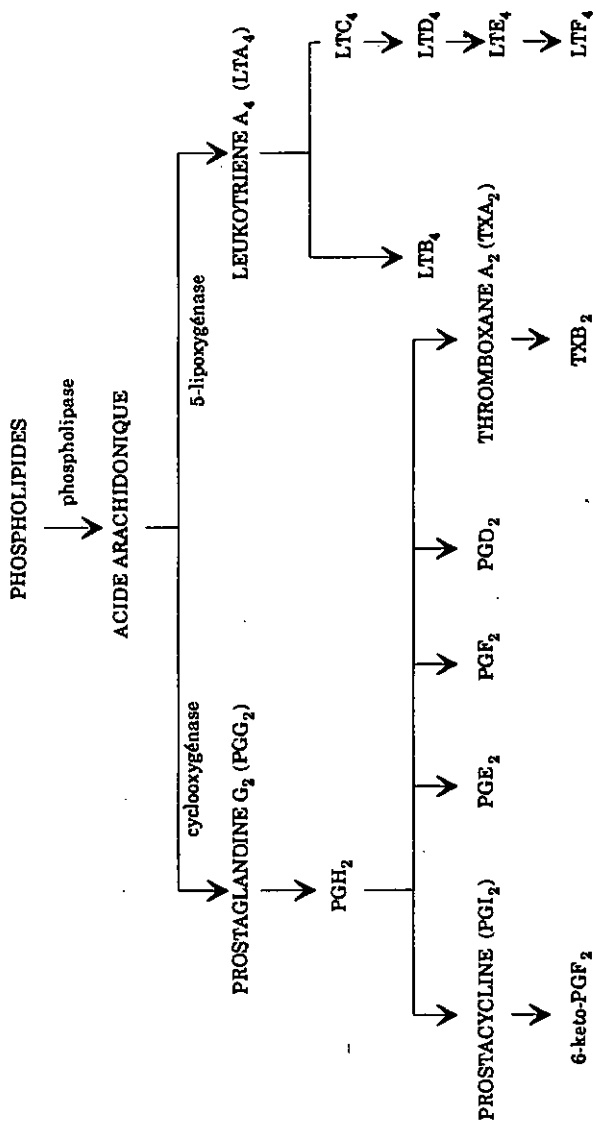


Figure 1: Dérivés de l'acide arachidonique
 (D'après Davies *et al.*, 1984; Pettipher et Whittle, 1992)

anticoagulante; un "eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis" (ECF-A); ainsi que diverses protéases et des produits du métabolisme de l'acide arachidonique (figure 1), dont la PGD_2 , un puissant vasodilatateur et bronchoconstricteur (VanArsdel, 1992; Siraganian, 1992). Les mastocytes produisent également des cytokines, dont le tumor necrosis factor (TNF)- α (Gordon *et al.*, 1990). Contrairement aux autres cellules sécrétrices de TNF- α , les mastocytes sont les seuls à stocker la cytokine préformée dans des granules. Activés, ils sont capables de la libérer très rapidement dans le milieu (Gordon et Galli, 1990). Le TNF- α des mastocytes semble être responsable d'une augmentation de la migration des neutrophiles vers les aites inflammatoires (Zhang *et al.*, 1992), par un effet chimiotactique direct (Rampart *et al.*, 1989), ou en augmentant l'expression des molécules d'adhésion membranaire spécifiques (Vassalli, 1992) et la synthèse d'IL-8 par les cellules endothéliales (Rot, 1992).

Dès le début de l'infestation chez les espèces d'hôtes habituellement étudiées, de nombreux leucocytes infiltrent le derme entourant les pièces buccales de la tique. Chez les lapins infestés par *I. ricinus*, les sites de fixation sont envahis par des neutrophiles dès le premier jour d'une primo- ou d'une réinfestation (Brossard et Fivaz, 1982). Au troisième jour du repas sanguin, une cavité est observée sous les pièces buccales des tiques. Cette lésion, trop importante pour être due uniquement à une activité cytolytique de la salive, serait le résultat de la réaction inflammatoire développée par l'hôte. En libérant leurs enzymes hydrolytiques, les neutrophiles sont responsables de la formation de telles cavités chez des chiens infestés par *Rhipicephalus sanguineus* (Tatchell et Moorhouse, 1970). Les neutrophiles sont le composant majeur de l'infiltrat cellulaire, en primo- et en réinfestation, ce qui est également vrai dans de nombreux autres modèles: lapins infestés par *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus* (Walker et Fletcher, 1986; Latif *et al.*, 1990) ou *H.a. anatolicum* (Gill et Walker, 1985); moutons parasités par *I. ricinus* (Abdul-Amir et Gray, 1987); bovins par *B. microplus* (Tatchell et Moorhouse, 1968) ou par *H.a. anatolicum* (Gill, 1986); souris infestées par *Ornithodoros talaje* (Need *et al.*, 1992).

L'arrivée massive, précoce et non-spécifique des neutrophiles suppose la libération, aux sites de fixation des tiques, de facteurs chimiotactiques pour ces cellules: C5a généré par la salive des tiques (Berenberg *et al.*, 1972, Gordon et Allen, 1991a), TNF- α produit par les mastocytes, les macrophages ou les kératinocytes (Vassalli, 1992), ou IL-8 libérée par les cellules endothéliales, les fibroblastes ou les kératinocytes (Zachariae et Mataushima, 1992). Les neutrophiles en place produisent également des médiateurs facilitant leur infiltration (Lloyd et Oppenheim, 1992): TNF- α , leukotriène (LT) B_4 (chimiotactique puissant pour les neutrophiles). En réinfestation, l'activation du système complément et la libération de C5a pourrait provenir de la formation, au niveau de la lésion, de complexes antigènes-anticorps. Une étude par immunofluorescence indirecte met en évidence la présence d'antigènes salivaires, d'anticorps spécifiques et de complément autour des sites de fixation de larves de *Dermacentor andersoni* sur des cobayes (Allen *et al.*, 1979a).

C'est en réinfestation que les basophiles envahissent généralement les sites de fixation des tiques. Chez les cobayes, la résistance à diverses espèces comme *D.andersoni* (Allen, 1973) ou *Ixodes holocyclus* (Brown et al., 1984a) est étroitement liée à l'infiltration massive des basophiles. L'immunité contre *Amblyomma americanum* est d'ailleurs fortement diminuée si l'on traite les cobayes avec un sérum anti-basophiles (Brown et al., 1982). Des bovins infestés par *A.americanum* (Brown et al., 1984b) ou *I.holocyclus* (Allen et al., 1977) présentent le même type de réponse. Ces animaux développent de fortes réactions d'hypersensibilité retardée à basophiles (Jones-Mots) en réponse à l'injection d'antigènes de tiques. Comme dans le cas d'une hypersensibilité retardée de type tuberculinique, ces réactions sont initiées par des lymphocytes T qui reconnaissent spécifiquement les antigènes injectés (Benjamini et Leskowitz, 1991). Des IgG (Brown et Askenase, 1983), ou d'autres composants sériques (IgE, complément) semblent également participer au phénomène. Dans d'autres modèles, bovins infestés par *H.a.anatolicum* (Gill, 1986), moutons par *I.ricinus* (Abdul-Amir et Gray, 1987), ou lapins par *H.a.anatolicum* (Gill et al., 1985) ou *I.ricinus* (Brossard et Fivaz, 1982), le nombre de basophiles infiltrants s'accroît considérablement en réinfestation. Ils ne constituent toutefois au maximum que le dixième des cellules présentes, la majorité étant composée de neutrophiles et de cellules mononucléaires. Néanmoins, les basophiles semblent également participer aux phénomènes de résistance dans ces modèles: au cours de réinfestations avec *I.ricinus*, le nombre de basophiles dégranulés autour des sites de fixation dans la peau des lapins augmente progressivement (Brossard et Fivaz, 1982). De plus, le nombre de basophiles circulants sensibilisés et dégranulant au contact d'un extrait de glandes salivaires de femelles partiellement gorgées s'accroît à chaque nouvelle infestation (Brossard et al., 1982).

Les basophiles, comme les mastocytes, libèrent de l'histamine qui perturbe la biologie des tiques. Chez des bovins infestés par *B.microplus*, les larves se détachent prématurément de leur hôte quand cette amine est injectée juste sous leur rostre (Kemp et Bourne, 1980). Les auteurs obtiennent le même résultat avec des tiques nourries artificiellement sur membrane. Par contre, d'autres substances augmentant la perméabilité vasculaire telles que bradykinine, PGE₂ ou dopamine, n'ont que peu d'effets. Willadsen et al. (1979) soulignent l'importance de l'histamine dans les mécanismes de défense contre les tiques. Ils associent sa concentration dans la peau de bovins et l'intensité des réactions d'hypersensibilité immédiate, avec le degré de résistance contre *B.microplus*. L'inoculation à des cobayes d'antagonistes des récepteurs histaminiques H₁ et H₂ inhibe l'expression de la résistance contre des larves de *D.andersoni* (Wikel, 1982b).

Les lapins infestés par *I.ricinus* développent entre autres des réactions d'hypersensibilité immédiate (Girardin et Brossard, 1985). Un traitement de ces animaux en réinfestation avec de la mépyramine, un antihistaminique bloquant les récepteurs H₁ (Pearce, 1992), abaisse leur résistance (Brossard, 1982). La diminution de la perméabilité vasculaire causée par la drogue freinerait l'exsudation de facteurs humoraux (anticorps spécifiques ou complément) et l'infiltration des cellules inflammatoires et immunitaires dans les sites de fixation.

L'histamine exerce une action directe sur la physiologie des ectoparasites. Les processus de nutrition et de salivation, mesurés par électrophysiologie chez *D.andersoni*, sont gravement perturbés par ce médiateur (Paine et al., 1983). L'histamine peut aussi agir indirectement contre les tiques par les démangeaisons qu'elle provoque dans la peau de l'hôte, entraînant le grattage (Koudstaal et al., 1978).

Attirés par l'histamine, l'ECF-A produit par les mastocytes, le C5a ou des complexes antigènes-anticorps, les éosinophiles sont aussi présents dans les sites de fixation des tiques. Leur nombre croît en réinfestation, laissant supposer un rôle actif de ces cellules dans l'immunité anti-tiques (Brossard et Fivaz, 1982; Brown et al., 1984b; Gill et Walker, 1985; Walker et Fletcher, 1986; Abdul-Amir et Gray, 1987). Chez des bovins infestés par *B.microplus* (Schleger et al., 1976) ou des lapins par *R.appendiculatus* (Fivaz, 1990), les réactions d'hypersensibilité retardée sont caractérisées par une éosinophilie cutanée plutôt que par une basophilie. Brown et al. (1982), après traitement de cobayes avec des sérums spécifiques anti-basophiles et anti-éosinophiles, présentent l'immunité acquise contre *A.americanum* comme le résultat d'une coopération entre ces deux types de leucocytes. Les éosinophiles produisent différentes substances pouvant perturber le repas sanguin des tiques, comme la protéine basique majeure, toxique pour un grand nombre de microorganismes dont les Schistosomes (Roitt et al., 1985), différentes enzymes lytiques, et des métabolites toxiques de l'oxygène. Ils sécrètent aussi des dérivés lipidiques pharmacologiquement actifs comme les LTC₄ et LTD₄, les PGE₁ et PGE₂ (contrôle de la perméabilité vasculaire), et le platelet activating factor (PAF, chimiotactique et activateur pour de nombreuses cellules inflammatoires) (Silberstein, 1992). Leur rôle reste cependant mal défini, car ils produisent aussi une histaminase, ce qui pourrait diminuer l'intensité des réactions d'hypersensibilité immédiate développées par les hôtes (Brossard et Fivaz, 1982; Roitt et al., 1985).

1.5. La piqûre des tiques induit chez l'hôte une réponse immunologique spécifique

La présence de nombreux lymphocytes et macrophages dans le derme entourant le rostre des tiques, ainsi que plusieurs phénomènes immunologiques décrits jusqu'à présent, font supposer l'établissement d'une réponse spécifique de l'hôte contre les tiques, complétant les défenses non-spécifiques.

L'immunité à médiation humorale est une des composantes de cette réponse spécifique. Trager (1939), le premier chercheur à démontrer la nature immunologique de la résistance anti-tiques, transféra à des cobayes indemnes une protection partielle contre *D.variabilis* en leur injectant du sérum d'animaux résistants. L'importance des anticorps dans l'acquisition de la résistance est confirmée par Wikel et Allen (1976b) par un traitement de cobayes avec du cyclophosphamide, un immunosuppresseur cytostatique. Lorsque la substance est administrée aux hôtes avant une réinfestation avec *D.andersoni*, l'expression de la résistance est partiellement inhibée. La

concentration de cyclophosphamide utilisée dans cette expérience épuise presque complètement les zones à cellules B des ganglions lymphatiques (follicules lymphoïdes et centres germinatifs à la jonction cortico-médullaire) alors que les zones à cellules T (zone paracorticale) sont nettement moins affectées.

Grâce à deux injections d'immunsérum, des lapins indemnes acquièrent une résistance partielle contre *I. ricinus* (Brossard, 1977). Le poids d'engorgement des tiques nourries sur les lapins traités est diminué d'environ 25%. En plus de la nutrition, la ponte est également perturbée (Brossard et Girardin, 1979): seul 55% des tiques pondent, contre 94% pour celles nourries sur les animaux témoins. Le transfert d'immunsérum à des animaux indemnes a été répété dans d'autres modèles, bovins infestés par *B. microplus* (Roberts et Kerr, 1976), cobayes par *A. americanum* (Brown et Askenase, 1981) ou *R. sanguineus* (Brown *et al.*, 1983), avec comme résultat une protection partielle des animaux traités. Il existe cependant des exceptions, cobayes infestés par *D. andersoni*, lapins par *R. appendiculatus*, où l'injection d'immunsérum n'induit pas un développement de résistance chez les animaux receveurs (Wikel et Allen, 1976a; Fivaz, 1990).

Plusieurs études montrent que les anticorps avalés avec le sang de l'hôte conservent leurs propriétés immunologiques dans l'intestin, puis dans l'hémocoèle des tiques. Chez des femelles adultes de l'espèce *D. andersoni* nourries pendant cinq jours sur des lapins ou des rats, ou artificiellement avec du sérum humain ou de lapin, les anticorps ingérés traversent la paroi intestinale de la tique et paraissent intacts dans l'hémolymphe (Ackerman *et al.*, 1981). Des hémolysines retrouvées dans l'hémolymphe de femelles d'*I. ricinus* après engorgement sur des lapins immunisés contre des globules rouges de mouton, conservent leur activité lytique (Brossard et Rais, 1984). Dans cette expérience, la concentration d'IgG dans l'hémolymphe des tiques dépend du titre d'anticorps du sang de l'hôte. Elle est plus élevée lors des réinfestations, alors que les lapins ont développé une résistance. D'autre part, 30 à 44% des IgG présentes dans le sérum de lapins immunisés avec de l'ovalbumine sont retrouvées intactes dans l'hémolymphe de *Hyalomma excavatum* et *R. sanguineus* après vingt-quatre heures de repas sanguin (Ben-Yakir, 1989). Les anticorps pourraient ainsi interférer directement avec le métabolisme de la tique, en se fixant aux organes internes de l'hémocoèle.

Dans les sites de fixation des tiques, les anticorps peuvent se complexer aux antigènes contre lesquels ils ont été produits et activer le système complément par la voie classique. Des cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophages, basophiles, éosinophiles) seraient ainsi attirées localement (Gallin, 1989). La voie alterne d'activation participe également à l'immunité anti-tiques. Des cobayes traités avec du facteur de venin de Cobra, un inhibiteur de cette voie, présentent une moins bonne résistance contre des larves de *D. andersoni* (Wikel et Allen, 1977), alors que des animaux déficients en C4 développent une réponse normale (Wikel, 1979). La concentration de C3 mesurée dans le sérum de lapins infestés par *I. ricinus* augmente pendant le repas sanguin (Papatheodorou et Brossard, 1987). Elle est aussi plus élevée lors de réinfestations, ce qui influence le contenu en C3 de l'intestin des tiques nourries sur ces animaux. D'après ces auteurs, le complément, activé par des

complexes antigènes-anticorps, pourrait perturber la physiologie de la digestion de l'hémoglobine en endommageant l'épithélium intestinal des ectoparasites.

L'immunité à médiation cellulaire est l'autre composante spécifique de la résistance. Par transfert de cellules de ganglions lymphatiques de cobayes résistants à des larves de *D.andersoni*, Wikel et Allen (1976a) obtiennent la protection partielle des animaux receveurs. Les résultats sont similaires avec des cellules d'exsudats péritonéaux de cobayes infestés par *R.sanguineus* (Brown et Askenase, 1981), *A.americanum* (Brown, 1982), *I.holocyclus* ou *R.appendiculatus* (Askenase et al., 1982). L'hypothèse d'une contribution de l'immunité à médiation cellulaire aux phénomènes de résistance est renforcée par la présence, dans de nombreux modèles, de fortes réactions d'hypersensibilité retardée de type tuberculinique (HRT). De telles réactions sont constatées chez des cobayes sensibilisés par *D.andersoni*, après une injection intradermique d'un extrait de glandes salivaires (Wikel et al., 1978). Les lymphocytes des animaux infestés répondent aussi à cet antigène dans un test de transformation lymphoblastique. Des observations similaires *in vivo* (test cutané) et *in vitro* (transformation lymphoblastique) sont rapportées avec des bovins infestés par *D.andersoni* (Wikel et Osburn, 1982) ou *B.microplis* (Opdebeeck et Daly, 1990). Les réactions d'HRT, mesurées chez des lapins infestés par *I.ricinus* après une injection intradermique de 50 µg d'extrait de glandes salivaires, sont beaucoup plus fortes lors de réinfestations (Girardin et Brossard, 1985). Un traitement des hôtes avec de la cyclosporine A, un immunosuppresseur agissant spécifiquement sur les lymphocytes T (Thomson et al., 1986), provoque une diminution des réactions d'HRT (Girardin et Brossard, 1989), et une atténuation des effets de la résistance sur la biologie des tiques (Girardin et Brossard, 1990). Des lapins traités avec un sérum spécifique anti-thymocytes ne développent pas d'immunité contre *Rhipicephalus evertsi evertsi* (Njau, 1989). La réponse en anticorps et les réactions d'HRT, mesurées chez ces animaux, sont beaucoup plus basses que chez les témoins.

Le rôle des cellules T dans l'immunité anti-tiques est encore mal connu. Il commence à être étudié au niveau local grâce à des anticorps spécifiques permettant de reconnaître des sous-populations de cellules, et les cytokines qu'elles produisent. Parmi les cellules infiltrant les sites de fixation de nymphes de l'espèce *I.ricinus* sur des souris BALB/c, une quantité croissante de cellules T CD4⁺ est observée, alors que le nombre de T CD8⁺ reste constant (Mbow et al., 1993b). L'expression des antigènes d'histocompatibilité de classe II sur les cellules mononucléaires infiltrantes augmente en réinfestation.

Les cellules de Langerhans pourraient capter les antigènes salivaires injectés dans l'épiderme des cobayes infestés par des larves de *D.andersoni* (Allen et al., 1979b). Dans ce modèle, ces cellules seraient responsables de la présentation des antigènes aux lymphocytes spécifiques (Nithiuthai et Allen, 1985). Elles seraient indispensables à l'acquisition et à l'expression d'une immunité anti-tiques (Nithiuthai et Allen, 1984).

Voie intrinsèque

Voie extrinsèque

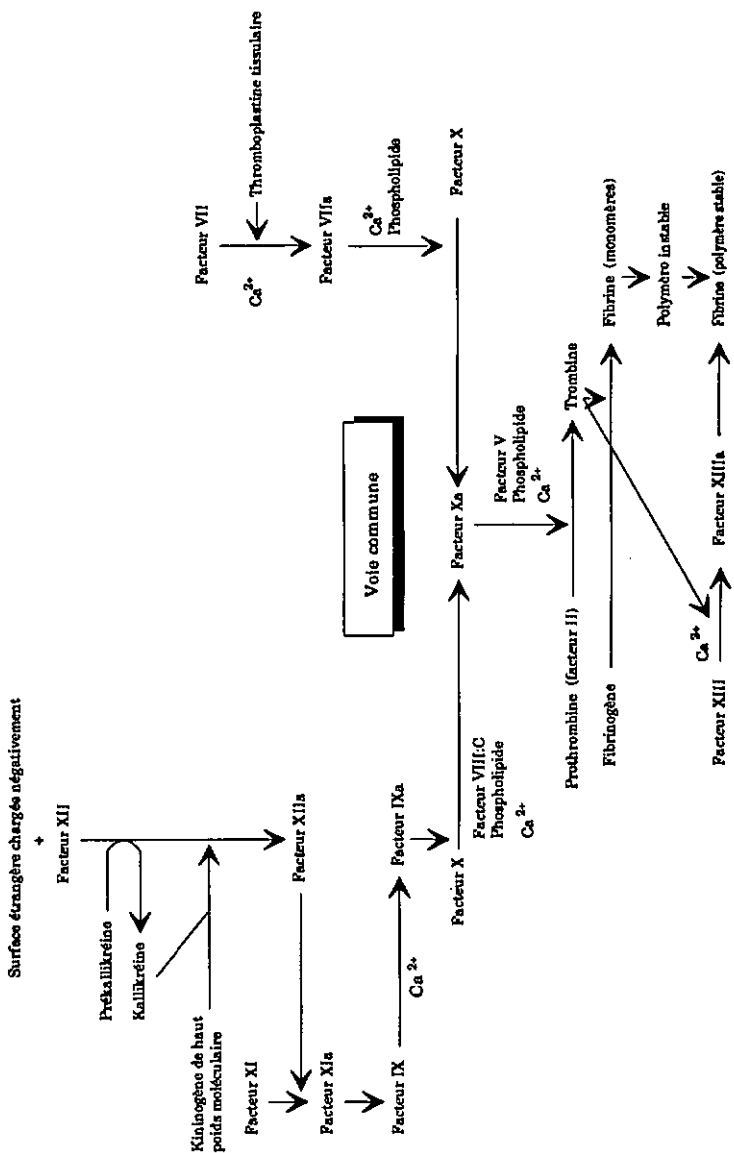


Figure 2: Le processus de coagulation du sang (D'après Machin, 1992)

1.6. Les tiques peuvent prévenir les défenses de l'hôte

Les Ixodides ont besoin de sang à chaque étape de leur cycle de vie. A la difficulté de trouver un hôte adéquat s'ajoutent plusieurs problèmes liés à la durée de leur repas sanguin (Ribeiro, 1987a): soit la recherche d'un endroit favorable sur l'hôte pour se fixer à l'abri du grattage; puis les phénomènes de coagulation rendant tout prélèvement de sang impossible; l'inflammation de la peau due à l'agression mécanique du rostre et chimique de la salive. Enfin, les tiques doivent faire face à la réponse immunologique de leur hôte.

La salive des tiques est un composé protéique complexe les aidant à résoudre bon nombre de ces problèmes, mais elle constitue également la source principale d'immunogènes. Pour toutes ces raisons, la salive a fait l'objet de nombreuses recherches (Binnington et Kemp, 1980). Des études biochimiques y ont mis en évidence un arsenal d'enzymes: estérases (Gegzy *et al.*, 1971; Willadsen *et al.*, 1987), hydrolases, lipases, aminopeptidases chez *B.microplus* (Schleger et Lincoln, 1976); estérases chez *D.andersoni* (Gordon et Allen, 1987); phosphatases acides, aminopeptidases et estérases non spécifiques chez *H.a.anatolicum* (Gill *et al.*, 1986; Gill et Walker, 1988).

La salive de *B.microplus* contient un inhibiteur d'enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine et plasmine) inactivant le complément et le système de coagulation du sang (Willadsen et Riding, 1979, 1980). Les propriétés anticoagulantes de la salive ont été démontrées chez d'autres espèces. Ainsi, un extrait de glandes salivaires de *D.andersoni* inhibe les systèmes intrinsèque et extrinsèque de la coagulation (figure 2) dans du sang de lapin (Gordon et Allen, 1991b). L'activité est maximale lorsque les glandes proviennent de tiques pesant au moins 250mg, et serait dirigée principalement contre les facteurs V et VII. Elle n'affecterait pas les facteurs II ou X. Limo *et al.* (1991) isolent de la salive de *R.appendiculatus* une protéine de 65 kDa inhibant l'étape de coagulation contrôlée par le facteur Xa. Les sécrétions salivaires de *I.ricinus* contiennent un inhibiteur de la thrombine, caractérisé et appelé ixine par Hoffmann *et al.* (1991). D'autres espèces encore, citées dans la revue de Binnington et Kemp (1980), montrent des aptitudes semblables.

La salive des tiques contient des vasodilatateurs permettant d'augmenter le flux sanguin dans la zone de nutrition. La PGE₂ a été décrite chez *B.microplus* (Dickinson *et al.*, 1976; Higgs *et al.*, 1976), *I.dammini* (Ribeiro *et al.*, 1985) et *A.americanum* (Ribeiro *et al.*, 1992). *I.dammini* produit un autre vasodilatateur, la prostacycline (PGI₂) (Ribeiro *et al.*, 1988), qui est aussi un inhibiteur de la coagulation sanguine (Machin, 1992). Chez *R.sanguineus*, les extraits de glandes salivaires montrent plutôt des propriétés tendant à limiter la perméabilité vasculaire, puisqu'ils possèdent une activité antihistaminique (Chinery et Ayitey-Smith, 1977). La présence d'un tel principe dans la salive des tiques est surtout importante pour son rôle anti-inflammatoire, servant à contrebalancer les effets allergéniques d'autres

composés. Des allergènes ont d'ailleurs été isolés chez *B. microplus* (Willadsen *et al.*, 1978) et *I. holocyclus* (Gauci *et al.*, 1988).

La salive la plus étudiée et la mieux connue est sans nul doute celle de *I. dammini*. Ribeiro *et al.* (1985) ont mis en évidence ses propriétés antihémostatiques, antiinflammatoires et immunosuppressives.

L'activité antihémostatique est due à l'action conjuguée d'une apyrase, de la PGE₂ et de la PGI₂. Elle se caractérise par une inhibition de la voie intrinsèque de la cascade de coagulation avant l'activation du facteur X (prévenant la formation de thrombine), et par un blocage de l'agrégation des plaquettes sanguines.

L'apyrase, en convertissant l'ATP en AMP, préviendrait les réactions inflammatoires consommant de l'ATP, telles que la dégranulation des mastocytes, inhibée également par la PGE₂ (Bach, 1982), et l'agrégation des neutrophiles. Les propriétés antiinflammatoires de cette salive proviennent aussi de sa capacité de détruire des substances comme la bradykinine, qui augmente la perméabilité vasculaire et provoque la douleur, et les anaphylatoxines C3a ou C5a issues de l'activation du système complément (Ribeiro et Spielman, 1986). Il convient de remarquer ici que la salive d'autres espèces de tiques serait plutôt génératrice d'anaphylatoxines (Berenberg *et al.*, 1972; Gordon et Allen, 1991a).

La salive d'*I. dammini* contient une activité bloquant la voie alterne du complément (Ribeiro, 1987b). Une molécule de 49 kDa est responsable de l'inhibition du clivage du C3 en C3a et C3b et de la fixation du C3b sur une surface activatrice.

Les propriétés immunosuppressives de la salive de *I. dammini* ont été démontrées dans un test *in vitro* utilisant un hybridôme de cellules T (Ribeiro *et al.*, 1985). L'activation et la prolifération des cellules sont inhibées par la suppression de la production d'IL-2. Des résultats similaires sont obtenus *in vitro* avec la salive de *D. andersoni* (Ramachandra et Wikel, 1992). Les auteurs observent aussi une inhibition des synthèses d'interféron (INF)- γ par les lymphocytes, et de TNF- α par les macrophages. La PGE₂ est vraisemblablement à l'origine de ces effets immunosuppressifs (Ribeiro, 1987a). Ce dérivé du métabolisme de l'acide arachidonique, également sécrété par des cellules de l'hôte se trouvant en périphérie des sites de fixation des tiques (macrophages, fibroblastes, neutrophiles, etc), est responsable de multiples activités. La PGE₂ bloque la sécrétion d'IL-2 et d'INF- γ par les lymphocytes (Walker *et al.*, 1983; Phipps *et al.*, 1991). Bien que sa synthèse puisse être induite par le TNF- α , elle inhibe la production de cette cytokine chez les macrophages (Pettipher et Whittle, 1992) et les lymphocytes T (Ferreri *et al.*, 1992). La PGE₂ contrôle l'infiltration des cellules T au niveau des sites de fixation des tiques en inhibant l'adhésion des lymphocytes aux cellules endothéliales, première étape du processus d'extravasation (To et Schrieber, 1990), ce qui pourrait perturber indirectement le développement de la réponse immunitaire.

Les récentes recherches démontrant l'existence, chez les souris et les humains, de deux clones distincts de cellules T helper (Th1 et Th2) ont quelque peu atténué la connotation exclusivement immunosuppressive de la PGE₂. Les Th1 synthétisent de l'IL-2 et de l'INF- γ , et sont à l'origine de l'activation des macrophages et des réactions

d'HRT. Les Th2 sécrètent plutôt de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-10. Ils induisent la production d'IgG₁ et d'IgE par les lymphocytes B, et génèrent des phénomènes d'éosinophilie et des réactions d'hypersensibilité immédiate (Romagnani, 1992). La PGE₂ inhibe uniquement la fonction des Th1, favorisant ainsi la réponse immunitaire dépendant des Th2 (Betz et Fox, 1991). Ces résultats amènent à considérer la PGE₂ comme une substance immunorégulatrice (Phipps *et al.*, 1991). Mais ce nouvel aspect de la fonction de la PGE₂ ne semble pas particulièrement favorable aux tiques.

Enfin, certaines tiques possèdent un dernier atout pour faciliter leur repas sanguin, l'immobilisation de leur hôte par paralysie. La salive de nombreuses espèces contient des toxines paralysantes leur permettant de se nourrir en évitant d'être rejetées par grattage (Gothe *et al.*, 1979; Viljoen *et al.*, 1986).

1.7. Caractérisations d'antigènes

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, la salive est une source très importante d'antigènes contre lesquels l'hôte va diriger sa réponse immunitaire. De nombreuses études visant à répertorier et à caractériser des antigènes salivaires reconnus par les sérums d'animaux infestés ou vaccinés ont été effectuées (Brown et Askenase, 1986; Gill *et al.*, 1986; Shapiro *et al.*, 1987; Brown, 1988a, 1988b; Jaworski *et al.*, 1990; Barriga *et al.*, 1991; Janse van Vuuren *et al.*, 1992).

Dans le cadre d'expériences de vaccination, d'autres organes comme l'intestin ont aussi été examinés, et certains antigènes caractérisés (Willadsen *et al.*, 1989; Wong et Opdebeeck, 1989).

Récemment, une protéine antigénique de 25 kDa été mise en évidence dans le tégument d'*I. ricinus* (Rutti et Brossard, 1989). Les animaux ayant acquis une forte résistance après des infestations répétées possèdent aussi des taux d'anticorps élevés contre cette protéine (Bovet, 1987). Par immunoblotting, de faibles quantités de 25kDa sont détectées dans un extrait total de nymphes gorgées, ainsi que dans la glande salivaire et l'hémolymphe des adultes. Cette protéine est principalement localisée dans le tégument, au niveau des cellules hypodermiques et dans la cuticule de l'alloscutum (Haug *et al.*, 1988, Rutti *et al.*, 1988b). Dans la glande salivaire, elle est essentiellement située dans la partie cuticulaire des canaux salivaires des acini de type II et III (Brossard *et al.*, 1991). Les lapins produisent des anticorps contre cette protéine (Bovet, 1987; Rutti *et al.*, 1988a), qui semblent intervenir dans l'inhibition partielle de sa biosynthèse et de sa déposition dans le tégument (Rutti *et al.*, 1990; Rutti *et al.*, 1992). Un développement altéré du tégument serait ainsi une des causes de la diminution du volume sanguin prélevé par des tiques nourries sur des lapins résistants.

1.8. Les cytokines, un nouvel outil pour comprendre et moduler la réponse immunologique d'un hôte face à un parasite

Les premiers essais de modulation de la réponse immunologique dans le modèle tique ont été effectués à l'aide de substances immunosuppressives plus ou moins spécifiques d'un compartiment du système immunitaire de l'hôte. L'utilisation de cyclosporine A (Girardin et Brossard, 1989; 1990), qui inhibe la production d'IL-2 par les lymphocytes T helper (Thomson *et al.*, 1986), a mis en évidence l'importance de la réponse cellulaire dans le développement d'une immunité anti-tiques et le rôle potentiel de l'IL-2 en tant qu'initiateur de cette réponse.

1.8.1. IL-2

L'IL-2 humaine est une glycoprotéine d'environ 15 kDa et de 133 acides aminés (Rosenberg *et al.*, 1984). Elle possède 65 à 70% d'homologie avec l'IL-2 d'autres espèces de Mammifères (souris, rat, bovin ou mouton), dont font partie les séquences d'acides aminés impliquées dans la liaison avec le récepteur. Les cellules productrices sont principalement les lymphocytes T activés (Delves et Roitt, 1992). Cette lymphokine joue un rôle central dans l'activation des lymphocytes T et B et des macrophages. Elle est indispensable au déclenchement de l'expansion clonale rapide des cellules après contact avec un antigène ou un mitogène (Swain, 1991), et participe à leur différenciation et au développement de leurs fonctions effectrices. Elle stimule l'activité des lymphocytes T cytotoxiques (Farrar *et al.*, 1981), des cellules NK (natural killers) (Hefeneider *et al.*, 1983) et peut générer des cellules LAK (lymphokine activated killers) (Rosenberg, 1988). La réponse des NK à l'IL-2 se traduit par une prolifération, une production d'INF- γ , et une activité cytolytique amplifiée. Chez les monocytes, la sécrétion d'IL-1 (Delves et Roitt, 1992) et de TNF- α sont déclenchées par la lymphokine (Economou *et al.*, 1989; Remick *et al.*, 1991); la cytotoxicité, la phagocytose (Malkovski *et al.*, 1987), ainsi que l'expansion des précurseurs cellulaires (Delves et Roitt, 1992) sont augmentées. Enfin, l'IL-2 accroît les réactions d'HRT (Zaloom *et al.*, 1991) et peut annuler l'effet suppresseur de la cyclosporine A (Wang *et al.*, 1982).

A cause de son action sur les cellules LAK et sur les lymphocytes cytotoxiques, l'IL-2 a été utilisée avec quelque succès dans des thérapies contre le cancer (Rosenberg, 1988; Rees et Wiltrout, 1990), ou dans la lutte contre des infections microbiennes intracellulaires comme la lèpre (Kaplan *et al.*, 1989) ou les leishmanioses cutanées (Akuffo *et al.*, 1990). Malheureusement, les traitements avec des doses élevées de lymphokine provoquent souvent des effets secondaires indésirables tels que violentes fièvres, nausées, hypotension, œdèmes, problèmes rénaux et dermatologiques aigus (Dummer *et al.*, 1991). Bon nombre de ces symptômes sont dus à l'augmentation systémique de la sécrétion de TNF- α , induite par l'IL-2. Les neutrophiles et le complément sont également impliqués dans les dommages occasionnés aux cellules

endothéliales et dans les problèmes de perméabilité vasculaire et d'hypotension qui en résultent (Baars *et al.*, 1992).

Des études récentes ont fait part de l'emploi de l'IL-2 en tant qu'adjuvant dans des expériences de vaccination, ouvrant ainsi de nouveaux débouchés dans l'utilisation clinique de cette lymphokine. Des essais d'immunisation contre les virus de la rage (Nunberg *et al.*, 1989) ou de l'herpès (Hughes *et al.*, 1991), contre les bactéries *Haemophilus pleuropneumoniae* (Anderson *et al.*, 1987) et *Pseudomonas aeruginosa* (Abraham et Shah, 1992), ou contre *Trypanosoma cruzi* (Choromanski et Kuhn, 1987) montrent que l'IL-2 amplifie la réponse immunitaire des animaux contre les pathogènes. Cette protection est principalement corrélée avec une augmentation de l'immunité à médiation cellulaire des hôtes, parfois accompagnée d'une stimulation de la réponse humorale.

1.8.2. Le TNF- α , médiateur des réactions inflammatoires

Le TNF- α est une protéine de 154 à 157 acides aminés selon l'espèce (homme, souris, lapin) et d'environ 17 kDa, issue d'un précurseur comprenant 70 à 80 acides aminés de plus. Il n'est pas glycosylé, à l'exception du TNF- α de souris qui possède un site de glycosylation n'intervenant pas dans l'activité biologique de la molécule. Il existe environ 80% d'homologie entre les TNF- α humain, murin et de lapin, ce qui se traduit par une réactivité interspécifique élevée (Warren, 1990). Cette protéine possède également 20% d'homologie avec le TNF- β ou lymphotoxine, qui se lie aux mêmes récepteurs et induit des réponses biologiques similaires (Cerami et Beutler, 1988). L'hormone active est un trimère où les molécules de 17 kDa sont combinées de façon non-covalente (Beutler et Cerami, 1989).

Le TNF- α a tout d'abord été connu pour son action cytolytique *in vitro* sur différentes lignées de cellules cancéreuses et sa capacité d'induire *in vivo* des nécroses hémorragiques dans des tumeurs de souris (Old, 1985). Il s'est révélé plus tard être identique à la cachectine (Beutler *et al.*, 1985a), facteur à l'origine des phénomènes de cachexie (fort amaigrissement résultant d'une diminution de la masse grasseuse et musculaire, et d'une anorexie), et de chocs septiques (Cerami et Beutler, 1988). Le TNF- α serait responsable de la plus grande part des effets endotoxiques, souvent léthaux, observés aux cours d'infections de bactéries Gram négatives: fièvres, diarrhées, hémorragies intestinales, hypotension, oedèmes pulmonaires, dysfonctionnement des reins et coagulation intravasculaire disséminée (Beutler et Cerami, 1986; Tracey *et al.*, 1986). Cette cytokine est la seule capable d'induire un choc irréversible aboutissant à la mort: l'effet léthal du LPS pendant une infection à *Escherichia coli* est inhibé si les souris sont traitées avec un sérum anti-TNF- α (Beutler *et al.*, 1985b); le même résultat est observé chez des babouins (Tracey *et al.*, 1987). D'autres cytokines comme l'IL-1 (Okusawa *et al.*, 1988a) et l'INF- τ peuvent accélérer le processus en agissant en synergie avec le TNF- α (Cerami, 1992).

Des études récentes montrent que l'hormone, dans la plupart des cas, n'est pas responsable directement des réponses biologiques qu'elle génère, mais qu'elle induit la production de plusieurs cytokines et autres médiateurs qui sont les véritables effecteurs: l'IL-1, dont les effets sont souvent similaires à ceux du TNF- α ; l'IL-6 (ou INF- β 2), qui stimule la synthèse des protéines de phase aiguë dans le foie (Hirano *et al.*, 1990); l'IL-8, chimiotactique pour les neutrophiles (Warren, 1990); la PGE₂, responsable de la pyrogénicité du TNF- α et de bien d'autres activités décrites précédemment; et enfin le PAF, induisant la libération d'enzymes lysosomales et de dérivés toxiques de l'oxygène par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages (Gallin, 1989). Chez des lapins atteints de méningite à méningocoques, l'apparition dans leur liquide cérébrospinal des pics de concentration de TNF- α , d'IL-1 et d'IL-6 est décalée dans le temps, démontrant ainsi l'interconnection existant entre ces cytokines (Waage *et al.*, 1989).

Le TNF- α est souvent libéré en réponse à une invasion de microorganismes pathogènes (virus, bactéries, parasites), ou en présence de tumeurs.

En ce qui concerne les parasitoses, le TNF- α a surtout été détecté dans les sérums de patients atteints de leishmaniose (*Leishmania donovani*) et de malaria (Scuderi *et al.*, 1986). Cette cytokine est d'ailleurs responsable de la pathologie liée à la malaria humaine, et surtout à sa forme cérébrale, souvent léthale (Clark, 1987). Kern *et al.* (1989) montrent, chez des patients infectés par *Plasmodium falciparum*, que les concentrations sériques de TNF- α et d'IL-6 sont corrélées avec la gravité des dysfonctions organiques. La production de TNF- α serait maximale au moment de la rupture des schizontes, ce qui expliquerait aussi les poussées de fièvre observées à cette occasion (Kwiatkowski *et al.*, 1989). Dans les infections à *B. burgdorferi*, des titres élevés de TNF- α sont mesurés dans le sérum et le liquide synovial de patients séropositifs (Defosse et Johnson, 1992). La concentration de cytokines présente dans des cultures *in vitro* de macrophages humains ou de cellules péritonéales de souris serait dépendante de la dose de spirochètes ajoutée.

Le TNF- α n'a pas toujours un impact négatif sur un animal confronté à une invasion de microorganismes pathogènes. Dans le cas de la leishmaniose cutanée (*Leishmania major*), des souris traitées avec un anti-TNF- α présentent une exacerbation de l'infection, caractérisée par des lésions plus étendues et une parasitémie plus élevée que chez des souris témoins (Titus *et al.*, 1989). Une injection de TNF- α provoque, par contre, une réduction significative des lésions. *In vitro*, cette cytokine active les macrophages qui sont alors capables de tuer les parasites (Liew *et al.*, 1990).

Le rôle protecteur du TNF- α a été démontré dans des infections à *Toxoplasma gondii* (Chang *et al.*, 1990), ou *Plasmodium chabaudi* (Clark *et al.*, 1987; Stevenson *et al.*, 1990). *Trypanosoma muscili* (Kongshavn et Ghadirian, 1988) et *T. cruzi* (Black *et al.*, 1989) sont des exemples particuliers: la cytokine est toxique *in vitro* pour les parasites, mais elle favorise l'infection et l'augmentation de la parasitémie *in vivo*.

Le TNF- α intervient dans les pathophysiologies associées aux réactions inflammatoires. Il agit sur un grand nombre de cellules inflammatoires et est lui-même sécrété par ce type de cellules. Les macrophages et les monocytes en sont les principaux producteurs, mais les mastocytes (Gordon et Galli, 1990), les kératinocytes (Kupper, 1990), les cellules de Langerhans (Larrick *et al.*, 1989) et bien d'autres cellules encore (cellules musculaires lisses, cellules de Paneth, etc) peuvent aussi synthétiser du TNF- α . Sa sécrétion est régulée par des cytokines (IL-2, GM-CSF, TNF- α) (Vassalli, 1992), des anaphylatoxines (C5a) (Okusawa *et al.*, 1988b), ou par des dérivés bactériens ou parasitaires. L'étendue de ses activités est très large car pratiquement toutes les cellules, à part les érythrocytes, possèdent un récepteur pour cette cytokine (Cerami, 1992).

Source principale de TNF- α , les monocytes/macrophages en sont également la cible majeure. La cytokine permet leur différenciation et leur activation. Ceux-ci répondent par la libération de dérivés toxiques de l'oxygène et de l'azote. Le TNF- α est chimiotactique *in vitro* pour les monocytes. Il induit chez les cellules endothéliales l'expression *in vivo* de molécules d'adhésion membranaire (ELAM-1, ICAM-1, et VCAM-1) favorisant l'émigration locale de divers leucocytes, dont les monocytes/macrophages et les neutrophiles (Vassalli, 1992).

Ces derniers constituent d'ailleurs une autre cible importante du TNF- α , qui agirait principalement sur leur activation et leur motilité. Les études à ce sujet sont nombreuses et présentent des résultats parfois contradictoires, d'après les conditions *in vitro* ou *in vivo* des expériences. L'incubation *in vitro* des neutrophiles avec la cytokine résulte en une augmentation de leur migration en réponse à un facteur chimiotactique comme le N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP) (Figari *et al.*, 1987). Le TNF- α est aussi directement chimiotactique pour ces cellules comme le montrent Newman et Wilkinson (1989) dans trois différents tests *in vitro*, confirmant ainsi les observations de Ming *et al.* (1987). Injectée intradermiquement à des lapins, la cytokine semble provoquer le même effet *in vivo* (Rampart *et al.*, 1989). Le pouvoir attractant du TNF- α serait aussi indirect, induit par d'autres facteurs libérés en réponse à son activité. Dans la peau, la cytokine stimule chez les kératinocytes, les fibrocytes, les macrophages et les cellules endothéliales, la production d'IL-8, anciennement nommée "monocyte-derived neutrophil chemotactic factor" (MDNCF), "neutrophil attractant/activation protein-1" (NAP-1), ou "neutrophil-activating factor" (NAF) (Larsen *et al.*, 1990; Warren, 1990; Faccioli *et al.*, 1990; Nickoloff *et al.*, 1991). Pour d'autres auteurs par contre, le TNF- α a un effet fortement inhibiteur sur la migration des neutrophiles face à un gradient chimiotactique (Ferrante *et al.*, 1988; Kownatzki *et al.*, 1988). Sa fonction serait d'immobiliser les cellules au niveau des sites inflammatoires, empêchant leur recirculation. La cytokine stimulerait plutôt le métabolisme respiratoire, l'adhérence, la dégranulation et le phénomène de phagocytose (Livingston *et al.*, 1989).

En plus de promouvoir l'expression des protéines membranaires nécessaires à la migration des cellules circulantes en direction des sites inflammatoires, le TNF- α a

d'autres effets sur les cellules endothéliales. Il peut augmenter *in vitro* la perméabilité vasculaire endothéliale, ce qui expliquerait les phénomènes d'oedémisation pendant les chocs septiques (Royall *et al.*, 1989). Il bloque l'activité anticoagulante de ces cellules et aurait lui-même une fonction antifibrinolytique. Il induit la libération de facteurs hématopoïétiques nécessaires à la maturation de diverses cellules phagocytaires: GM-CSF, G-CSF (granulocytes) et CSF-1 (macrophages).

Le TNF- α stimule la maturation des kératinocytes. Il augmente la prolifération des fibroblastes et leur production de GM- et de G-CSF, d'IL-8, et de PGE₂ (Elias *et al.*, 1987). Il inhibe la synthèse de collagène mais favorise celle de collagénase, participant ainsi au remodelage des tissus de soutien lors d'inflammations articulaires.

Enfin, cette cytokine a encore un effet stimulateur sur l'activation et la fonction de plusieurs sous-populations de lymphocytes (CD4⁺, CD8⁺, B, LAK) (Vassalli, 1992).

Ainsi, le rôle central que jouent l'IL-2 dans l'induction de la réponse immunitaire et le TNF- α dans les réactions inflammatoires au niveau de la peau, motive leur utilisation dans notre modèle, dans le but de mieux comprendre les mécanismes qui régissent les relations immunitaires existant entre une tique et son hôte.

1.9. Buts du travail

Ce travail a été projeté sur la base des résultats de Girardin (1987) et de Girardin et Brossard (1989; 1990). Les buts recherchés sont les suivants:

A. Déterminer l'importance de la charge parasitaire sur le développement de la résistance des lapins contre les tiques, en les soumettant à des infestations successives avec un nombre très élevé, ou très faible d'ectoparasites. Comparer le niveau de résistance acquise chez ces animaux en examinant les perturbations physiologiques occasionnées aux tiques. Caractériser et comparer la réponse humorale et cellulaire des hôtes, à l'aide de tests *in vitro* comme l'ELISA, les transformations lymphoblastiques (immunité à médiation cellulaire) ou les migrations de neutrophiles (inflammation). Des extraits antigéniques salivaires et tégumentaires sont utilisés afin d'évaluer la production d'anticorps anti-tiques, ou la réponse de lymphocytes spécifiques circulants.

B. Moduler la réponse immunitaire des hôtes par des traitements avec des cytokines (IL-2 et TNF- α) présumées jouer un rôle dans le modèle lapin/*I. ricinus*, toujours dans le but d'une meilleure compréhension de l'immunité anti-tiques. Tenter de préciser l'importance de ces molécules dans le développement de la résistance.

Les résultats obtenus ont permis d'apporter des connaissances nouvelles sur les relations hôte/ectoparasites.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Animaux

2.1.1. Tiques

Les tiques utilisées pour les infestations et la préparation des antigènes sont des adultes de l'espèce *I. ricinus* L. élevées dans notre laboratoire selon la méthode décrite par Graf (1978a).

2.1.2. Lapins

Des lapins mâles de la race New Zealand (génotype Chbb) n'ayant jamais été préalablement en contact avec des tiques sont choisis pour ces expériences. Les animaux sont âgés d'environ dix semaines et pèsent entre deux et trois kilos. Ils sont gardés dans l'animalerie de l'Institut et fournis en eau et en nourriture *ad libitum*. Dans le souci de travailler avec des groupes expérimentaux équivalents, l'emplacement des cages dans l'animalerie est pris en compte lors de leur formation. Le stress dû aux dérangements, le nombre de voisins de cage, l'intensité de lumière, etc, peuvent influencer l'état général et le système immunitaire du lapin. Il nous semble donc important que chaque groupe comprenne des animaux de cages situées à toutes les hauteurs et dans toutes les portions de l'animalerie.

2.2. Antigènes

Un extrait de glandes salivaires, un extrait de tégument enrichi en protéine de 25 kDa et la salive de *I. ricinus* ont été utilisés au cours de ce travail.

2.2.1. Extrait de glandes salivaires (EGS)

L'extrait de protéines solubles de glandes salivaires est préparé à partir de tiques femelles partiellement gorgées pendant cinq jours sur lapin, c'est-à-dire au moment où les glandes sont complètement développées (Balaabov, 1972).

Les tiques sont disséquées à 4°C dans un tampon phosphate salin pH 7.4 (PBS; 10mM NaH₂PO₄; 40mM K₂HPO₄; 120mM NaCl) contenant les inhibiteurs de protéases PMSF 1mM (phenyl-methyl-sulphonyl fluorid) et EDTA 1mM (ethylene diamine tetraacetic acid). Les glandes salivaires sont prélevées et placées dans le même tampon à raison de 100 glandes (50 tiques) pour un volume de 5ml. Elles sont homogénéisées sur glace à l'aide d'un broyeur (Polytron, Kinematica) en position 9 pendant 90 secondes. L'homogénat est centrifugé à 27'000g (rotor SS34, Sorvall) durant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est dialysé pendant une nuit à 4°C dans une membrane Spectrapor (6-8'000 cut off) toujours dans le même tampon (2 x 2l). Le dialysat est ensuite centrifugé 20 minutes à 48'000g, puis concentré et diafiltré dans du RPMI 1640 (Gibco), à l'aide d'une cellule Amicon munie d'une membrane d'ultrafiltration Diaflo de PM 10 (Amicon).

Le contenu protéique de l'extrait est déterminé par la méthode de Lowry *et al.* (1951) avec l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard. L'EGS est finalement filtré stérile (Acrodiscs 0.2µm, Gelman Science) et conservé à -20°C en aliquots de 0.1ml jusqu'à l'utilisation.

2.2.2. Extrait tégumentaire enrichi en une protéine de 25 kDa (ET) (Rutti et Brossard, 1989)

Après le prélèvement des glandes salivaires, le reste des organes internes (intestin, ovaire, muscles, trachées etc.) est enlevé pour ne garder que le tégument qui est homogénéisé et centrifugé comme décrit ci-dessus pour l'EGS. Le surnageant est ensuite traité au sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄). La fraction précipitée avec 50-80% de sel est conservée, resuspendue dans du PBS et dialysée une nuit à 4°C (2 x 2l PBS) pour enlever l'excès de sel. Le reste de la préparation est identique à celle de l'EGS.

2.2.3. Récolte de salive

La méthode de prélèvement de salive a été reprise de Salamin (1988), elle-même inspirée de Tatchell (1967) et de Ribeiro et Spielman (1986).

Les tiques sont retirées du lapin après cinq à six jours de nutrition et conservées dans des tubes en atmosphère humide jusqu'à leur utilisation. La salivation est déclenchée en badigeonnant le dos des tiques avec 1 à 4µl (selon leur taille) d'une solution de pilocarpine-HCl 5% (p/v) dans du méthanol. Après quelques minutes, les tiques sont rincées avec de l'eau distillée pour éviter l'apparition de nécroses sur la tégument, elles sont ensuite fixées sur le dos à l'aide d'une bande adhésive au fond d'une boîte de Petri, et maintenues en atmosphère humide. La salive est recueillie pendant les deux heures qui suivent à l'aide de capillaires de 10µl dont une extrémité a été adaptée par étirement à la flamme au diamètre du rostre des tiques. Sitôt récoltée, la salive est immédiatement congelée à -20°C en aliquots.

2.3. Effets de la charge parasitaire sur l'acquisition de la résistance et la réponse immunitaire cellulaire et humorale du lapin

2.3.1. Expérience préliminaire

Sept lapins sont soumis à cinq infestations successives, à des intervalles de vingt-cinq jours. Trois groupes expérimentaux sont définis: un groupe de trois lapins recevant 25 femelles et 25 mâles (Inf-25), un groupe de deux lapins avec 5 femelles et 5 mâles (Inf-5), et un troisième groupe de deux lapins avec 15 femelles et 15 mâles (Inf-15) par infestation. Une prise de sang est effectuée juste avant chaque infestation (jours -1, 25, 50, 75, 100 et 125) pour contrôler la réponse immunitaire humorale des lapins face aux antigènes de tiques.

Les procédés d'infestation, d'examen de la biologie des tiques, de prise de sang et de dosage des anticorps par ELISA sont décrits dans les annexes I, IIA et IVA.

2.3.2. Infestations en continu

Trois lapins supplémentaires sont infestés par 3 femelles et 3 mâles tous les six jours pendant deux mois (Inf-cont), soit un total de dix infestations. Des prises de sang sont effectuées aux jours -1, 20, 30, 40, 50 et 60 de l'expérience, pour la recherche d'anticorps anti-tiques. La méthodologie est décrite dans les annexes I, IIA et IVA.

2.3.3. Modulation de la réponse cellulaire et humorale du lapin par deux degrés d'infestation différents, et conséquences sur le développement de la résistance

Les groupes expérimentaux Inf-25 et Inf-5, définis dans l'expérience 2.3.1., comprenant sept lapins chacun, sont soumis à deux infestations successives séparées par un intervalle de vingt-cinq jours. Pour permettre une comparaison directe de la résistance entre ces deux modèles, cinq individus de chaque groupe subissent une troisième infestation avec 15 femelles et 15 mâles. L'examen de la biologie des tiques (annexe I) permet une évaluation de la résistance acquise par les lapins.

Des prises de sang (annexe II), plus nombreuses que lors de l'expérience préliminaire, sont faites aux jours -1, 5, 15, 25, 31, 41, 51, 57 et 67; celles des jours 5, 31 et 51 étant effectuées pendant le repas sanguin des tiques.

En plus de l'examen comparatif de la réponse immunitaire humorale (par ELISA, annexe IVA), un aspect de la réponse à médiation cellulaire est examiné par le biais de tests de transformation lymphoblastique (annexe IIIA). Pour ces tests, des concentrations d'EGS et d'ET de 10µg/puits, ou de concanavaine A (ConA) de 0.5µg/puits, sont utilisées.

2.4. Effets d'un traitement à l'IL-2 recombinante humaine sur l'acquisition de la résistance chez des lapins infestés, et sur leur réponse cellulaire et humorale contre les tiques

2.4.1. Antigène

Seul l'EGS est utilisé. Pour le test de transformation lymphoblastique, une concentration de 5µg/puits donne des résultats comparables à ceux des expériences précédentes (voir aussi figure 40).

2.4.2. IL-2

L'IL-2 recombinante humaine provient de chez Bachem AG, lyophilisée en ampoules de 10µg, contenant chacune 2.23×10^4 unités. L'activité de la lymphokine a été déterminée par un test sur cellules CTLL (Gillis *et al.*, 1978). (N.B. Lors de la seconde expérience, deux ampoules utilisées issues d'un lot différent ne contiennent que 5×10^3 unités). Les ampoules sont reconstituées juste avant emploi avec du PBS (phosphate de sodium 10mM, pH 7.4; 150mM NaCl).

2.4.3. Première expérience

Cinq lapins subissent des injections sous-cutanées d'IL-2 (groupe traité à l'IL-2: TIL-2), dès la fixation des tiques de première infestation. L'IL-2 est administrée toutes les 12 heures, par doses de 4.5×10^3 unités dans 0.8ml de PBS (10 doses au total). Parallèlement, deux groupes de cinq lapins contrôles reçoivent des injections sous-cutanées de 0.8ml de PBS.

Les lapins TIL-2 et ceux du groupe contrôle CDir (qui constitue le témoin direct) sont infestés tout d'abord par 5 femelles et 5 mâles, alors que les lapins du groupe contrôle CRés le sont par 25 couples de tiques (ces animaux formant le groupe témoin résistant). Au vingt-sixième jour de l'expérience, les trois groupes de lapins sont infestés une seconde fois par un nombre égal de tiques, 25 couples, pour permettre une comparaison directe du degré de résistance des hôtes. Le traitement avec l'IL-2 n'est pas répété.

Des prises de sang sont effectuées aux jours -1, 5, 12, 25, 32, 39 et 62 pour la mesure des réponses cellulaire et humorale.

Le degré de résistance des animaux est évalué par l'examen de la biologie des tiques après gorgement. Leur réponse cellulaire est estimée par transformation lymphoblastique (annexes I, II et IIIA). En plus du dosage des IgG anti-EGS par ELISA (annexe IVA), la mesure de la réponse humorale des hôtes est complétée par une titration des IgM totales dans un test d'immunodiffusion radiale (annexe IVB).

Homme	-76	met	ser	thr	glu	ser	met	ile	arg	asp	val	glu	leu	ala	glu	glu	ala	leu	pro	lys	lys	thr	gly	gly	pro	gin	
Lapin	-80	met	ser	thr	glu	ser	met	ile	arg	asp	val	glu	leu	ala	glu	gly	pro	leu	pro	lys	lys	ala	gly	gly	pro	gin	
Consensus		met	ser	thr	glu	ser	met	ile	arg	asp	val	glu	leu	ala	glu			leu	pro	lys	lys		gly	gly	pro	gin	
Homme	-51	gly	ser	arg	arg	cys	leu	phe	leu	ser	leu	phe	ser	phe	leu	ile	val	ala	gly	ala	thr	thr	leu	phe	cys	leu	
Lapin	-55	gly	ser	lys	arg	cys	leu	cys	leu	ser	leu	phe	ser	phe	leu	leu	val	ala	gly	ala	thr	thr	leu	phe	cys	leu	
Consensus		gly	ser		arg	cys	leu		leu	ser	leu	phe	ser	phe	leu		val	ala	gly	ala	thr	thr	leu	phe	cys	leu	
Homme	-26	leu	his	phe	gly	val	ile	gly	pro	gin	arg	glu	glu	phe	pro	arg	asp	leu	ser	leu	ile	ser	pro	leu	ala	gin	
Lapin	-30	leu	his	phe	arg	val	ile	gly	pro	gin	glu	glu	glu	ser	pro	ser	asn	asn	leu	his	leu	val	asn	pro	val	ala	gin
Consensus		leu	his	phe		val	ile	gly	pro	gin		glu	glu		pro			leu	leu			pro		ala	gin		
Homme	-1	ala	---	---	val	arg	ser	ser	ser	arg	thr	pro	ser	arg	lys	pro	val	ala	his	val	val	ala	asn	pro	gin	ala	
Lapin	-5	met	val	thr	leu	arg	'ser	ala	ser	arg	ala	leu	ser	asp	lys	pro	leu	ala	his	val	val	ala	asn	pro	gin	val	
Consensus						arg	ser		ser	arg			ser	asp	lys	pro		ala	his	val	val	ala	asn	pro	gin		
Homme	23	glu	gly	gin	leu	gin	trp	leu	asn	arg	arg	ala	asn	ala	leu	leu	ala	asn	gly	val	glu	leu	arg	asp	asn	gin	
Lapin	21	glu	gly	gin	leu	gin	trp	leu	ser	gin	arg	ala	asn	ala	leu	leu	ala	asn	gly	met	lys	leu	thr	asp	asn	gin	
Consensus		glu	gly	gin	leu	gin	trp	leu			arg	ala	asn	ala	leu	leu	ala	asn	gly		leu		asp	asn	gin		
Homme	48	leu	val	val	pro	ser	glu	gly	leu	tyr	leu	ile	tyr	asn	gin	val	leu	phe	lys	gly	gin	gly	cys	pro	ser	thr	
Lapin	46	leu	val	val	pro	ala	asp	ply	leu	tyr	leu	ile	tyr	asn	gin	val	leu	phe	asn	gly	met	lys	leu	thr	asp	asn	tyr
Consensus		leu	val	val	pro			gly	leu	tyr	leu	ile	tyr	asn	gin	val	leu	phe		gly	gin	gly	cys	ser			
Homme	73	his	val	leu	leu	thr	his	thr	ile	asn	arg	ile	ala	val	asn	tyr	gin	thr	lys	val	asn	leu	leu	ser	ala	ile	
Lapin	71	---	val	leu	leu	thr	his	thr	val	asn	arg	phe	ala	val	asn	tyr	pro	asn	lys	val	asn	leu	leu	asn	ala	ile	
Consensus			val	leu	leu	thr	his	thr		asn	arg		ala	val	asn	tyr			lys	val	asn	leu	leu	asn	ala	ile	
Homme	98	lys	ser	pro	cys	gin	arg	glu	thr	pro	glu	gly	ala	glu	ala	lys	pro	trp	tyr	glu	pro	ile	tyr	leu	gly	gly	
Lapin	95	lys	ser	pro	cys	his	arg	glu	thr	pro	glu	glu	ala	glu	pro	met	ala	trp	tyr	glu	pro	ile	tyr	leu	gly	gly	
Consensus		lys	ser	pro	cys		arg	glu	thr	pro	glu		ala	glu				trp	tyr	glu	pro	ile	tyr	leu	gly	gly	
Homme	123	val	phe	gin	leu	glu	lys	gly	asp	arg	leu	ser	thr	glu	val	asn	gin	pro	arg	tyr	leu	asp	phe	ala	glu	asn	
Lapin	120	val	phe	gin	leu	glu	lys	gly	asp	arg	leu	ser	thr	glu	val	asn	gin	pro	glu	tyr	leu	asp	leu	ala	glu	asn	
Consensus		val	phe	gin	leu	glu	lys	gly	asp	arg	leu	ser		glu	asn		pro		tyr	leu	asp		ala	glu	asn		
Homme	148	gly	gin	val	tyr	phe	gly	ile	ile	ala	leu															157	
Lapin	145	gly	gin	val	tyr	phe	gly	ile	ile	ala	leu															154	
Consensus		gly	gin	val	tyr	phe	gly	ile	ile	ala	leu																

Homologie: 79.4%

Tableau 1: Séquence protéique du TNF- α humain et du TNF- α da lapin (d'après Pennica *et al.*,1984; Ito *et al.*, 1986)

2.4.4. Expérience complémentaire

Un lot de treize lapins est réparti dans les groupes expérimentaux préalablement décrits: cinq lapins dans TIL-2, cinq dans CDir et trois dans CRés. Les animaux sont infestés selon le protocole décrit plus haut (2.4.3.). Les lapins traités reçoivent des doses plus faibles de lymphokine (3.8×10^5 unités). En effet, deux ampoules d'IL-2, provenant d'un lot dont l'activité est cinq fois inférieure à celle du lot précédent, ont dû être utilisées (voir 2.4.2). Au vingt-sixième jour de l'expérience, les lapins subissent un test cutané d'hypersensibilité aux antigènes de tiques (annexe III C). Les autres paramètres mesurés sont les mêmes que précédemment.

2.5. Effets du TNF- α sur l'acquisition de la résistance et sur la réponse immunitaire des lapins infestés

2.5.1. Antigène

Seul l'EGS est utilisé dans les tests mesurant la réponse immunitaire des hôtes.

2.5.2. TNF- α

La cytokine est du TNF- α recombinant humain (tableau 1), fourni en ampoules de 2ml (Genentech), contenant chacune 0.49mg de protéine/ml (activité spécifique: 5×10^7 unités/mg). L'activité spécifique de l'hormone a été déterminée dans un test de cytotoxicité sur des cellules L-M (d'après Williamson *et al.*, 1983). Les ampoules sont conservées à 4°C, et diluées juste avant emploi dans du PBS (phosphate de sodium 10mM, pH 7.4; 140mM NaCl), ou du PBS complété de 0.1% de gélatine.

2.5.3. Vaccination contre le TNF- α

Quatre lapins subissent chacun une injection intradermique de 10^6 unités de TNF- α , diluées dans 250 μ l de PBS, le tout émulsionné dans 250 μ l d'adjuvant complet de Freund (ACF, Difco). Trois lapins témoins ne reçoivent que le tampon et l'ACF. Trois rappels sont pratiqués à quinze jours d'intervalle avec les mêmes doses de TNF- α /PBS (ou de PBS seul) mélangées à de l'adjuvant incomplet de Freund (AIF, Difco). Les titres d'anticorps anti-TNF- α sont contrôlés par ELISA (annexe IVA) sept jours après chaque rappel. Une semaine après le troisième rappel, les lapins sont infestés par 25 femelles et 25 mâles. Un nouveau rappel est effectué vingt jours plus tard, une semaine avant une seconde infestation avec 25 couples de tiques.

L'acquisition de la résistance chez les lapins vaccinés et chez les témoins est évaluée

par l'examen de la biologie des tiques (**annexe I**). La réponse cellulaire est testée par transformation lymphoblastique (**annexe IIIA**) lors des prises de sang faites après le rappel 3 et les infestations 1 et 2. Un dosage des anticorps anti-EGS (ELISA, **annexe IVA**) et du C3 sérique (immunodiffusion radiale, **annexe IVB**) complète l'étude.

2.5.4. Traitement des lapins au TNF- α

Cinq lapins sont traités avec du TNF- α aux jours -2, 0, 2, 4 et 6 d'une première infestation avec 20 couples de tiques. Les doses intraveineuses pour chaque animal sont déterminées d'après Otsuka *et al.* (1990). La cytokine, 3×10^5 unités/injections, est diluée dans 200 μ l de PBS-gélatine 0.1%. Deux lapins supplémentaires servent de témoins, et ne reçoivent que le tampon de dilution. Au vingt-sixième jour, chaque animal (traité ou témoin) subit une seconde infestation avec 13 couples de tiques. Les injections intraveineuses de TNF- α sont répétées pendant le repas sanguin, c'est-à-dire aux jours 26, 28, 30, 34 et 36 avec des doses plus élevées: 3×10^5 unités/kg pour chaque lapin (2.5 kg).

L'acquisition de la résistance par les lapins traités et les témoins est évaluée comme précédemment. Des prises de sang sont pratiquées aux jours -2 (avant l'injection de la cytokine), 5, 12, 25 et 31 de l'expérience. Un dosage des anticorps anti-tiques (IgG et IgM) et du C3 sérique est effectué. L'effet potentiel du traitement au TNF- α sur la prolifération des lymphocytes (transformation lymphoblastique) et la migration des neutrophiles (test décrit dans l'**annexe IIIB**) est aussi vérifié.

2.6. Effets *in vitro* des antigènes de tiques sur les lymphocytes et les neutrophiles de lapins indemnes ou sensibilisés par les tiques

2.6.1. Effet sur les lymphocytes

Des lymphocytes de lapins sont isolés et cultivés en présence d'antigènes de tiques dans un test de transformation lymphoblastique (**annexes IIB et IIIA**). Dix lapins indemnes et six sensibilisés sont testés. Ces derniers comprennent des animaux ayant eu un contact avec les ectoparasites: soit une infestation massive (environ 40 femelles, 2 lapins), soit au moins deux infestations de 15 paires de tiques adultes (4 individus).

L'effet des antigènes de tiques sur les lymphocytes est mesuré avec des concentrations croissantes d'EGS, d'ET et de salive: 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 10, 20 μ g/puits pour l'EGS et l'ET et 0.02, 0.1, 0.5, 1 μ l/puits pour la salive. Les antigènes sont utilisés avec ou sans l'addition de conA (0.5 μ g/puits). Les résultats obtenus pour les lapins indemnes ou sensibilisés sont finalement comparés.

2.6.2. Effet sur les neutrophiles

Le pouvoir chimiotactique ou inhibiteur de différentes concentrations d'antigènes de tiques (EGS, ET et salive) est mesuré dans un test de migration des neutrophiles (Falk et *al.* 1980). L'isolation des neutrophiles et le test de migration sont décrits dans les annexes IIB et IIIB.

Des neutrophiles de cinq lapins indemnes et de quatre sensibilisés (voir chap. 2.6.1.), sont utilisés pour ces tests. Des concentrations croissantes d'EGS (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 1, 2 et 5 µg/puits), d'ET (0.01, 0.1, 0.5, 2, 5 et 10 µg/puits) ou de salive (0.2 et 1 µl/puits) sont incubées soit dans le compartiment inférieur de la chambre de migration, soit directement avec les cellules.

2.7. Effets du sérum de lapins sensibilisés aux tiques sur la prolifération de lymphocytes de lapins indemnes ou sensibilisés

La préparation du sérum, l'isolation des lymphocytes et le test de transformation lymphoblastique sont décrits dans les annexes II et IIIA. Les sérums proviennent des expériences "charge parasitaire" et "IL-2" (voir sous 2.3. et 2.4.1.). Une concentration optimale de 20% dans du RPMI complet sans FCS (tableau B, annexes) est utilisée. Elle a été établie lors de tests préliminaires. Les cultures sont réalisées avec ou sans l'addition de conA (0.5 µg/puits), avec les cellules d'un lapin indemne, ou en présence de 5 µg/puits d'EGS, avec les lymphocytes d'un lapin sensibilisé (voir chap. 2.6.1.). Des cultures avec 20% de FCS servent de témoins. Les sérums de l'expérience "IL-2" (préalablement conservés à -80°C) sont testés directement, ou après avoir subi une incubation de 30 minutes à 56°C, ce qui inactive le système complémental.

2.8. Statistique

Les données de la biologie des tiques sont traitées par le test non paramétrique de Mann-Whitney (Siegel 1956, analyse globale), le test exact de Fischer (proportions) et le test G (Likelihood ratio chi-square; histogrammes de fréquence). L'analyse de variance (General Linear Model, SAS Institute Inc., 1989) et le test t de Student sont utilisés dans l'étude de la réponse immunitaire (cellulaire et humorale) des lapins. Ces tests exigeant une distribution normale des valeurs, une transformation \log_{10} des cpm nets et des titres d'anticorps est effectuée avant l'analyse.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 Effets de la charge parasitaire sur l'acquisition de la résistance et la réponse immunitaire cellulaire et humorale du lapin

3.1.1. Expérience préliminaire

3.1.1.1. Remarques générales

Nous avons cherché à définir deux modèles expérimentaux bien différenciés quant à leur comportement immunitaire face aux tiques: un modèle avec des hôtes fortement résistants; et à l'opposé, un modèle où les animaux ne parviennent pas à développer de résistance. Si l'on se réfère à la littérature, un modèle résistant est aisé à obtenir avec des lapins. L'autre modèle pose plus de problèmes. Il implique deux variantes: soit le système immunitaire de l'hôte n'est pas suffisamment stimulé pour générer une réponse, soit il est affaibli et épuisé par un contact répété avec de très fortes doses d'antigènes (tolérance à haute dose).

Deux stratégies sont ainsi retenues:

a) Moduler la réponse de l'hôte en faisant varier la charge parasitaire. Un petit nombre de tiques serait insuffisant pour stimuler un lapin, alors qu'une infestation massive provoquerait une forte réponse immune.

b) Epuiser le système immunitaire de l'hôte par des infestations massives et répétées.

Dans cette optique, deux groupes de lapins comprenant respectivement trois et deux individus, sont infestés avec 25 ou 5 couples d'adultes, ceci à cinq reprises au cours de l'expérience. Un troisième groupe de deux lapins, infesté avec 15 paires de tiques, sert de témoin comparatif. Il correspond aux protocoles généralement utilisés dans le modèle lapin/*I. ricinus*.

3.1.1.2. Biologie des tiques

Les résultats sont présentés dans le tableau 2 (page suivante) pour les trois groupes.

Inf-25 (n=3)	1ère infestation	2ème infestation	3ème infestation	4ème infestation	5ème infestation
Temps de gorgement (jours)	6.3 ± 0.7 (41)	6.5 ± 1.5 (50)	6.9 ± 1.7 (64)	6.8 ± 1.4 (58)	8.2 ± 1.4 (42)
Poids des tiques gorgées (mg)	196.8 ± 106.1 (41)	81.2 ± 80.8 (50)	64.2 ± 52.5 (64)	58.6 ± 50.7 (58)	84.2 ± 51.6 (42)
Nutrition perturbée (tiques <100 mg)	26.8% (11)	66.0% (34)	78.1% (60)	81.0% (47)	66.7% (28)
Fréquence de pontes (%)	78.0% (32)	38.0% (19)	31.3% (20)	31.0% (18)	35.7% (14)
Temps de préoviposition (jours)	9.7 ± 2.7 (32)	14.4 ± 5.9 (19)	9.4 ± 2.2 (20)	11.1 ± 5.8 (18)	19.0 ± 6.3 (14)
Poids des pontes (mg)	81.9 ± 62.8 (27)	13.2 ± 13.1 (19)	19.3 ± 15.9 (20)	24.7 ± 24.4 (18)	8.4 ± 6.3 (14)
Rendement de ponte	0.37 ± 0.13 (27)	0.15 ± 0.11 (19)	0.18 ± 0.10 (20)	0.21 ± 0.13 (18)	0.10 ± 0.06 (14)
Fréquence d'éclosion (%)	87.6% (28)	47.4% (9)	85.0% (17)	77.8% (14)	ND

Inf-5 (n=2)	1ère infestation	2ème infestation	3ème infestation	4ème infestation	5ème infestation
Temps de gorgement (jours)	6.7 ± 0.6 (10)	6.8 ± 1.2 (10)	7.3 ± 1.5 (10)	6.3 ± 0.8 (7)	7.7 ± 0.7 (10)
Poids des tiques gorgées (mg)	177.6 ± 133.8 (10)	141.5 ± 123.1 (10)	126.9 ± 78.6 (10)	95.0 ± 68.6 (7)	128.4 ± 91.9 (10)
Nutrition perturbée (tiques <100 mg)	40.0% (4)	50.0% (5)	40.0% (4)	71.4% (5)	30.0% (3)
Fréquence de pontes (%)	40.0% (4)	50.0% (5)	60.0% (6)	28.6% (2)	50.0% (5)
Temps de préoviposition (jours)	12.8 ± 2.8 (4)	10.4 ± 14.0 (5)	8.9 ± 3.1 (6)	10.5 ± 3.5 (2)	20.8 ± 5.2 (4)
Poids des pontes (mg)	82.3 ± 76.8 (4)	64.8 ± 72.4 (5)	68.2 ± 38.6 (6)	26.0 ± 7.1 (2)	29.8 ± 27.5 (5)
Rendement de ponte	0.28 ± 0.13 (4)	0.29 ± 0.18 (5)	0.35 ± 0.12 (6)	0.27 ± 0.08 (2)	0.14 ± 0.07 (5)
Fréquence d'éclosion (%)	76.0% (3)	80.0% (4)	83.3% (5)	50.0% (1)	ND

Inf-16 (n=2) #	1ère infestation	2ème infestation	3ème infestation	4ème infestation	5ème infestation
Temps de gorgement (jours)	6.6 ± 0.7 (16)	7.4 ± 1.4 (27)	7.0 ± 1.0 (14)	6.8 ± 0.9 (15)	6.9 ± 1.7 (14)
Poids des tiques gorgées (mg)	189.6 ± 101.1 (16)	143.0 ± 97.7 (27)	127.2 ± 94.4 (14)	43.0 ± 37.6 (15)	24.7 ± 24.6 (14)
Nutrition perturbée (tiques <100 mg)	26.0% (4)	40.7% (11)	42.9% (8)	93.3% (14)	100% (14)
Fréquence de pontes (%)	50.0% (8)	77.8% (21)	42.9% (6)	13.3% (2)	7.1% (1)
Temps de préoviposition (jours)	9.4 ± 2.7 (8)	10.8 ± 3.9 (21)	9.6 ± 2.4 (6)	10.0 ± 0.0 (2)	22.0 (1)
Poids des pontes (mg)	93.4 ± 27.1 (7)	66.6 ± 49.6 (21)	63.0 ± 49.9 (8)	9.0 ± 6.7 (2)	6.0 (1)
Rendement de ponte	0.39 ± 0.08 (7)	0.31 ± 0.15 (21)	0.31 ± 0.11 (6)	0.11 ± 0.04 (2)	0.07 (1)
Fréquence d'éclosion (%)	87.6% (7)	81.0% (17)	83.3% (5)	50.0% (1)	ND

N.D.: Non déterminé
 n: nombre de lapins
 Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± écarts-types (s.-l.)
 #: un lapin mort après la 2ème infestation
 (:): nombre de tiques

Tableau 2: Expérience préliminaire. Biologie des tiques

3.1.1.2.1. Groupe *Inf-25*

Dès la seconde infestation, le poids de gorgement, ainsi que le poids, le rendement et la fréquence de ponte, diminuent fortement ($p < 0.001$ par rapport à la première infestation). Dans un même temps, le pourcentage de tiques pesant moins de 100mg augmente significativement ($p < 0.001$). Lors des deux infestations suivantes, l'effet de la résistance s'accroît encore légèrement, mais plus de manière significative si l'on compare ces résultats avec ceux de la seconde infestation. En cinquième infestation, seuls le poids et le rendement de ponte diminuent encore. Les tiques sont plus nombreuses à pondre, et leur poids de gorgement est significativement plus élevé par rapport à celui des infestations 3 et 4 ($p < 0.05$). L'embryogenèse semble peu perturbée par le développement de la résistance: la fréquence d'éclosion des pontes n'est diminuée significativement qu'en seconde infestation ($p < 0.01$).

Un allongement progressif du temps de gorgement est observé. Le repas sanguin de cinquième infestation est plus long que tous les autres ($p < 0.001$). Le temps de préoviposition est plus variable, mais suit la même tendance.

3.1.1.2.2. Groupe *Inf-5*

En raison du peu de tiques récoltées au cours des cinq infestations et de la variabilité des résultats (voir écarts-types), aucune modification statistique des paramètres de leur biologie n'est mise en évidence. Cependant, une diminution progressive du poids de gorgement et du poids des pontes, toutefois moins prononcée que dans le groupe *Inf-25*, est observée jusqu'en quatrième infestation. A la cinquième, ces deux paramètres augmentent à nouveau légèrement. Le rendement et la fréquence de ponte, de même que les temps de gorgement et de préoviposition subissent des variations irrégulières au cours des infestations, sans véritable tendance générale.

3.1.1.2.3. Groupe *Inf-15*

Il faut attendre la quatrième infestation pour observer une diminution significative du poids des tiques gorgées, accompagné d'une augmentation du nombre d'ectoparasites de moins de 100mg ($p < 0.01$ par rapport aux infestations 1, 2 et 3). Le poids et le rendement de ponte régressent également, mais pas de manière significative. Un des deux lapins étant mort après la seconde infestation, le nombre de tiques récoltées n'est plus suffisant pour analyser statistiquement les résultats. La fréquence de ponte, tout d'abord anormalement basse, remonte en seconde infestation, puis diminue significativement jusqu'à la fin de l'expérience ($p < 0.05$). Comme dans le groupe *Inf-5*, les temps de gorgement et de préoviposition subissent des variations sans qu'il soit possible d'établir une véritable tendance.

N.B. Pour les groupes *Inf-5* et *Inf-15*, la fréquence d'éclosion des pontes de quatrième infestation n'est pas considérée dans l'examen des effets de la résistance sur la biologie des tiques, vu le très petit nombre d'ectoparasites concernés (un par groupe).

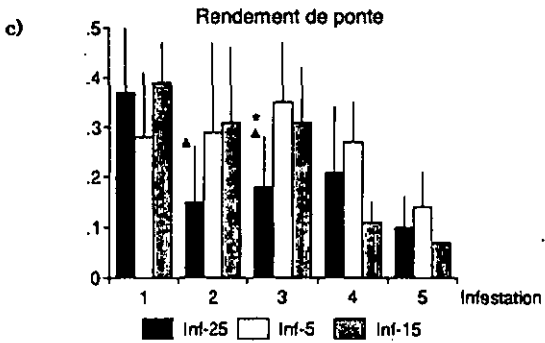
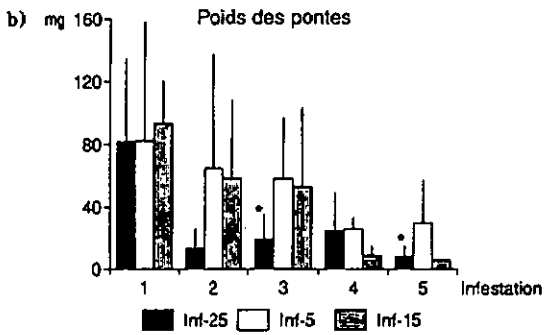
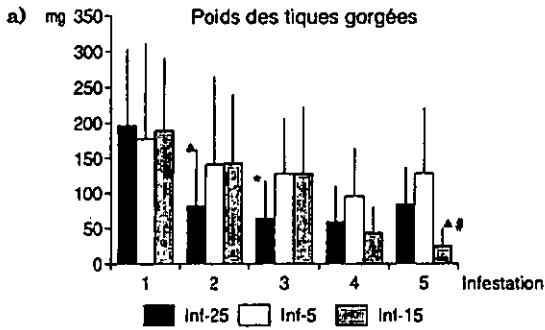


Figure 3: Expérience préliminaire. Comparaison entre les groupes expérimentaux de différents paramètres de la biologie des tiques (moyennes ± éc.-t.)

- * p<0.05 entre Inf-25 et Inf-5
- ▲ p<0.05 entre Inf-25 et Inf-15
- # p<0.05 entre Inf-5 et Inf-15

3.1.1.2.4. Comparaison de résistance entre les trois groupes expérimentaux

Trois paramètres de la biologie des tiques, qui reflètent particulièrement le degré de résistance acquise par les hôtes, vont servir à la comparaison des groupes Inf-25, Inf-5 et Inf-15: le poids des tiques gorgées (figure 3a), le poids des pontes (figure 3b) et le rendement de ponte (figure 3c).

La résistance chez les lapins Inf-25 se manifeste, au niveau des paramètres examinés, dès la seconde infestation déjà. L'acquisition d'une protection contre les tiques semble donc beaucoup plus rapide dans ce groupe que chez les lapins Inf-15, puisqu'il faut attendre la quatrième infestation pour observer une diminution significative de ces paramètres. Quant au groupe Inf-5, les perturbations de la biologie des tiques restent faibles, même après cinq infestations.

Si l'on compare les traitements de manière globale par analyse de variance, les résultats obtenus pour le groupe Inf-25 sont significativement différents du groupe Inf-5 pour les trois paramètres considérés ($p < 0.05$). Les groupes Inf-25 et Inf-15 diffèrent également au niveau de l'évolution du poids et du rendement de ponte ($p < 0.001$), alors que les groupes Inf-15 et Inf-5 ne sont pas statistiquement différents. En fait, le groupe Inf-15 semble développer un degré de résistance intermédiaire par rapport à ceux des groupes Inf-25 et Inf-5.

3.1.1.3. Sérologie

Au cours de l'expérience, la production d'anticorps IgG contre l'EGS (figure 4a, page suivante) augmente progressivement dans les trois groupes expérimentaux. Les titres sont en général plus élevés chez les lapins Inf-25 et Inf-15 que dans le groupe Inf-5. Cependant, en raison du petit nombre d'animaux utilisés et d'une réponse plutôt hétérogène au sein d'un même groupe (figure 4b), toute conclusion reste prématurée.

La tendance semble toutefois être confirmée par les titres d'anticorps IgG contre l'ET qui sont également les plus élevés (en moyenne) dans le groupe Inf-25 (figure 5a, page suivante). Pris individuellement (figure 5b), les lapins Inf-25 sont les animaux répondant le mieux contre cet extrait antigénique. La charge parasitaire pourrait donc influencer la production d'anticorps contre les tiques.

3.1.2. Infestations en continu

3.1.2.1. Remarques générales

En complément à l'expérience préliminaire, un autre modèle expérimental est testé, associant l'effet d'infestations nombreuses et rapprochées (tous les six jours) avec celui d'une très faible charge parasitaire (trois couples d'adultes par infestation). Ce modèle assure une présence continue des tiques sur leurs hôtes pendant une durée de deux mois. Il permet de vérifier si le rapprochement et l'augmentation du nombre des infestations peut compenser la dose très faible d'antigènes injectés, et induire chez l'hôte le développement d'une résistance.

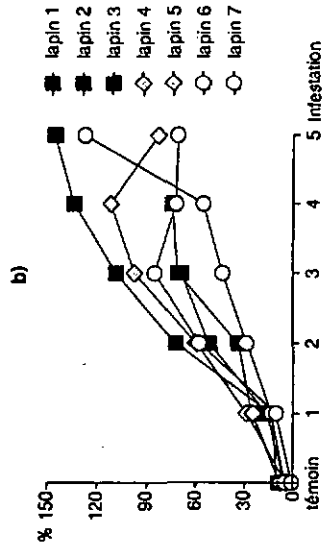
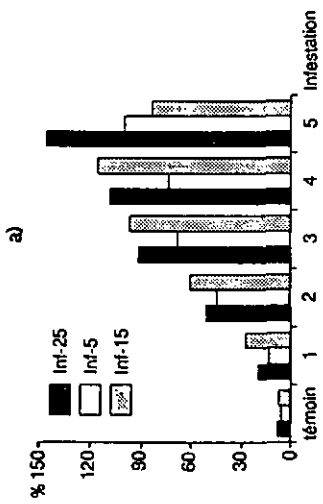


Figure 4: Titres d'anticorps IgG anti-EGS mesurés par ELISA
 a) moyennes
 b) résultats individuels: ■ Inf-25 □ Inf-5 ▨ Inf-15

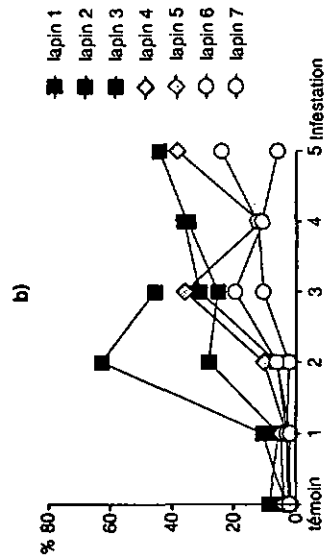
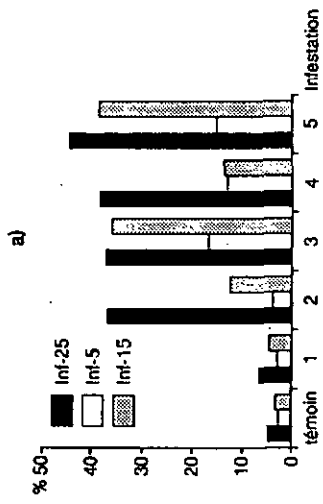


Figure 5: Titres d'anticorps IgG anti-ET mesurés par ELISA
 a) moyennes
 b) résultats individuels: ■ Inf-25 □ Inf-5 ▨ Inf-15

3.1.2.2. Biologie des tiques

Sur les trois lapins expérimentés, deux sont morts après la huitième infestation. Les résultats de la biologie des tiques sont présentés dans le tableau 3 (page suivante), en négligeant les deux dernières infestations. Le nombre d'échantillons n'est pas assez grand pour permettre une analyse statistique mais il reste suffisant pour quelques considérations.

Les lapins soumis à ce régime expérimental ne parviennent pas à développer une résistance affectant de manière durable la biologie des tiques. Les infestations répétées et rapprochées ne suffisent pas à compenser la trop faible dose d'antigènes injectés. Si la moyenne du poids de gorgement diminue progressivement jusqu'en troisième infestation, elle remonte brusquement à l'infestation suivante (figure 6, page 30). Cette soudaine augmentation s'observe à nouveau à l'infestation six. Les autres paramètres de la biologie des tiques varient également de manière cyclique d'une infestation à l'autre, et cela indépendamment du poids des tiques.

La moyenne du poids des tiques de première infestation nous semble particulièrement basse (151.8mg) en comparaison de celles obtenues lors de l'expérience préliminaire (196.8mg pour Inf-25, 177.5mg pour Inf-5 et 189.5mg pour Inf-15) (tableau 2). La quantité de sang ingérée par les tiques lors d'un repas sur un lapin indemne serait tributaire du nombre d'ectoparasites infestant cet animal. Ainsi une infestation massive de vingt-cinq paires de tiques semble plus favorable à un repas sanguin copieux qu'une faible infestation avec trois ou cinq couples.

N.B. Les lapins semblent plus dérangés par le port du large collier de plastic prévenant le grattage pendant une période continue de deux mois, que par les tiques elles-mêmes. En effet, si les lapins passent leur temps à essayer de se débarrasser de leur collier, ils ne cherchent généralement pas à éliminer les tiques en train de se nourrir. Ce collier constitue vraisemblablement un stress permanent, car il limite l'animal dans ses mouvements. Sa présence sur une aussi longue période pourrait avoir un effet néfaste sur l'état de santé générale de l'hôte (Glaser *et al.*, 1987). Deux lapins sont morts après huit infestations, ils étaient dans un état cachectique.

3.1.2.3. Sérologie

Une production d'anticorps contre l'EGS (figure 7a, page 30) est décelée après vingt jours d'expérience (soit au cours de la quatrième infestation), et après trente jours pour l'ET (figure 7b; pendant la cinquième infestation). Les titres augmentent progressivement avec le temps et semblent comparables, après soixante jours, à ceux obtenus lors des deux premières infestations pour les groupes de l'expérience préliminaire (3.1.1.3.). Une stimulation continue avec une faible dose d'antigènes semble aussi efficace à induire une réponse humorale chez le lapin, qu'une stimulation limitée dans le temps avec une grande quantité d'antigènes. Cependant, comme le montrent les résultats de la biologie des tiques, un titre d'anticorps anti-tiques relativement élevé ne suffit pas, à lui seul, à assurer une protection efficace de l'hôte.

Inf-cont (n=3)	1ère infestation	2ème infestation	3ème infestation	4ème infestation
Temps de gorgement (jours)	7.1 ± 0.4 (6)	6.3 ± 1.2 (8)	5.9 ± 0.6 (7)	6.6 ± 1.3 (10)
Poids des tiques gorgées (mg)	151.8 ± 117.8 (6)	102.4 ± 81.6 (8)	79.3 ± 58.5 (7)	109.0 ± 97.7 (10)
Nutrition perturbée (tiques <100 mg)	50.0% (3)	50.0% (4)	57.1% (4)	60.0% (6)
Fréquence de ponte (%)	83.3% (5)	37.5% (3)	57.1% (4)	60.0% (6)
Temps de préoviposition (jours)	10.6 ± 2.8 (5)	11.6 ± 2.8 (3)	9.9 ± 2.6 (4)	9.8 ± 3.9 (6)
Poids des pontes (mg)	59.0 ± 72.4 (5)	20.0 ± 26.1 (3)	45.8 ± 30.7 (4)	60.8 ± 43.1 (6)
Rendement de ponte	0.24 ± 0.23 (5)	0.21 ± 0.19 (3)	0.35 ± 0.17 (4)	0.32 ± 0.14 (6)
Fréquence d'éclosion des pontes (%)	60.0% (3)	66.0% (2)	75.0% (3)	100% (6)

Inf-cont (suite)	5ème infestation	6ème infestation	7ème infestation	8ème infestation
Temps de gorgement (jours)	6.8 ± 1.8 (6)	6.3 ± 1.1 (6)	8.4 ± 2.1 (8)	7.2 ± 0.6 (7)
Poids des tiques gorgées (mg)	63.8 ± 46.2 (6)	136.0 ± 75.5 (5)	101.8 ± 40.4 (8)	89.9 ± 49.7 (7)
Nutrition perturbée (tiques <100 mg)	66.7% (4)	33.3% (2)	37.5% (3)	57.1% (4)
Fréquence de ponte (%)	33.3% (2)	83.3% (5)	87.5% (7)	71.4% (5)
Temps de préoviposition (jours)	16.0 ± 7.8 (2)	9.3 ± 1.9 (6)	9.1 ± 1.8 (7)	9.5 ± 1.5 (5)
Poids des pontes (mg)	17.0 ± 21.2 (2)	36.7 ± 9.6 (3)	25.0 ± 15.9 (7)	29.0 ± 14.9 (5)
Rendement de ponte	0.17 ± 0.13 (2)	0.28 ± 0.16 (3)	0.23 ± 0.10 (7)	0.25 ± 0.07 (5)
Fréquence d'éclosion des pontes (%)	50.0% (1)	80.0% (4)	71.4% (5)	40.0% (2)

(): nombre de tiques

#: deux lapins sont morts

Moyennes ± éc.-t. ou %
n: nombre de lapins

Tableau 3: Infestations en continu. Biologie des tiques

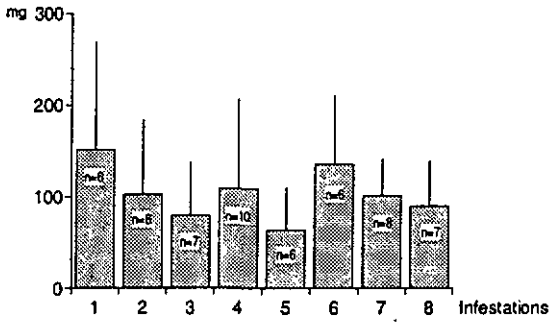


Figure 6: Infestations en continu. Moyennes \pm éc.-t. du poids des tiques gorgées.
n: nombre de tiques

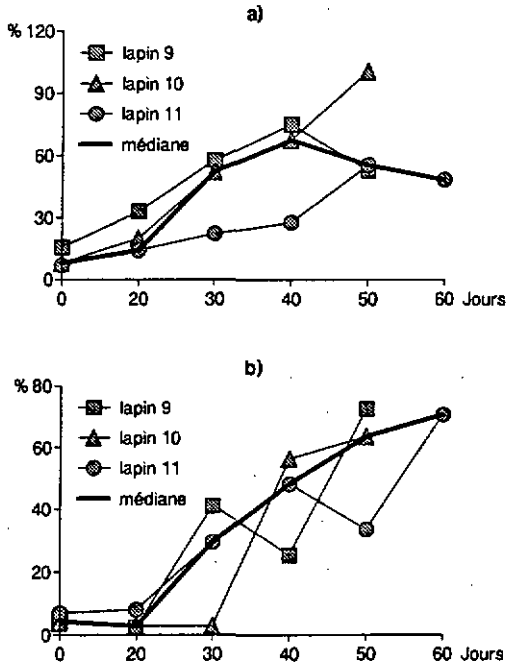


Figure 7: Titres d'anticorps IgG mesurés par ELISA
a) anticorps anti-EGS
b) anticorps anti-ET

	1ère infestation		2ème infestation		3ème infestation	
	25 tiques/lapin (n=7)	25 tiques/lapin (n=7)	25 tiques/lapin (n=7)	25 tiques/lapin (n=7)	15 tiques/lapin (n=3)#	15 tiques/lapin (n=3)#
Inf-25						
Temps de gorgement (jours)	6.9 ± 0.8 (165)	a 7.4 ± 1.8 (155)	c 107.1 ± 79.2 (42)	c 107.1 ± 79.2 (42)	c 7.6 ± 1.3 (42)	c 7.6 ± 1.3 (42)
Poids des tiques gorgées	210.6 ± 102.9 (165)	21.8% (36)	c 60.0% (93)	c 60.0% (93)	c 69.2% (25)	c 69.2% (25)
Nutrition perturbée (tiques <100 mg)	82.4% (138)	c 54.8% (85)	e 78.8% (33)	e 78.8% (33)	e 78.8% (33)	e 78.8% (33)
Fréquences de ponte (%)	11.0 ± 3.7 (136)	a 13.0 ± 6.3 (85)	c,e 9.1 ± 3.0 (33)	c,e 9.1 ± 3.0 (33)	c 44.6 ± 41.6 (33)	c 44.6 ± 41.6 (33)
Temps de préoviposition (jours)	93.2 ± 61.2 (136)	c 42.0 ± 35.9 (85)	c 0.28 ± 0.13 (85)	c 0.28 ± 0.13 (85)	c 0.28 ± 0.13 (33)	c 0.28 ± 0.13 (33)
Poids des pontes (mg)	0.37 ± 0.13 (136)	b 55.3% (47)	d 84.9% (28)	d 84.9% (28)	d 84.9% (28)	d 84.9% (28)
Rendement de ponte	75.0% (102)					
Fréquences d'éclosion des pontes (%)						

	1ère infestation		2ème infestation		3ème infestation	
	6 tiques/lapin (n=7)	6 tiques/lapin (n=7)	5 tiques/lapin (n=7)	5 tiques/lapin (n=7)	15 tiques/lapin (n=5)	15 tiques/lapin (n=5)
Inf-5						
Temps de gorgement (jours)	6.6 ± 0.9 (34)**	b 8.7 ± 1.4 (30)*	c 63.8 ± 78.3 (69)***	c 63.8 ± 78.3 (69)***	c 6.5 ± 1.7 (69)***	c 6.5 ± 1.7 (69)***
Poids des tiques gorgées	170.1 ± 119.4 (34)	b 92.4 ± 96.7 (30)	c 81.2% (56)*	c 81.2% (56)*	c 81.2% (56)*	c 81.2% (56)*
Nutrition perturbée (tiques <100 mg)	35.3% (12)	c 70.0% (21)	a 47.8% (33)***	a 47.8% (33)***	a 47.8% (33)***	a 47.8% (33)***
Fréquences de ponte (%)	73.6% (25)	14.6 ± 8.7 (16)	b 11.2 ± 3.1 (33)**	b 11.2 ± 3.1 (33)**	b 11.2 ± 3.1 (33)**	b 11.2 ± 3.1 (33)**
Temps de préoviposition (jours)	11.0 ± 3.1 (25)	48.2 ± 40.9 (16)	b 32.2 ± 35.8 (33)	b 32.2 ± 35.8 (33)	b 32.2 ± 35.8 (33)	b 32.2 ± 35.8 (33)
Poids des pontes (mg)	73.9 ± 69.0 (25)	0.27 ± 0.16 (18)	b 0.25 ± 0.14 (33)	b 0.25 ± 0.14 (33)	b 0.25 ± 0.14 (33)	b 0.25 ± 0.14 (33)
Rendement de ponte	0.34 ± 0.14 (25)	75.0% (12)	72.7% (24)	72.7% (24)	72.7% (24)	72.7% (24)
Fréquences d'éclosion des pontes (%)	78.0% (19)					

Moyennes ± éc.-t. ou %.

(): nombre total de tiques

n: nombre de lapins

#: sur les cinq lapins utilisés, deux sont morts pendant l'infestation

a: p<0.05; b: p<0.01; c: p<0.001; entre 1ère infestation

et infestations 2 ou 3

d: p<0.01; e: p<0.001; entre 2ème et 3ème infestation

*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001; entre inf-25 et inf-5

Tableau 4: Biologie des tiques

3.1.3. Commentaire intermédiaire

Ces deux expériences permettent de définir les deux modèles expérimentaux recherchés:

- a) Un modèle produisant rapidement des animaux fortement résistants: Inf-25.
- b) Un modèle aboutissant à des lapins ne présentant pas ou peu de signes de résistance: Inf-5 et Inf-cont.

Le modèle Inf-cont n'est pas retenu en raison des problèmes engendrés par le collier anti-grattage, et par souci d'uniformiser au maximum les protocoles expérimentaux. Les modèles choisis font varier la charge parasitaire, et non pas le nombre des infestations. Cela constitue un avantage car la durée des expériences peut être ainsi relativement courte. Le degré de résistance des groupes Inf-25 et Inf-5 est déjà bien différencié lors d'une seconde infestation des lapins.

Un examen plus poussé de ces deux modèles va être effectué avec un plus grand nombre d'animaux. L'influence de la charge parasitaire sera non seulement examinée sur la réponse humorale des hôtes, mais aussi sur leur réponse cellulaire.

3.1.4. Modulation de la réponse cellulaire et humorale du lapin par deux niveaux d'infestation différents, et conséquences sur le développement de la résistance (Schorderet et Brossard, 1993a)

3.1.4.1. Biologie des tiques (tableau 4)

3.1.4.1.1. Groupe Inf-25

En seconde infestation, la résistance développée par les lapins affecte significativement tous les paramètres de la biologie des tiques mesurés dans cette expérience. Le poids de gorgement, le poids et le rendement de ponte, ainsi que les fréquences de ponte et d'éclosion diminuent significativement (voir tableau pour les valeurs de p). Parallèlement, les temps de gorgement et de préoviposition sont prolongés et le nombre d'ectoparasites pesant moins de 100mg s'accroît.

À la troisième infestation, la situation évolue en faveur des tiques. Elles sont en moyenne plus grosses au détachement et pondent plus d'oeufs. Une augmentation significative des fréquences de ponte et d'éclosion ramène ces valeurs au niveau de celles observées lors de la première infestation.

3.1.4.1.2. Groupe Inf-5

Lors de la seconde infestation, seuls deux paramètres (poids des tiques gorgées et tiques de moins de 100mg) diminuent significativement en comparaison des valeurs observées en première infestation. La ponte (fréquence, poids et rendement) est légèrement perturbée.

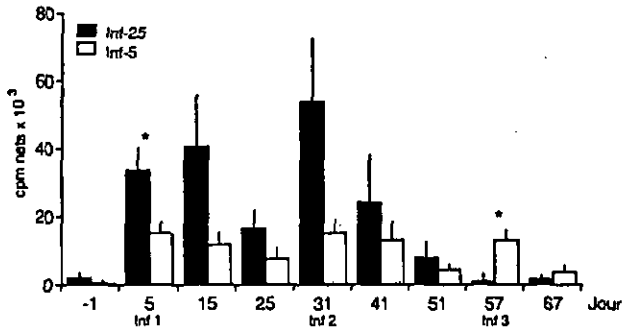


Figure 8: Transformation lymphoblastique. Réponse à l'EGS
Moyennes \pm erreurs standards (SE) * $p < 0.05$

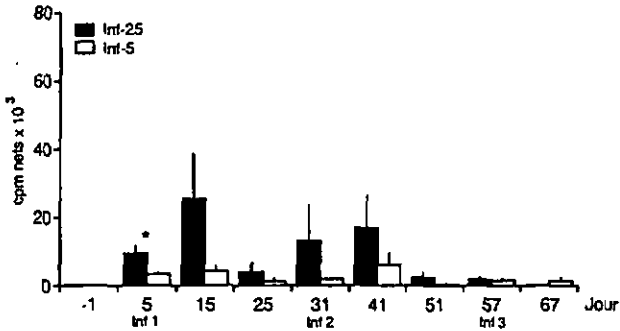


Figure 9: Transformation lymphoblastique. Réponse à l'ET.
Moyennes \pm SE * $p < 0.01$

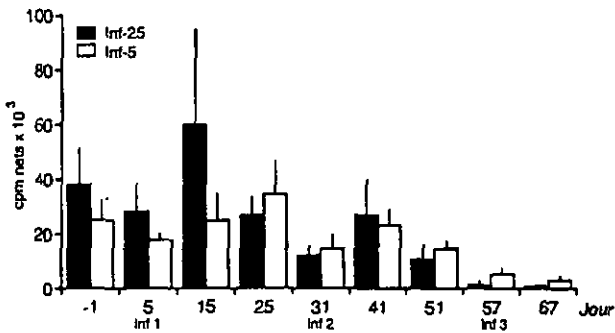


Figure 10: Transformation lymphoblastique. Réponse à la conA
Moyennes \pm SE

En troisième infestation, la résistance des lapins se renforce et affecte significativement presque tous les paramètres. Le temps de gorgement et la fréquence d'éclosion des pontes ne sont pas modifiés dans ce groupe.

3.1.4.1.3. *Comparaison de résistance entre les modèles Inf-25 et Inf-5*

Les résultats de la première infestation sont comparables entre les deux groupes, à l'exception du temps de gorgement, qui restera significativement plus court dans le groupe Inf-5 durant toute l'expérience. En deuxième infestation, la résistance des lapins Inf-25 semble plus forte que dans le groupe Inf-5, même si aucune différence statistique n'est observée. La ponte surtout (poids, rendement et fréquence d'éclosion) est plus perturbée dans le groupe Inf-25. En troisième infestation, la situation s'inverse. Les tiques gorgées sur les lapins Inf-5 sont significativement plus petites et sont beaucoup moins nombreuses à pondre que celles nourries sur les lapins Inf-25. Le poids et le rendement de ponte sont également plus bas dans le groupe Inf-5.

3.1.4.2. Réponse cellulaire des lapins: analyse par transformation lymphoblastique

3.1.4.2.1. *Réponse à l'EGS (figure 8)*

Dès la première infestation (jour 5), la prolifération des lymphocytes en présence d'EGS est significative dans les deux groupes de lapins, en comparaison du test effectué avant le début de l'expérience (jour -1; $p < 0.001$). Elle le reste jusqu'aux jours 51 pour le groupe Inf-25, et 57 pour le groupe Inf-5 (au moins $p < 0.05$ par rapport au jour -1). La réponse lymphocytaire est globalement plus élevée chez les lapins du groupe Inf-25 ($p < 0.05$). Cependant, un examen plus détaillé des résultats révèle que la prolifération des lymphocytes des lapins Inf-25 n'est meilleure, par rapport au groupe Inf-5, que pendant les deux premières infestations (jusqu'au jour 51). La différence entre les deux groupes est la plus nette au jour 5 ($p < 0.05$, test t), alors que les tiques sont en train de se nourrir.

À la troisième infestation (jour 57), les lymphocytes des lapins Inf-25 ne semblent plus réagir en présence d'EGS. La prolifération lymphocytaire est alors significativement plus élevée dans le groupe Inf-5 ($p < 0.05$, test t).

3.1.4.2.2. *Réponse à l'ET*

Les résultats avec cet extrait antigénique sont en moyenne inférieurs à ceux obtenus avec l'EGS.

Dans les deux groupes (figure 9), une prolifération des lymphocytes est observée dès le jour 5, et demeure significative jusqu'au jour 41 ($p < 0.01$). Dès le jour 51, la réponse dans les deux groupes ne diffère plus de celle mesurée au jour -1.

Les lymphocytes des lapins du groupe Inf-25 répondent globalement mieux à l'ET que ceux des lapins Inf-5 ($p < 0.01$). Comme précédemment, la différence entre les groupes est particulièrement nette pendant la première infestation (jour 5; $p < 0.01$, test t).

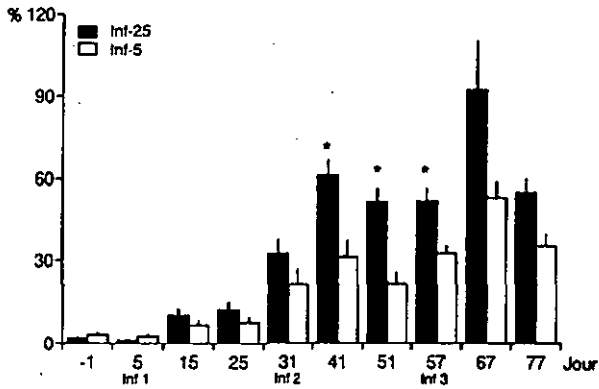


Figure 11: Anticorps IgG anti-EGS mesurés par ELISA
Moyennes \pm SE * $p < 0.01$, test t

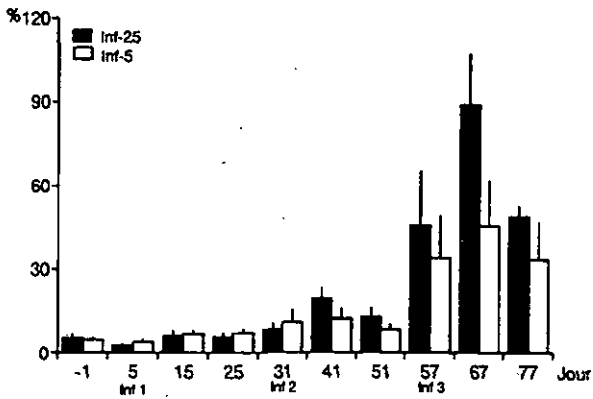


Figure 12: Anticorps IgG anti-ET mesurés par ELISA
Moyennes \pm SE

3.1.4.2.3. Réponse à la *conA* (figure 10, page précédente)

Les lymphocytes des lapins des deux groupes se comportent de manière semblable face à ce mitogène.

Lors des deux premières infestations (jours 5 et 31), une légère diminution de la réponse à la *conA* est observée, disparaissant après le détachement des tiques.

En troisième infestation, il se produit une baisse significative de la prolifération ($p < 0.01$ par rapport au reste de l'expérience), qui cette fois n'est plus compensée après la fin du repas des ectoparasites.

3.1.4.3. Sérologie

3.1.4.3.1. Réponse anticorps contre l'EGS

Une production d'IgG dirigée contre des antigènes de l'EGS est décelée dans les deux groupes dès le jour 15 de l'expérience (figure 11). Chaque réinfestation des lapins provoque une augmentation des titres d'anticorps, atteignant un maximum 15 jours après la pose des tiques (jours 41 et 67). Au jour 67, ils sont neuf à onze fois plus élevés que ceux mesurés après une infestation ($p < 0.001$, dans les deux groupes). Durant toute l'expérience, la production d'anticorps anti-EGS est significativement plus importante chez les lapins du groupe Inf-25 que dans le groupe Inf-5 ($p < 0.001$). Les différences les plus nettes, dues sans doute à une meilleure homogénéité de la réponse au sein de chaque groupe, sont observées après la deuxième infestation, des jours 41 à 57 ($p < 0.01$, test *t*).

3.1.4.3.2. Réponse anticorps contre l'ET

Dans les deux groupes, une légère augmentation des titres est observée après la seconde infestation (jour 41, figure 12). Cependant, la production d'IgG contre l'ET ne devient significative qu'après une troisième infestation, atteignant un pic au jour 67 ($p < 0.001$). La réponse humorale des lapins contre l'ET n'est pas aussi homogène dans les groupes que celle observée pour l'EGS. Ainsi, les différences obtenues ne sont pas statistiques, bien que la production moyenne d'anticorps soit toujours plus élevée chez les lapins du groupe Inf-25.

3.1.5. Discussion

Celle-ci concerne principalement les résultats de la dernière expérience décrite (3.1.4.), qui sont les plus complets. Les lapins des deux modèles testés, Inf-25 et Inf-5, deviennent résistants. Les tiques récoltées en réinfestation présentent, dans les deux groupes, des perturbations souvent importantes de leur développement. Dans l'expérience préliminaire (3.1.1.), où les hôtes subissaient cinq infestations successives avec 5 ou 25 couples, la biologie des tiques nourries sur les lapins Inf-5 n'était presque pas altérée après trois infestations. La différence de résistance entre les deux modèles était alors bien marquée. Elle paraît maintenant moins évidente.

Plusieurs hypothèses, non exclusives, peuvent expliquer le resserrement des résultats dans l'expérience 3.1.4.:

a) Les modèles Inf-25 et Inf-5 sont un peu différents de l'expérience 3.1.1. La troisième infestation est effectuée avec 15 paires de tiques pour les deux groupes (au lieu de 25 et 5 lors de l'expérience préliminaire). Pour le groupe Inf-25, la stimulation antigénique est moins forte que dans l'expérience 3.1.1, ce qui pourrait expliquer une réponse plus faible de la part des hôtes. La situation est inverse pour le groupe Inf-5. En troisième infestation, la quantité d'antigènes injectée est plus grande et pourrait stimuler davantage le système immunitaire des lapins.

b) Le nombre de prises de sang par infestation est plus grand que dans l'expérience préliminaire (quatre prises au lieu d'une seule). Cette différence de traitement pénalise surtout les lapins Inf-25. Une baisse de résistance, observée à la cinquième infestation dans l'expérience 3.1.1., apparaît cette fois au troisième contact avec les ectoparasites. Les fréquences de ponte et d'éclosion reviennent à leurs valeurs de première infestation et le repas sanguin est facilité.

Dans une étude effectuée avec des lapins infestés par des adultes d'*Amblyomma hebraeum*, Rechav *et al.* (1980) notent chez les hôtes des phénomènes d'anémie et d'anorexie, liés à la présence des tiques, et dépendants de la charge parasitaire. En ce qui nous concerne, l'anémie n'a pas été constatée, mais les lapins Inf-25 ont souvent été anorexiques pendant les infestations, avec une tendance à perdre du poids.

Les nombreux prélèvements de sang, ajoutés à une lourde charge parasitaire, peuvent être à l'origine de l'affaiblissement plus rapide de la réponse des lapins Inf-25. Le régime "25 tiques couplé avec 4 prises de sang/infestation" semble particulièrement éprouvant, puisque deux lapins n'ont pas survécu.

L'influence de la charge parasitaire sur l'immunité anti-tiques reste cependant évidente, surtout si l'on considère la cinétique de son développement. La résistance est très rapide à s'établir dans le groupe Inf-25, où tous les paramètres de la biologie des tiques sont significativement perturbés dès la seconde infestation. Un seul contact avec les ectoparasites suffit à ces lapins pour devenir fortement résistants. Dans le groupe Inf-5, seul le poids de gorgement est diminué de manière significative à la deuxième infestation. Une forte résistance n'est exprimée qu'à la troisième infestation.

L'embryogenèse n'est jamais perturbée chez les tiques nourries sur les lapins Inf-5, alors que dans le groupe Inf-25, la fréquence d'éclosion des pontes est diminuée d'un tiers (et de 46% dans l'expérience préliminaire) à la seconde infestation. La charge parasitaire pourrait déterminer une telle perturbation du cycle des ectoparasites. En effet, chez des lapins infestés par 10 couples de l'espèce *I. ricinus*, une baisse du pourcentage d'éclosion des pontes est observée plus tardivement, à la troisième (Girardin et Brossard, 1990) ou à la quatrième infestation seulement (Bowessidjaou *et al.*, 1977).

Le test de transformation lymphoblastique confirme les observations d'autres auteurs (Wikel *et al.*, 1978; Wikel et Osburn, 1982) concernant la capacité d'un EGS à stimuler les lymphocytes de la circulation périphérique d'animaux infestés. Les cellules sont capables de répondre significativement à l'antigène avant la fin du premier repas sanguin, même chez les lapins Inf-5. Une sensibilisation aussi précoce chez des bêtes faiblement parasitées ne semble pas être une généralité. Des lymphocytes de bovins infestés par 10 femelles et 5 mâles de l'espèce *D. andersoni* ne réagissent à l'EGS qu'après trois ou quatre infestations (Wikel et Osburn, 1982). Le rapport nombre de tiques par infestation/taille de l'hôte, qui est plus grand chez le lapin pourrait expliquer cette différence avec nos résultats. La stimulation antigénique serait plus faible chez les bovins que chez les lapins. D'autre part, l'intensité et le mode d'expression de la réponse peuvent aussi varier selon les espèces d'hôtes et de tiques considérées (Willadsen, 1980; Ribeiro, 1989).

Pendant les deux premières infestations, la réponse lymphocytaire à l'EGS est plus intense dans le groupe Inf-25 que dans le groupe Inf-5. Un plus grand nombre de cellules semble avoir été activées chez les lapins Inf-25. Il est intéressant de noter que la résistance contre les tiques est alors la plus forte dans ce groupe. A la troisième infestation, la situation change. Seuls les lymphocytes des lapins Inf-5 répondent encore significativement à l'EGS, ceux-ci étant d'ailleurs, à ce moment, les plus résistants.

Dans les deux groupes expérimentaux Inf-25 et Inf-5, la prolifération lymphocytaire en présence d'EGS est plus élevée pendant les infestations. En réponse aux antigènes salivaires injectés, les lymphocytes sensibilisés situés dans les ganglions lymphatiques drainant les sites de fixation des tiques sont sans doute mobilisés et circulent pour infiltrer ces zones (Brossard et Fivaz, 1982; Gill et Walker, 1985; Picker et Butcher, 1992). Ils seraient ainsi plus nombreux dans la circulation périphérique pendant le repas sanguin qu'après le détachement des ectoparasites.

Les résultats des tests de transformation lymphoblastique en présence de conA ne diffèrent pas significativement d'un groupe à l'autre. Une baisse de prolifération peut être constatée lorsque les tiques sont présentes sur l'hôte. Elle disparaît après le détachement des tiques, du moins pour les deux premières infestations. Wikel (1982c) avait déjà noté une diminution de la réponse à la conA chez des cobayes, au cours d'infestations par des adultes de l'espèce *D. andersoni*, et avait avancé l'idée d'un effet immunosuppresseur des tiques sur la réponse T-dépendante des hôtes. D'autres travaux signalent de tels phénomènes. La prolifération lymphocytaire en présence du mitogène phytohémagglutinine A (PHA) est fortement réduite chez des bovins infestés par *D. andersoni* (Wikel et Osburn, 1982) ou par *B. microplus* (Inokuma *et al.*, 1993). La réponse humorale de cobayes ou de bovins à des injections de globules rouges de mouton est diminuée lors d'infestations par *D. andersoni* ou *B. microplus* (Wikel, 1985; Inokuma *et al.*, 1993). La production d'anticorps par des lapins après l'inoculation d'albumine sérique de bovin est également abaissée chez des individus

infestés par *R. appendiculatus* (Fivaz, 1989). L'immunosuppression serait induite par un constituant de la salive des ectoparasites (Dickinson *et al.*, 1976; Ribeiro *et al.*, 1992), et faciliterait le repas sanguin, en particulier lors de réinfestations (Ribeiro *et al.*, 1985). La transmission d'agents pathogènes serait aussi favorisée (Wikel, 1985; Titus et Ribeiro, 1990).

Dans notre expérience, la baisse de prolifération lymphocytaire ne concerne que la stimulation par la conA. Il serait prématuré de conclure à une immunosuppression directe. Les tiques pourraient induire une modification des sous-populations de lymphocytes périphériques (Westermann et Pabst, 1990), qui ne répondent pas toutes avec la même intensité à ce mitogène (Belden et Strelkauskas, 1981). De plus, une diminution du nombre de monocytes circulants, la présence de prostaglandines de type E ou de complexes antigènes-anticorps plasmatiques, sont aussi décrits comme des inhibiteurs de la réponse lymphocytaire périphérique à la conA (Hume et Weidemann, 1980).

En troisième infestation, la prolifération lymphocytaire chute de manière générale, tant face au mitogène qu'aux antigènes EGS et ET, particulièrement dans le groupe Inf-25. Parallèlement, ce groupe subit une baisse de résistance importante, exprimée par l'amélioration de la biologie des tiques. La quantité massive d'antigènes injectés et le prélèvement de grandes quantités de sang pourraient provoquer à la longue un épuisement de la réponse lymphocytaire des lapins, aboutissant à un état d'immunotolérance.

La production d'anticorps IgG anti-EGS semble dépendre de la charge parasitaire. Les titres augmentent plus rapidement et atteignent des pics plus élevés chez les lapins Inf-25 que dans le groupe Inf-5. L'effet d'une stimulation plus intense de la réponse humorale, dû à un nombre plus élevé de tiques, avait déjà été constaté au cours de l'expérience préliminaire.

Le rôle protecteur de facteurs humoraux dans les phénomènes de résistance contre les tiques a souvent été examiné, notamment par des expériences de transfert d'immunsérums à des lapins indemnes (Brossard, 1977; Brossard et Girardin, 1979; Gill et Luckins, 1987; Rechav *et al.*, 1991). La protection conférée aux receveurs reste partielle en comparaison d'une résistance acquise après infestations, ce qui suggère la participation de mécanismes immunitaires cellulaires. Notre étude confirme cette hypothèse: en troisième infestation, les titres d'anticorps anti-EGS élevés des lapins Inf-25 sont insuffisants au maintien d'une protection optimale contre les ectoparasites. L'immunité à médiation cellulaire pourrait jouer un rôle prépondérant dans les relations hôte/tiques conduisant au développement de la résistance.

Les résultats des tests de transformation lymphoblastique et d'ELISA concernant l'ET sont moins spectaculaires que ceux observés pour l'EGS. Pourtant, les lymphocytes des lapins des deux groupes prolifèrent en présence d'ET dès la première infestation. La réponse est plus élevée chez les lapins Inf-25, elle est sans doute dépendante de la dose d'antigènes injectés dans l'hôte. La production d'anticorps anti-

ET est plus tardive que pour l'EGS (elle est détectée en troisième infestation seulement), et supérieure en moyenne chez les lapins Inf-25.

Le biais par lequel les lapins se sensibilisent à des antigènes tégumentaires n'est pas connu. Le tégument, en particulier celui des pièces buccales, est habituellement considéré comme un élément inerte, du point de vue antigénique; le rostre ne provoquerait de réaction inflammatoire que par son action mécanique sur la peau. L'ET utilisé dans notre expérience est un extrait brut. Une réaction croisée entre épitopes d'antigènes salivaires et tégumentaires est probable. Une réponse spécifique n'est cependant pas exclue, car l'ET est enrichi en une protéine tégumentaire de 25 kDa, qui possède une activité antigénique (Rutti et Brossard, 1989; Brossard *et al.*, 1991). Cette protéine est souvent mise en évidence par des sérums provenant de lapins fortement résistants (Bovet, 1987; Rutti *et al.*, 1988a, 1988b). Des anticorps ou une réponse cellulaire dirigés contre cette protéine pourraient perturber le développement du tégument des tiques (Rutti *et al.*, 1990; Rutti *et al.*, 1992), et participer ainsi aux mécanismes de résistance.

3.1.6. Conclusion

L'acquisition d'une immunité contre les tiques dépend du nombre des ectoparasites les infestant. Des lapins lourdement parasités développent rapidement une forte résistance; mais ils sont plus exposés à des substances immunosuppressives ou toxiques injectées par les tiques, et risquent l'épuisement de leur système immunitaire. Les lapins faiblement infestés parviennent à un degré équivalent de résistance, mais ont besoin de contacts plus nombreux avec les tiques. Ils ne présentent par contre, aucun affaiblissement de leur réponse immunitaire.

Des facteurs indépendants des ectoparasites peuvent avoir une influence sur le développement de l'immunité anti-tiques. Une augmentation du nombre de prises de sang par infestation entre les expériences 3.1.1. et 3.1.4. semble diminuer l'écart de résistance entre les modèles choisis.

3.2. Effets d'un traitement à l'IL-2 recombinante humaine sur l'acquisition de la résistance chez des lapins infestés, et sur leur réponse cellulaire et humorale contre les tiques (Schorderet et Brossard, 1993b)

3.2.1. Remarque générale

La lymphokine utilisée dans cette expérience est un recombinant de la molécule humaine, car l'IL-2 de lapin n'est pas encore commercialisée. Deux études récentes (Goldblum *et al.*, 1990; Marshall *et al.*, 1990) montrent que l'IL-2 humaine est

Lère infestation	TIL-2 (n=5)		CDir (n=5)		CRés (n=5)	
	5 tiques/lapin	5 tiques/lapin	5 tiques/lapin	5 tiques/lapin	25 tiques/lapin	25 tiques/lapin
Temps de gorgement (jours)	5.6 ± 1.6 (22)	6.7 ± 1.5 (24)	6.7 ± 1.5 (24)	7.0 ± 1.3 (125)	7.0 ± 1.3 (125)	7.0 ± 1.3 (125)
Poids des tiques gorgées (mg)	99.3 ± 102.6 (22)	171.6 ± 126.6 (24)	171.6 ± 126.6 (24)	180.3 ± 119.3 (125) **	180.3 ± 119.3 (125) **	180.3 ± 119.3 (125) **
Nutrition perturbée (tiques <100 mg)	58.2% (15)	41.7% (10)	41.7% (10)	32.6% (41) **	32.6% (41) **	32.6% (41) **
Fréquence de ponte (%)	50.0% (11)	70.8% (17)	70.8% (17)	73.6% (92) *	73.6% (92) *	73.6% (92) *
Poids des pontes (mg)	67.5 ± 65.3 (11)	89.5 ± 58.6 (17)	89.5 ± 58.6 (17)	83.2 ± 52.1 (92)	83.2 ± 52.1 (92)	83.2 ± 52.1 (92)
Rendement de ponte	0.30 ± 0.16 (11)	0.36 ± 0.15 (17)	0.36 ± 0.15 (17)	0.35 ± 0.14 (92)	0.35 ± 0.14 (92)	0.35 ± 0.14 (92)
Fréquence d'éclosion des pontes (%)	54.6% (6)	82.4% (14)	82.4% (14)	69.6% (64)	69.6% (64)	69.6% (64)
2ème infestation						
	25 tiques/lapin (n=5)	25 tiques/lapin (n=5)	25 tiques/lapin (n=5)	25 tiques/lapin (n=5)	25 tiques/lapin (n=3)#	25 tiques/lapin (n=3)#
Temps de gorgement (jours)	7.2 ± 1.7 (96)	7.3 ± 1.5 (96)	7.3 ± 1.5 (96)	7.6 ± 1.2 (65) *	7.6 ± 1.2 (65) *	7.6 ± 1.2 (65) *
Poids des tiques gorgées (mg)	a 55.7 ± 58.6 (96)	a 108.2 ± 102.7 (96) ***	a 108.2 ± 102.7 (96) ***	d 93.5 ± 80.3 (66) *****	d 93.5 ± 80.3 (66) *****	d 93.5 ± 80.3 (66) *****
Nutrition perturbée (tiques <100 mg)	61.3% (79)	57.1% (56) **	57.1% (56) **	c 69.7% (46)	c 69.7% (46)	c 69.7% (46)
Fréquence de ponte (%)	30.2% (29)	51.0% (50) **	51.0% (50) **	b 50.0% (33) *	b 50.0% (33) *	b 50.0% (33) *
Poids des pontes (mg)	31.1 ± 32.2 (29)	63.8 ± 55.2 (50) **	63.8 ± 55.2 (50) **	c 42.0 ± 41.6 (33)	c 42.0 ± 41.6 (33)	c 42.0 ± 41.6 (33)
Rendement de ponte	0.23 ± 0.17 (29)	0.32 ± 0.16 (50) *	0.32 ± 0.16 (50) *	b 0.25 ± 0.15 (33)	b 0.25 ± 0.15 (33)	b 0.25 ± 0.15 (33)
Fréquence d'éclosion des pontes (%)	51.7% (15)	62.0% (31)	62.0% (31)	69.7% (23)	69.7% (23)	69.7% (23)

Moyennes ± é.s.-4. en %
n: nombre de lapins
(): nombre de tiques

*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001; ****: p<0.0001; entre TIL-2 et CDir ou CRés
a: p<0.05; b: p<0.01; c: p<0.001; d: p<0.0001; entre infestations 1 et 2
#: deux lapins sont morts avant la 2ème infestation

Tableau 6: Biologie des tiques

biologiquement active *in vivo* chez le lapin, ce qui semble d'ailleurs être le cas pour tous les modèles couramment utilisés en médecine humaine et vétérinaire.

Les groupes de lapins de cette expérience sont définis à partir des résultats précédents. Les animaux faiblement infestés sont traités avec la lymphokine pendant la première infestation, afin de provoquer une stimulation accrue de leur système immunitaire pendant la phase d'induction de la réponse, et pour qu'ils expriment très rapidement un degré élevé de résistance. Selon le chapitre 3.1., le groupe de lapins infestés par vingt-cinq tiques constitue le témoin hautement résistant.

3.2.2 Première expérience

3.2.2.1. Effet du traitement à l'IL-2 sur la biologie des tiques

Dès la première infestation, les tiques nourries sur les lapins traités TIL-2 présentent des perturbations de leur biologie (tableau 5).

Leurs poids de gorgement sont nettement inférieurs à ceux observés dans le groupe témoin direct CDir et le groupe témoin résistant CRés, bien que le temps de gorgement soit identique dans les trois groupes. Près de 68% de ces tiques pèsent moins de 100mg, ce qui est significativement différent des 33% du groupe CRés (voir le tableau pour les valeurs de p). Dans un histogramme de fréquences du poids des tiques gorgées (figure 13, page suivante), la distribution des tiques du groupe TIL-2 est nettement en faveur des faibles poids, en comparaison des groupes contrôles. Le traitement à l'IL-2 semble aussi avoir un effet sur l'ovogenèse. La fréquence, le poids et le rendement des pontes sont bien inférieurs dans le groupe TIL-2 à ceux mesurés dans les groupes contrôles.

A la seconde infestation (tableau 5), tous les groupes de lapins montrent des signes de résistance contre les tiques: temps de gorgement plus long, poids d'engorgement plus faible. Dans le groupe CRés, la fréquence, le poids et le rendement des pontes sont aussi significativement diminués. Mais c'est dans le groupe TIL-2 que la résistance perturbe le plus la biologie des ectoparasites. L'histogramme de fréquences de leur poids de gorgement (figure 13) diffère significativement pour ce groupe de celui des groupes contrôles ($p < 0.05$ au moins). Plus de 80% des tiques récoltées pèsent moins de 100mg, et seul un tiers d'entre elles parviennent encore à pondre. Ces valeurs sont significativement inférieures à celles mesurées dans le groupe témoin direct CDir. Il en est de même pour le poids et le rendement de ponte.

3.2.2.2. Sérologie

3.2.2.2.1. IgM totales

Les résultats obtenus par immunodiffusion radiale ne mettent en évidence aucune modification des titres d'IgM totales dans les plasmas des lapins TIL-2 (figure 14, page suivante). De légères augmentations de la concentration d'IgM, par rapport aux valeurs mesurées avant le début de l'expérience, sont observées au jour

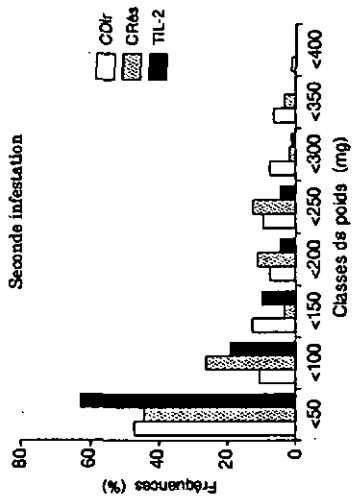
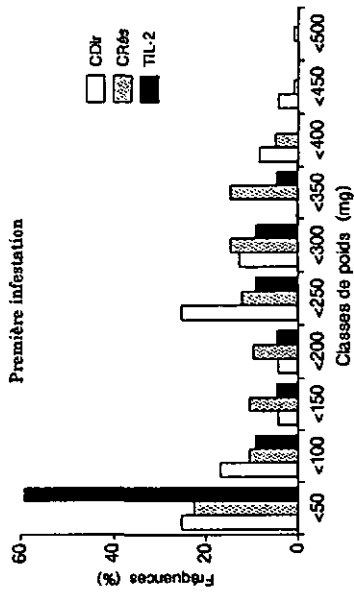


Figure 13: Histogrammes de fréquences. Poids des tiques gorgées

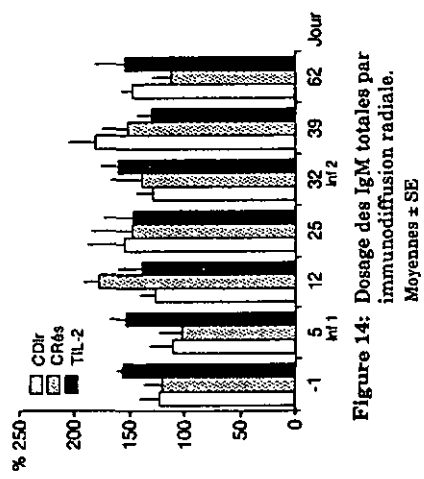


Figure 14: Dosage des IgM totales par immunodiffusion radiale.



Figure 15: Production d'IgG anti-EGS mesurés par ELISA.

12 dans le groupe CRés, et au jour 39 dans le groupe CDir, mais elles restent non statistiques par rapport aux valeurs mesurées avant le début de l'expérience. Aucune différence n'est constatée entre les groupes.

3.2.2.2.2. Réponse humorale à l'EGS

Une production significative d'anticorps IgG anti-EGS est observée dans les groupes CDir et CRés dès le jour 12 de l'expérience ($p < 0.05$; figure 15). La deuxième infestation provoque un accroissement plus rapide des titres, qui sont maximaux au jour 39. Chez les lapins TIL-2, la réponse est plus tardive. Les titres n'augmentent significativement qu'à partir de la seconde infestation (jour 32; $p < 0.001$ par rapport au jour -1). Ils restent inférieurs à ceux mesurés dans le groupe CRés ($p < 0.05$) durant toute l'expérience. La production d'anticorps est également plus faible que dans le groupe CDir, à l'exception du jour 32.

3.2.2.3. Transformation lymphoblastique

3.2.2.3.1. Réponse à l'EGS (figure 16, page suivante)

Comme précédemment, les lymphocytes des lapins des trois groupes prolifèrent *in vitro* au contact de l'EGS dès la première infestation (jour 5; $p < 0.05$ pour TIL-2, $p < 0.01$ pour CDir et CRés). La réponse lymphocytaire diminue après le détachement des tiques, pour n'être plus différente, au jour 12 pour le groupe TIL-2 et 25 pour les groupes contrôles, des mesures prises avant le début de l'expérience (jour -1). Pendant la seconde infestation, la prolifération est à nouveau significative dans les trois groupes, avec des valeurs plus élevées qu'en première infestation (jour 32; $p < 0.001$). Elle retourne aux valeurs initiales dans les groupes TIL-2 et CRés dès la fin du repas des tiques.

L'analyse statistique ne met en évidence aucune différence entre les lapins traités à l'IL-2 et les animaux contrôles. Cependant, les résultats obtenus pour le groupe TIL-2 avec l'EGS sont en moyenne toujours plus bas que ceux du groupe témoin direct CDir.

3.2.2.3.2. Réponse à la conA

La réponse des lapins TIL-2 à ce mitogène (figure 17, page suivante) est significativement plus élevée que celle des autres groupes ($p < 0.01$). Cependant, cet écart existe déjà avant le début de l'expérience et ne peut être attribué aux effets du traitement. Il convient ici de rappeler, en raison de ces résultats équivoques, que les animaux ont été répartis dans les groupes au hasard.

Comme nous l'avons observé dans l'expérience sur les effets de la charge parasitaire, la prolifération lymphocytaire baisse temporairement dans les trois groupes pendant la durée des infestations.

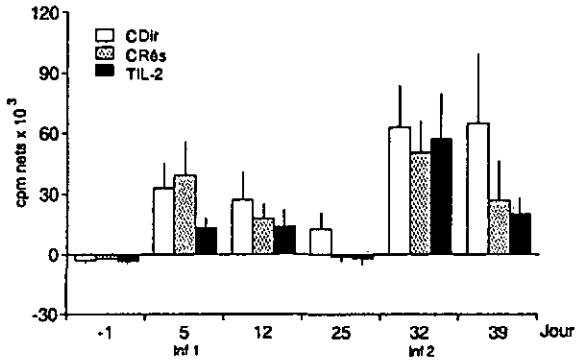


Figure 16: Transformation lymphoblastique.
Réponse à l'EGS. Moyennes ± SE.

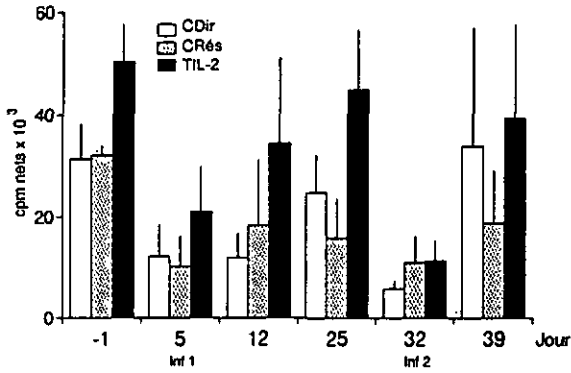


Figure 17: Transformation lymphoblastique.
Réponse à la conA. Moyennes ± SE.

3.2.3. Considérations intermédiaires

Cette expérience met en évidence un effet certain du traitement à l'IL-2 des lapins sur la biologie des tiques. Mais elle donne peu d'indices permettant de comprendre comment la lymphokine agit sur le système immunitaire du lapin pour aboutir à l'augmentation de résistance observée.

L'HRT est en général un bon reflet de la réponse immunitaire à médiation cellulaire (Meltzer et Nacy, 1989). Des lapins infestés plusieurs fois par 10 couples de *I. ricinus* développent d'intenses réactions d'HRT (Girardin et Brossard, 1985), qui sont atténuées si l'on injecte aux hôtes de la cyclosporine A (Girardin et Brossard, 1989). Parallèlement, les effets de la résistance sur la biologie des tiques sont fortement diminués chez les lapins traités avec cette molécule (Girardin et Brossard, 1990). La cyclosporine A, qui est un immunosuppresseur, inhibe l'activation des lymphocytes T helper (Schreiber et Crabtree, 1992), notamment en bloquant la synthèse d'IL-2 (Thomson *et al.*, 1986). D'autre part, l'IL-2 est capable d'augmenter l'HRT au dinitrochlorobenzène (DNCB) chez des souris sensibilisées à cet allergène de contact (Zaloom *et al.*, 1991).

Ainsi, l'expérience a été répétée, en incluant dans le protocole expérimental un test cutané pour mesurer l'HRT des lapins aux antigènes de tiques.

3.2.4. Expérience complémentaire

3.2.4.1. Remarque préliminaire

Le groupe CRés ne comprend que trois lapins, car nous connaissons déjà bien ce modèle expérimental. Le nombre de tiques récoltées reste suffisant pour les analyses statistiques. Dans cette expérience, l'attention est plutôt focalisée sur la comparaison du groupe TIL-2 avec son contrôle direct CDir.

3.2.4.2. Réponse cellulaire des lapins

3.2.4.2.1. Test cutané

Les lapins subissent le test au jour 26, c'est-à-dire au moment correspondant au début de la seconde infestation de l'expérience décrite plus haut (3.2.2.).

La zone de peau témoin, site d'injection du tampon de dilution de l'antigène (RPMI 1640), réagit de manière équivalente dans les trois groupes (figure 18, page 41). Seul un léger épaissement est mesuré à 6h; celui-ci disparaît ensuite complètement. Les résultats du test concernant la réponse à l'EGS sont présentés à l'état brut, sans avoir soustrait les valeurs de la zone de peau témoin, puisque celle-ci n'évolue pas et réagit de la même manière dans les trois groupes (figure 19, page 41).

Les lapins CDir développent, dans la première heure, une réaction cutanée passagère mais significative à l'EGS ($p < 0.05$ à 50 minutes). La peau commence à s'épaissir

N° lapin	Epaissement de la peau au site d'injection (mm x 10 ⁻²)											
	10'	20'	30'	40'	50'	50'	6h	24h	48h	72h	96h	
TIL-2	1	60	56	41	51	64	55	202	431	*441	*325	*311
	2	12	15	31	40	8	38	74	288	*347	*283	*272
	3	45	45	59	58	85	97	202	298	*295	130	56
	4	36	45	35	30	25	14	35	102	72	51	40
	5	15	10	41	55	63	60	63	71	71	48	34
CDir	6	33	49	52	64	64	84	175	233	*163	86	60
	7	31	21	35	41	94	81	81	175	205	113	75
	8	12	14	11	20	50	30	75	170	*179	*137	122
	9	36	83	88	113	101	78	126	178	73	33	28
	10	14	46	39	54	70	70	48	155	127	101	69
CRéa	11	49	43	63	50	50	60	100	210	*174	*148	153
	12	36	35	45	42	32	42	69	81	92	93	90
	13	10	14	23	19	16	28	59	64	94	38	22

*: indurations

Tableau 6: Test cutané. Réaction à l'EGS. Mesures individuelles

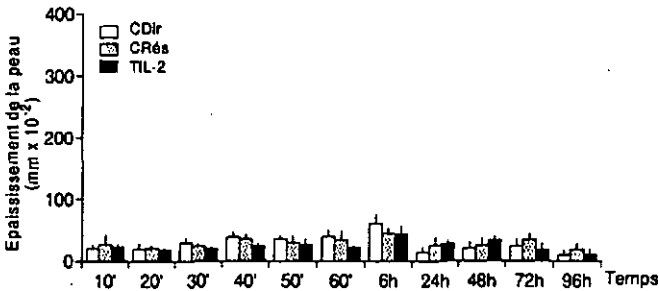


Figure 18: Test cutané. Réaction au tampon de dilution de l'antigène (RPMI 1640). Moyennes \pm SE.

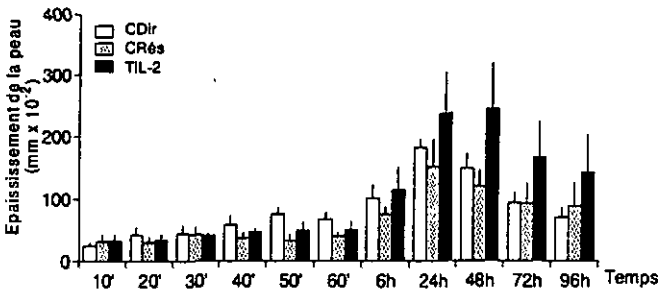


Figure 19: Test cutané. Réaction à l'EGS. Moyennes \pm SE.

1ère infestation	TIL-2 (n=5)	CDir (n=5)	CRés (n=3)
	5 tiques/lapin	6 tiques/lapin	25 tiques/lapin
Poids des tiques gorgées (mg)	165.5 ± 96.9 (26)	178.7 ± 89.6 (20)	165.7 ± 80.1 (74)
Nutrition perturbée (tiques <100 mg)	30.8% (8)	20.0% (4)	24.3% (18)
Fréquence de ponte (%)	80.8% (21)	85.0% (17)	87.8% (66)
Poids des pontes (mg)	64.3 ± 43.3 (21)	75.9 ± 36.0 (17)	64.7 ± 40.3 (66)
Rendement de ponte	0.25 ± 0.17 (21)	0.36 ± 0.18 (17)	0.29 ± 0.18 (66)

Légende, voir tableau 5

Tableau 7: Biologie des tiques. Expérience complémentaire.

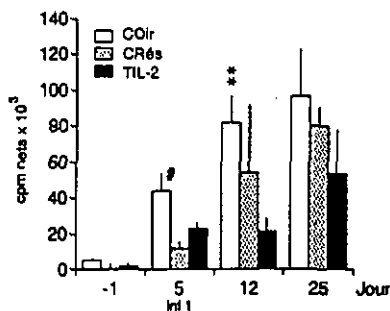


Figure 20: Transformation lymphoblastique.
Réponse à l'EGS. Moyennes ± SE.
**: p<0.01 entre CDir et TIL-2
#: p<0.05 entre CDir et CRés

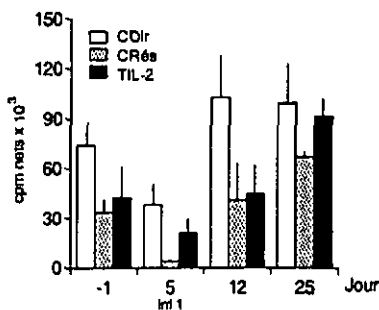


Figure 21: Transformation lymphoblastique.
Réponse à la conA. Moyennes ± SE.

dans les trois groupes après 6h. Un maximum est atteint après 24h dans les groupes CDir et CRés ($p < 0.001$ et $p < 0.01$ respectivement), et après 48h dans le groupe TIL-2 ($p < 0.001$). Les réponses mesurées dans les trois groupes ne sont pas significativement différentes, probablement en raison de l'importance des variations individuelles. Un examen des mesures effectuées pour chaque lapin (tableau 6, page 41) montre que trois individus TIL-2 ($n=3$) développent des réactions cutanées spectaculaires, accompagnées de fortes indurations, à 24h, 48h et 72h. Des indurations sont également constatées chez les lapins 6, 8 (CDir) et 11 (CRés), mais les épaisissements de peau ne sont pas aussi importants que chez les lapins TIL-2. Par contre, les individus 4 et 5 (TIL-2) ne présentent pas de réponse nette à l'EGS.

3.2.4.2.2. Transformation lymphoblastique

Comme nous l'avions vu précédemment, une réponse significative des lymphocytes en présence d'EGS (figure 20) est mesurée dans les trois groupes dès le jour 6 ($p < 0.01$). Contrairement à notre première expérience (chap. 3.2.2.), la prolifération lymphocytaire augmente progressivement après le détachement des tiques jusqu'au jour 25, date de notre dernière prise de sang. Une comparaison des groupes montre que la réponse des lapins TIL-2 à l'EGS est toujours significativement plus basse que celle des lapins CDir ($p < 0.01$). Dès le jour 12, la réponse du groupe TIL-2 est également inférieure à celle du groupe CRés.

La prolifération en présence de conA la plus élevée est observée dans le groupe CDir (figure 21). L'écart avec les deux autres groupes est significatif ($p < 0.05$), mais semble indépendant de l'expérience effectuée. En effet, cette différence de réponse existe déjà au jour -1, c'est-à-dire avant toute expérimentation des lapins. Plus intéressante est la diminution de prolifération lymphocytaire à nouveau présente dans les trois groupes de lapins pendant la durée du repas sanguin des tiques. Cette baisse est significative ($p < 0.05$ au moins).

3.2.4.3. Biologie des tiques

Seuls les paramètres suscitant un commentaire sont présentés dans le tableau 7.

La moyenne du poids des tiques récoltées sur les lapins CRés semble anormalement basse par rapport à tous nos résultats précédents. Jusqu'à présent en première infestation, les ectoparasites s'étaient toujours mieux nourris sur des lapins fortement infestés (comme CRés) que sur des individus avec une charge parasitaire faible (comme CDir). La ponte et le rendement de ponte sont également plus bas que dans les groupes CDir, sans qu'il soit possible d'en expliquer la cause.

Les effets de l'IL-2 sur la biologie des tiques ne sont pas aussi spectaculaires que lors de la première expérience, mais ils sont comparables. Le repas sanguin et la ponte sont en moyenne plus perturbés dans le groupe TIL-2 que dans les groupes contrôles, et le rendement de ponte y est aussi le plus bas. Ces trois paramètres, poids des

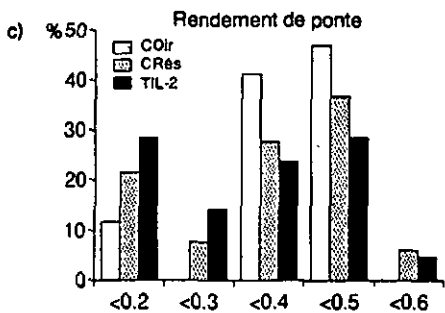
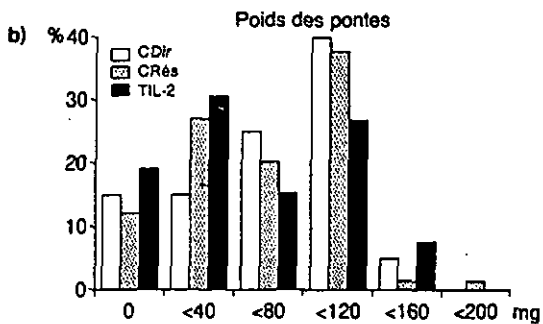
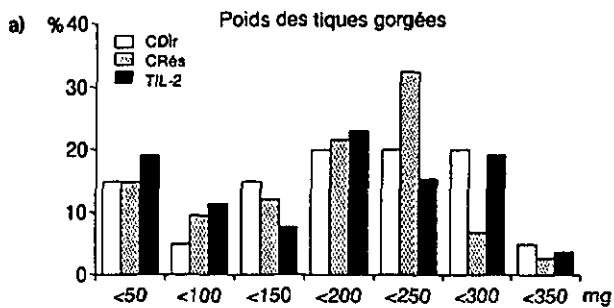


Figure 22: Biologie des tiques.
Histogrammes de fréquences

tiques, des pontes et rendements de ponte, sont représentés sous forme d'histogrammes de fréquences dans la figure 22 a,b et c. Dans chaque cas, la distribution obtenue pour le groupe TIL-2 est moins favorable aux ectoparasites que chez les contrôles: les classes de faible poids d'engorgement sont mieux représentées (<100mg); un plus grand nombre de tiques ne peuvent pas pondre ou pondent très peu d'oeufs; de mauvais rendements de ponte sont plus fréquents, surtout par rapport au groupe CDir. Les deux histogrammes sont d'ailleurs significativement différents ($p < 0.05$). Ces résultats confirment ainsi ceux de la première expérience avec l'IL-2.

3.2.5. Discussion

L'effet bénéfique de l'IL-2 sur les phénomènes de résistance a déjà été montré dans plusieurs modèles parasitaires. Des injections d'IL-2 directement dans les nodules infectieux de patients souffrant de leishmaniose (*L.aethiopica*) provoquent un afflux de cellules CD4⁺ et une diminution significative du nombre d'amastigotes dans les lésions (Akuffo et al., 1990). Chez des souris infectées par *T.cruzi*, une seule injection intrapéritonéale de 1'500 unités d'IL-2 suffit pour lever l'immunosuppression induite par le parasite, pour diminuer la parasitémie et prolonger la durée de vie de l'hôte (Choromanski et Kuhn, 1985). L'IL-2 humaine s'est montrée également efficace dans des cas d'infections bactériennes par *Mycobacterium leprae* (Kaplan et al. 1989; 1991), *H.pleuropneumoniae* (Anderson et al., 1987), et *Listeria monocytogenes* (Haak-Frendscho et al., 1989; Haak-Frendscho et Czuprynski, 1992). Dans ce dernier exemple, des injections intraveineuses de la lymphokine à des souris diminuent le degré d'infection et le temps de "clearance" de l'agent pathogène. Elles améliorent également chez des souris la résistance acquise par transfert de cellules spléniques provenant d'animaux immunisés contre la bactérie. L'effet *in vivo* de l'IL-2 dans les systèmes hôtes/tiques n'avait cependant jamais été étudié auparavant.

Des doses très faibles de lymphokine ont été inoculées aux lapins afin d'éviter tout effet secondaire indésirable. Des doses massives d'IL-2 (3×10^6 unités/kg/jour) peuvent induire des dysfonctions pulmonaires, cardiaques et hépatiques graves chez les lapins (Goldblum et al., 1990; Marshall et al., 1990). Plus proche de nos conditions expérimentales, des doses de 10^3 unités/kg d'IL-2 recombinante humaine provoquent diarrhées et inappétence chez des porcs traités par voie intramusculaire (Anderson et al., 1987).

Dans notre cas, la quantité d'IL-2 administrée aux lapins lors de la première expérience, soit 4.5×10^3 unités par injection (10 fois), permet de renforcer la résistance développée contre les ectoparasites sans provoquer d'effets indésirables. Les doses utilisées semblent toutefois limites: leur diminution de 15% lors de la deuxième expérience (3.8×10^3 unités) se traduit par une baisse importants de l'influence du traitement sur la biologie des tiques. Pour cette raison, nous avons choisi de commenter principalement les résultats de la biologie des tiques récoltées lors de la première expérience, qui sont les plus nets et les plus complets.

Grâce au traitement à l'IL-2, les lapins infestés par un petit nombre de tiques deviennent fortement résistants après une seule infestation déjà. En réinfestation, les altérations du repas sanguin et de la ponte sont beaucoup plus graves dans le groupe TIL-2 que dans le groupe contrôle direct CDir. La résistance des lapins TIL-2 semble même être supérieure à celle des lapins "contrôles résistants" CRés.

En première infestation déjà, le poids d'engorgement et le rendement de ponte sont diminués chez les tiques nourries sur les lapins TIL-2. Nous ne pouvons exclure ici un effet toxique direct de la lymphokine sur les ectoparasites. Il est cependant peu probable car les injections d'IL-2 sont pratiquées en un point éloigné des sites de fixation des tiques et par voie sous-cutanée. De plus, la demi-vie de l'hormone dans le plasma est très courte: environ sept minutes si l'administration est intraveineuse (Lotze *et al.*, 1985).

Les injections d'IL-2 semblent plutôt avoir un effet immédiat sur la réponse des lapins. Une meilleure activation du système immunitaire pendant la phase d'induction de la réponse (première infestation), et la formation d'un grand nombre de cellules à mémoire, peuvent expliquer le renforcement de la résistance observée lors de la seconde infestation.

L'IL-2 peut agir sur la réponse à médiation humorale. Ainsi Weyand *et al.* (1986) signalent chez des souris une production polyclonale d'IgM en réponse à des doses massives d'IL-2. Chez des souris infectées par *T. cruzi* et traitées à l'IL-2, une augmentation des IgM et des IgG spécifiques est observée, qui s'accompagne d'une meilleure protection de l'hôte contre le pathogène (Choromanski et Kuhn, 1987). Dans une expérience de vaccination de bovins contre l'herpès, une élévation des titres d'anticorps spécifiques est mesurée dans le sérum des animaux ayant reçu de l'IL-2 comme adjuvant (Reddy *et al.*, 1989). La résistance au virus conférée par le vaccin pourrait être liée à des phénomènes d'ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity), favorisés par la lymphokine.

Cependant, d'autres auteurs sont moins catégoriques quant à l'effet de l'IL-2 sur la réponse humorale. Chez des cobayes immunisés contre le virus *Herpes simplex*, le taux d'IgG n'est pas augmenté par le traitement (Weinberg et Merigan, 1988). Nunberg *et al.* (1989) mentionnent des résultats similaires avec des souris vaccinées contre la rage et traitées avec la lymphokine. Enfin, Kawashima et Platt (1989) observent bien une élévation des titres d'anticorps due à l'IL-2 chez des porcs vaccinés contre un virus pseudorabique, mais sans obtenir un effet protecteur accru. Dans notre étude, l'examen des titres d'IgM totales par immunodiffusion radiale n'apporte aucun renseignement concernant le mode d'action de la lymphokine. Rappelons que seules de très légères augmentations de concentration sont mesurées dans les groupes contrôles. Utilisant le même test d'immunodiffusion radiale, Papatheodorou (1984) n'a pas non plus constaté d'augmentation des IgM totales chez des lapins infestés par *I. ricinus*. La méthode de détection des immunoglobulines utilisée est sans doute peu sensible. Cependant, un test ELISA IgM conventionnel (résultats non présentés) ne fournit pas plus de renseignements.

Les titres d'anticorps IgG mesurés chez les lapins TIL-2 paraissent inférieurs, mais ne diffèrent pas significativement de ceux des lapins CDir. Par contre, la production d'anticorps anti-EGS du groupe TIL-2 est beaucoup plus basse que dans le groupe CRés. La réponse anticorps IgG des hôtes reste donc avant tout dépendante de la charge parasitaire (chapitre 3.1.4.; Schorderet et Brossard, 1993a). L'effet protecteur de l'IL-2 ne serait pas dû, dans notre modèle, à une amplification de la réponse à médiation humorale.

Dans les deux expériences, la réponse des lymphocytes à l'EGS est plus basse chez les lapins TIL-2 que chez les lapins contrôles (surtout en comparaison de CDir). Plusieurs explications sont possibles:

a) Lotze *et al.* (1985) montrent qu'un traitement *in vivo* à l'IL-2 est susceptible de provoquer des modifications du nombre et de la composition des sous-populations de lymphocytes circulants, ce qui pourrait influencer les tests.

b) Les lymphocytes spécifiques seraient moins nombreux dans le sang circulant, soit en raison de leur accumulation et de leur rétention dans les ganglions régionaux drainant les sites de fixation des tiques, soit à cause de leur migration plus rapide et plus massive en direction de ces sites.

La réponse lymphocytaire spécifique a été vérifiée après traitement à l'IL-2 chez des cobayes infectés par *H. simplex* (Weinberg et Merigan, 1988) et chez des porcs vaccinés contre le virus pseudorabique (Kawashima et Platt, 1989). Dans les deux cas, la prolifération des lymphocytes en présence d'un antigène n'est pas significativement modifiée par l'IL-2. Il est possible que le test de transformation lymphoblastique ne soit pas adéquat pour déceler un effet direct de l'IL-2 sur l'immunité à médiation cellulaire.

Plusieurs auteurs (Lotze *et al.*, 1985; Kradin *et al.*, 1989; Reddy *et al.*, 1989) observent une baisse de la réponse à la conA chez les sujets traités. Les doses de lymphokines utilisées dans ces études sont beaucoup plus élevées que celles que nous avons choisies, et provoquent de graves effets secondaires. Par contre, et comme dans nos expériences, les doses faibles d'IL-2 ne semblent provoquer, chez des souris infestées par *L. monocytogenes*, aucune modification de la prolifération des lymphocytes en présence de conA (Haak-Frendscho *et al.*, 1989).

Le test d'HRT permet d'évaluer la réponse à médiation cellulaire de façon plus fidèle que le test de transformation lymphoblastique. En effet, la réaction requiert la présence de cellules CD4⁺ spécifiques aux antigènes injectés (Meltzer et Nacy, 1989). Elles libèrent localement des médiateurs (MAF: macrophage activating factors) qui retiennent et activent les monocytes, véritables effecteurs de l'HRT. Sous l'effet de MAF tels que l'INF- τ ou l'IL-4, ils acquièrent un pouvoir cytotoxique dirigé non spécifiquement contre tout agent pathogène présent.

Dans notre étude, trois lapins traités à l'IL-2 développent des réactions d'HRT spectaculaires. Des monocytes cytotoxiques se trouvant aux sites de fixation des tiques pourraient participer à la défense de l'hôte en détruisant des cellules intestinales des ectoparasites après avoir été ingérés.

D'autres modes d'action de la lymphokine doivent cependant intervenir, puisque deux lapins traités ne présentent pas de réactions cutanées à l'EGS, bien que développant par la suite une bonne résistance anti-tiques (résultats non présentés).

L'IL-2 a un rôle activateur sur d'autres cellules immunitaires, comme les cellules NK (Hefeneider *et al.*, 1983), qui pourraient, comme les monocytes, agir directement au niveau des tissus de la tique. Cependant, une activité NK n'a pas encore été mise en évidence chez le lapin (Laybourn *et al.*, 1990). Si elle existe, elle n'est pas décelable par les méthodes conventionnelles.

Un extrait de glandes salivaires des tiques *D.andersoni* diminue sensiblement la production *in vitro* d'IL-2 par des splénocytes de souris non infestées, activés par de la conA (Ramachandra et Wikel, 1992). Des prostaglandines, en particulier la PGE₂, sont présentes dans la salive des tiques (Ribeiro *et al.*, 1992), ou sont produites par l'hôte dans les réactions inflammatoires (Goodwin et Webb, 1980). La PGE₂, ainsi que l'histamine, sont des inhibiteurs de la production d'IL-2 par les cellules T (Walker *et al.*, 1983; Dohlstien *et al.*, 1988; Phipps *et al.* 1991). L'administration répétée d'IL-2 aux lapins pendant la phase d'induction de la réponse inverserait les effets inhibiteurs de ces molécules et permettrait une meilleure réponse primaire. Elle favoriserait la formation d'une plus grande quantité de cellules à mémoire assurant une réponse secondaire plus rapide et plus forte.

3.2.6. Conclusion

Cette étude a permis de montrer que les injections d'IL-2 ont un effet spectaculaire sur la résistance des lapins contre les tiques: le repas et la ponte sont perturbés précocement et de manière plus importante que chez les tiques nourries sur des individus non traités. La combinaison faible charge parasitaire et traitement à l'IL-2 est efficace pour l'obtention d'animaux très résistants. Cependant, le mode d'action de l'IL-2 sur le système immunitaire des hôtes reste peu évident. L'IL-2 semble agir sur le compartiment cellulaire de la réponse immune, mais les indices sont faibles. L'emploi de doses de lymphokine plus élevées, une étude précise des sous-populations de cellules présentes aux sites de fixation des tiques, l'utilisation d'inhibiteurs des prostaglandines sont des moyens qui permettraient peut-être de préciser la fonction de l'IL-2 dans le modèle lapins-tiques.

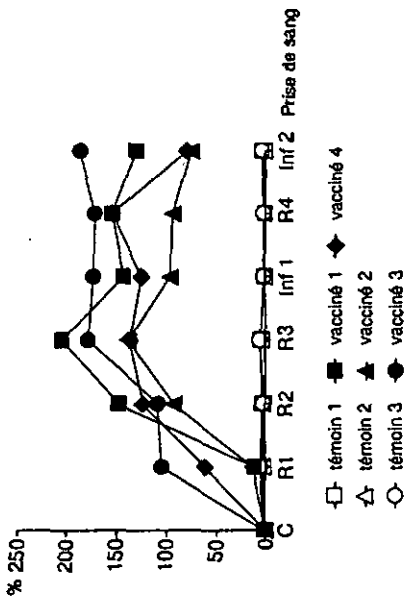


Figure 23: Réponse IgG anti-TNF mesurés par ELISA

Moment des prises de sang:

- C: contrôle avant expérience
- R1: prise de sang 1 semaine post 1er rappel
- R2: prise de sang 1 semaine post 2ème rappel
- R3: prise de sang 1 semaine post 3ème rappel
- Inf 1: prise de sang 1 semaine post 1ère infestation
- R4: prise de sang 1 semaine post 4ème rappel
- Inf 2: prise de sang 1 semaine post 2ème infestation

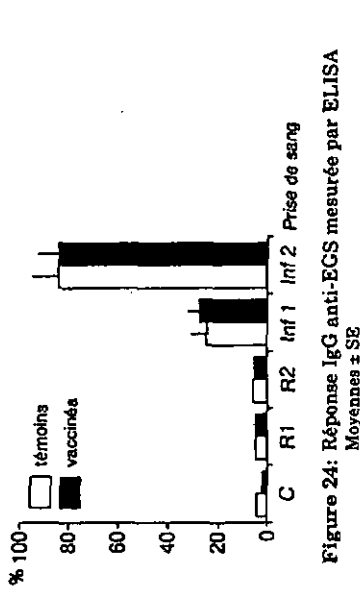


Figure 24: Réponse IgG anti-ECS mesurée par ELISA

Moyennes \pm SE

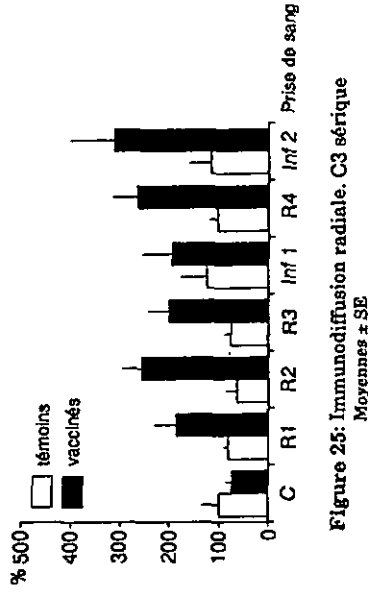


Figure 25: Immunodiffusion radiale. C3 sérique

Moyennes \pm SE

3.3. Effets du TNF- α sur l'acquisition de la résistance et sur la réponse immunitaire des lapins infestés

3.3.1. Remarque préliminaire

Le TNF- α recombinant humain est biologiquement actif chez le lapin (Morimoto *et al.*, 1989). Cette cytokine joue un rôle important dans les phénomènes inflammatoires (Warren, 1990), notamment au niveau de la peau (Beutler et Cerami, 1989).

La piqûre des tiques provoque une inflammation locale de la peau, laissant présumer une intervention de cette cytokine dans les relations hôte/tiques. Notre modèle rend difficile une analyse directe des facteurs produits aux sites de fixation des ectoparasites, en raison du peu de réactifs spécifiques de lapin disponibles sur le marché. Nous avons donc choisi d'intervenir de manière systémique sur l'hôte afin d'observer les modifications éventuelles de sa réponse.

Dans un premier temps, la neutralisation du TNF- α a été recherchée par une vaccination des hôtes contre la cytokine. L'effet de cette neutralisation a été mesuré sur la biologie des tiques et sur la réponse immunitaire des lapins.

Dans un second temps, les effets directs de la cytokine sur la biologie des tiques et la réponse des hôtes ont été mesurés. Ainsi, du TNF- α a été injecté aux lapins par voie intraveineuse pendant les infestations. Chez des souris traitées de cette manière, 30% de la dose de TNF- α injectée se retrouve accumulée au niveau de la peau après huit minutes (Beutler *et al.*, 1985c).

3.3.2. Vaccination contre le TNF- α

3.3.2.1. Titres d'anticorps anti-TNF- α

Après le premier rappel (R1, figure 23), deux lapins vaccinés (3 et 4), présentent déjà une élévation significative de leur titre d'anticorps anti-TNF- α ($p < 0.001$). Dès le second rappel (R2), la production est significative chez tous les animaux. Elle augmente encore après le troisième rappel (R3). Les titres dépassent alors les valeurs obtenues avec le sérum commercial (voir annex IV), et sont suffisamment élevés pour procéder à la première infestation. Lors de la prise de sang effectuée une semaine après la fin de celle-ci (Inf 1), les titres d'anti-TNF- α marquent une baisse chez tous les lapins. Un quatrième rappel (R4) les stabilise, alors qu'une seconde infestation s'accompagne d'une nouvelle diminution des taux d'anti-TNF- α chez tous les animaux, à l'exception du vacciné n°3. Aucune production d'anticorps dirigés contre la cytokine n'est détectée chez les lapins témoins.

3.3.2.2. Réponse humorale contre l'EGS

Après le premier contact avec les tiques (Inf 1, figure 24), l'élévation du

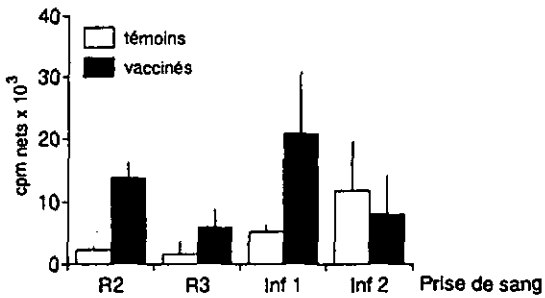


Figure 26: Transformation lymphoblastique. Réponse à l'EGS
Moyennes \pm SE. Voir figure 23 pour les légendes

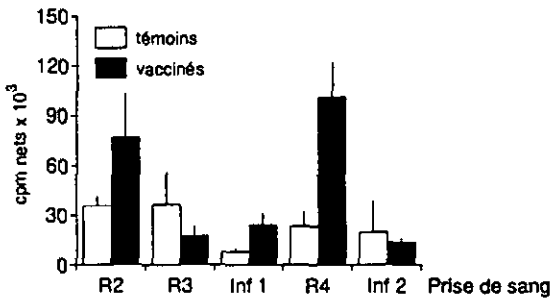


Figure 27: Transformation lymphoblastique. Réponse à la conA
Moyennes \pm SE. Voir figure 23 pour les légendes

titre d'anti-EGS est significative dans les deux groupes de lapins ($p < 0.001$). La seconde infestation entraîne une nouvelle production d'IgG spécifiques, sans différence statistique entre les lapins vaccinés et les témoins.

3.3.2.3. C3 sérique

Comme les anticorps anti-EGS, le taux de C3 sérique est vérifié tout au long de l'expérience (figure 25, page précédente). La première prise de sang effectuée après le premier rappel (R1), révèle une augmentation de la concentration de C3 dans le sérum des lapins vaccinés. Elle devient significative par rapport à la mesure effectuée avant le début de la vaccination (C) dès le second rappel ($p < 0.01$). Elle va le rester jusqu'à la fin de l'expérience, ceci malgré une légère diminution du taux de C3 après le troisième rappel (R3) et la première infestation (Inf 1). Dès le début du traitement, le taux de C3 sérique des lapins vaccinés est significativement plus élevé que celui des animaux témoins ($p < 0.001$). Ce dernier varie peu pendant la durée de l'expérience.

3.3.2.4. Réponse cellulaire des lapins: analyse par transformation lymphoblastique

3.3.2.4.1. Remarque

La réponse lymphocytaire des lapins n'est pas mesurée à chaque prise de sang, les prélèvements pratiqués après les rappels servant surtout à vérifier les titres d'anticorps anti-TNF- α .

3.3.2.4.2. Réponse à l'EGS

Le premier test est effectué après le second rappel (R2, figure 26). La réponse lymphocytaire est meilleure en moyenne chez les lapins vaccinés que chez les animaux témoins, alors qu'il n'ont pas encore été infestés. Après le troisième rappel (R3), la situation reste identique à la prise de sang précédente, bien que la prolifération soit un peu plus faible dans le groupe vacciné. Le contact avec les tiques (Inf 1 et Inf 2) induit une augmentation progressive de la réponse à l'EGS dans le groupe témoin. Dans le groupe des vaccinés, la prolifération lymphocytaire est plus élevée lors de la première infestation. Aucune des différences observées entre les groupes ou les prises de sang n'est statistiquement significative, probablement en raison du peu de lapins et de la variabilité des résultats.

3.3.2.4.3. Réponse à la conA

La réponse lymphocytaire des lapins témoins reste inchangée durant toute l'expérience (figure 27). Par contre, d'importantes variations sont observées chez les lapins vaccinés. La prolifération mesurée après les second et quatrième rappels (R2 et R4) est significativement plus élevée que lors des autres prises de sang (R3, Inf 1 et Inf 2; $p < 0.05$). La réponse est alors supérieure en moyenne à celle des témoins. Le nombre de données est à nouveau trop petit pour mettre en évidence une différence significative entre les deux groupes de lapins.

1ère infestation	Vaccinés		Témoins	
	(n=4)		(n=3)	
Temps de gorgement (jours)	8.7 ± 0.9	(94)	7.0 ± 1.0	(67)
Poids des tiques gorgées (mg)	188.9 ± 99.5	(94)	214.3 ± 64.2	(57)
Nutrition perturbée (tiques <100 mg)	21.3%	(20)**	4.5%	(3)**
Fréquence de ponte (%)	80.9%	(75)	91.0%	(61)
Poids des pontes (mg)	90.7 ± 46.6	(75)	97.4 ± 36.0	(51)
Rendement de ponte	0.40 ± 0.13	(75)	0.43 ± 0.11	(51)
Fréquence d'éclosion des pontes (%)	79.0%	(60)	77.1%	(47)

2ème infestation	Vaccinés		Témoins	
	Temps de gorgement (jours)	c 7.5 ± 1.5	(87)	c 7.8 ± 1.6
Poids des tiques gorgées (mg)	c 138.9 ± 88.6	(87)	d 131.7 ± 67.2	(64)
Nutrition perturbée (tiques <100 mg)	a 37.9%	(33)	c 29.7%	(19)
Fréquence de ponte (%)	82.6%	(72)	79.7%	(51)
Poids des pontes (mg)	b 65.0 ± 43.3	(72)	d 52.5 ± 33.3	(51)
Rendement de ponte	a 0.37 ± 0.12	(72)	d 0.34 ± 0.13	(51)
Fréquence d'éclosion des pontes (%)	88.9%	(64)	86.3%	(44)

Moyennes ± éc.-t. ou %

n: nombre de lapins

(): nombre de tiques

** : p<0.001

a: p<0.05; b: p<0.01; c: p<0.001;

d: p<0.0001: entre infestation 1 et 2

Tableau 8: Biologie des tiques

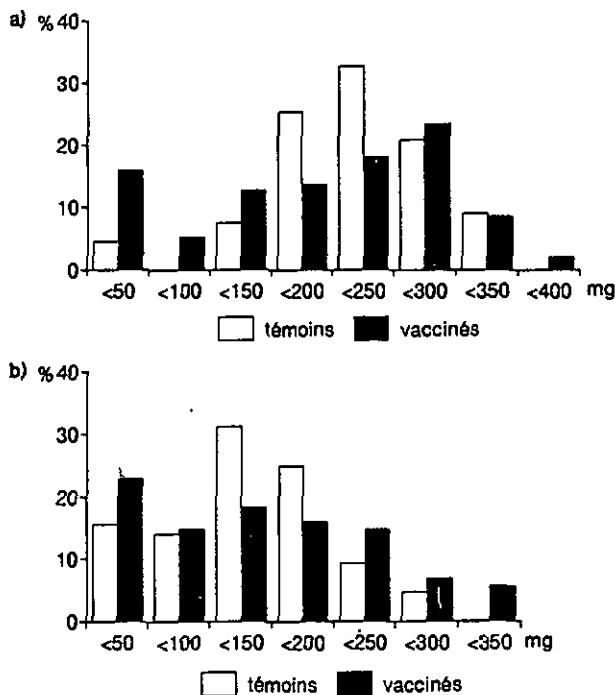


Figure 28: Histogrammes de fréquence. Poids des tiques gorgées.

a) 1ère infestation

b) 2ème infestation

3.3.2.5. Biologie des tiques

Le tableau 8 présente la biologie des tiques de manière globale. En première infestation, les différences entre les lapins vaccinés et les témoins sont faibles, à l'exception du nombre de tiques de moins de 100mg qui est significativement plus élevé chez les lapins vaccinés (voir tableau pour les valeurs de p). Les moyennes du poids des tiques gorgées, du poids des pontes et du rendement de pontes sont aussi plus basses dans ce groupe.

En seconde infestation, les lapins des deux groupes développent une résistance. Le poids des tiques et des pontes, ainsi que le rendement de ponte diminuent significativement. Le nombre de tiques pesant moins de 100mg augmente et le temps de gorgement est prolongé. Par contre, les fréquences de ponte et d'éclosion sont peu modifiées. Les deux groupes ne sont pas différents statistiquement, avec toutefois plus de tiques dont la nutrition est perturbée sur les lapins vaccinés.

Les données concernant le poids des tiques gorgées sont analysées plus en détail au moyen d'histogrammes de fréquences. La distribution en classes du poids des tiques de première infestation (figure 28a) diffère significativement d'un groupe à l'autre ($p < 0.01$). On constate un nombre plus grand de tiques pesant moins de 100mg dans le groupe vacciné (voir aussi tableau 8).

À la deuxième infestation (figure 28b), la distribution des poids est décalée vers les valeurs faibles, signe de l'apparition d'une résistance chez les lapins des deux groupes. Le phénomène paraît plus accentué chez les témoins, où aucune tique ne pèse plus de 300mg au détachement. Les deux histogrammes ne sont pas statistiquement différents.

3.3.3. Remarques

Les différences de réponse immunitaire observées entre les animaux vaccinés et les témoins (concentration de C3 sérique, réponse lymphocytaire à l'EGS et à la conA) sont vraisemblablement dues à l'action directe du TNF- α injecté lors de la vaccination, plutôt qu'à la neutralisation de la cytokine.

Les titres de C3 sérique augmentent significativement chez les lapins vaccinés dès le second rappel. Or, il est connu que le TNF- α est capable d'activer la production hépatique de C3 (Pepys, 1992).

Dans les tests de transformation lymphoblastique, les lymphocytes des lapins vaccinés montrent une plus grande capacité d'activation face à l'EGS et à la conA. Les cellules répondent intensément aux antigènes de tiques bien avant la première infestation, ce qui n'est pas le cas pour le groupe témoin. La prolifération des lymphocytes en présence de conA est aussi généralement plus élevée dans le groupe vacciné. Cet état d'activation pourrait être dû au TNF- α lui-même, car cette cytokine peut augmenter directement, du moins *in vitro*, la prolifération de lymphocytes T en réponse à des antigènes ou des mitogènes (Yokota et al., 1988).

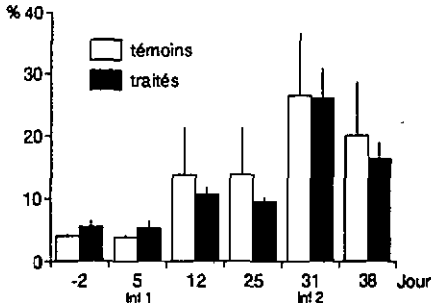


Figure 29: Réponse IgG anti-EGS mesurée par ELISA
Moyennes \pm SE

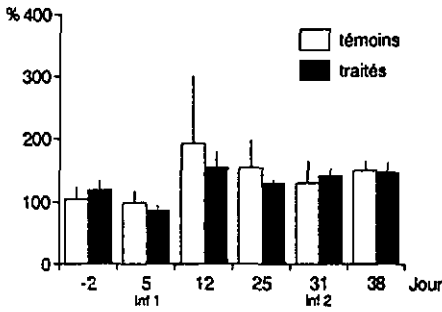


Figure 30: Immunodiffusion radiale.
IgM totales. Moyennes \pm SE.

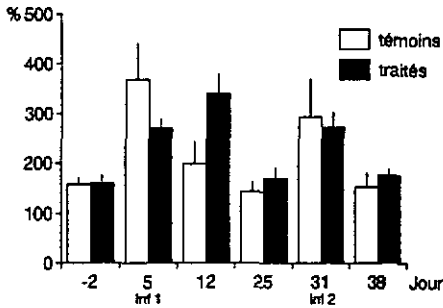


Figure 31: Immunodiffusion radiale.
C3 sérique. Moyennes \pm SE.

Les effets modérés du traitement sur la biologie des tiques résulteraient d'une action antagoniste des anticorps anti-TNF- α et de la cytokine elle-même.

Le traitement des lapins par injection de TNF- α pendant les infestations complétera l'expérience de vaccination tout en facilitant l'interprétation des résultats.

3.3.4. Traitement avec le TNF- α

3.3.4.1. Remarque préliminaire

Le traitement des animaux avec du TNF- α recombinant humain n'a pas entraîné de production d'anticorps spécifiques, qui auraient pu neutraliser les effets de la cytokine et fausser les résultats. Cette expérience est, par conséquent, opposée à la précédente.

3.3.4.2. Réponse humorale contre l'EGS

Les injections de TNF- α n'ont pas d'effet sur la réponse IgG des lapins aux antigènes de tiques (figure 29). Les deux groupes de lapins ont des titres équivalents durant toute l'expérience. Il en est de même pour la production d'IgM totales (figure 30).

3.3.4.3. C3 sérique

Les variations du taux de C3 sérique observées durant l'expérience ne semblent pas dépendre du traitement au TNF- α (figure 31). La présence des tiques sur les hôtes (jours 5 et 31) provoque une élévation temporaire de la concentration de C3 dans les sérums des témoins, qui est significative au jour 5 par rapport à la mesure effectuée avant le début de l'expérience (jour -1, $p < 0.05$). Dans le groupe traité, l'augmentation du taux de C3 est également significative au jour 5 ($p < 0.001$), mais un maximum est atteint au jour 12 de l'expérience, soit après le détachement des tiques de première infestation et la fin des injections de cytokine ($p < 0.001$). Pendant la seconde infestation (jour 31), un nouveau pic de concentration est mesuré dans les deux groupes ($p < 0.001$ par rapport au jour -1).

3.3.4.4. Réponse cellulaire des lapins: transformation lymphoblastique

3.3.4.4.1. Réponse à l'EGS

La réponse lymphocytaire à l'EGS des lapins traités est plus élevée en moyenne que celle des lapins témoins (figure 32, page suivante). Cependant, le nombre de données à disposition n'est pas suffisant, compte tenu de la dispersion des résultats, pour mettre en évidence une différence statistique entre les deux groupes. Si l'on se réfère aux expériences précédentes, les proliférations mesurées au jour 5 (première infestation) semblent anormalement basses pour des lapins infestés par 20 paires de tiques adultes. D'autre part, la réponse cellulaire à l'EGS diminue à la seconde infestation (jour 31), ce que nous n'avions jamais observé jusqu'à présent.

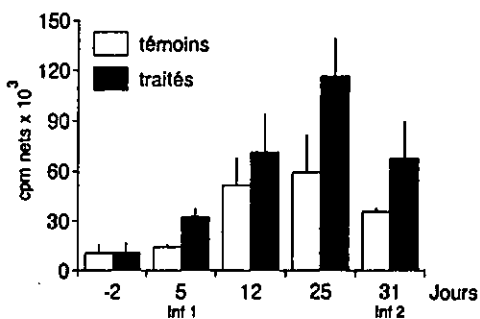


Figure 32: Transformation lymphoblastique.
Réponse à l'EGS. Moyennes \pm SE.

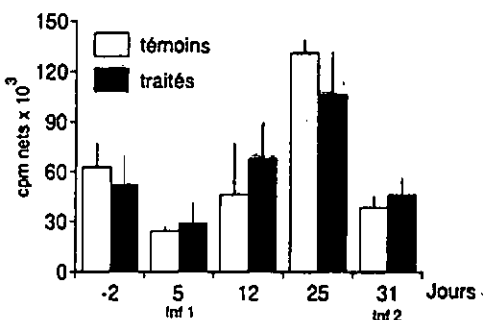


Figure 33: Transformation lymphoblastique.
Réponse à la conA. Moyennes \pm SE.

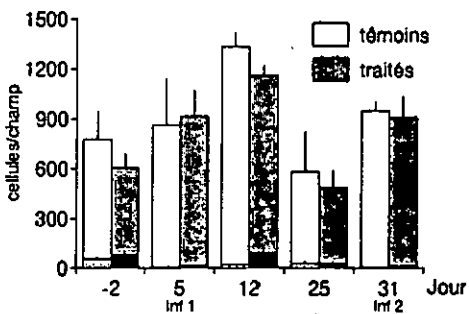


Figure 34: Migration de neutrophiles
en présence de SAct.
Moyennes \pm SE.

■ contrôles avec HBSS

3.3.4.4.2. Réponse à la conA

Contrairement à l'expérience de vaccination, la réponse lymphocytaire des lapins à la conA n'est pas ici influencée par le traitement au TNF- α (figure 33). Par contre, comme dans les expériences précédentes, une baisse temporaire de prolifération est mesurée dans les deux groupes au moment des infestations (jours 5 et 31).

3.3.4.5. Réponse cellulaire des lapins: migration de neutrophiles

Le traitement des lapins au TNF- α ne modifie pas le comportement de leurs neutrophiles face au facteur chimiotactique (C5a) contenu dans le sérum activé au zymosan A (SAct, figure 34). Le contact avec les tiques semble stimuler les cellules qui deviennent plus mobiles. Le nombre de neutrophiles ayant migré est significativement plus élevé pendant ou juste après les infestations (jours 5, 12 et 31), qu'avant le début de l'expérience (jour -1) ou après une période libre de tiques (jour 25, $p < 0.05$ au moins).

3.3.4.6. Biologie des tiques

En première infestation, peu de différences apparaissent entre les deux groupes de lapins (tableau 9, page suivante). Seul le pourcentage de tiques pesant moins de 100mg est beaucoup plus faible dans le groupe de lapins traités que dans le groupe témoin (voir tableau pour les valeurs de p). Ceci influence la moyenne du poids des tiques gorgées, plus élevée de 13% dans le groupe traité, ainsi que la fréquence des pontes. Les autres paramètres mesurés sont, par contre, équivalents dans les deux groupes.

A la seconde infestation, les lapins des deux groupes sont résistants. Cependant, les tiques nourries sur les lapins traités se sont gorgées significativement plus vite et sont plus grosses que celles des animaux témoins. Le poids et le rendement de ponte sont également plus élevés dans le groupe traité. Enfin, l'embryogenèse n'est perturbée que dans le groupe témoin.

Afin de détailler un peu plus les résultats, l'histogramme de fréquences du poids des tiques gorgées est analysé.

La distribution en classes du poids des tiques de première infestation (figure 35a, page suivante) illustre les résultats du tableau 9. Les classes de poids élevés sont mieux représentées dans le groupe traité que dans le groupe témoin.

En deuxième infestation (figure 35b), la courbe de répartition obtenue pour le groupe témoin est fortement décalée vers les poids légers. Dans le groupe traité, le phénomène est moins marqué: le poids des tiques gorgées dépasse souvent 200mg.

3.3.4. Discussion

La production d'anticorps contre l'EGS n'est pas modifiée par la vaccination anti-TNF- α , ni par les injections de TNF- α au cours des infestations. L'influence de la cytokine sur la réponse à médiation humorale semble varier en fonction de son mode

1ère infestation	Traités		Témoins	
	(n=5)		(n=2)	
Temps de gorgement (jours)	7.6 ± 1.5	(91)	7.6 ± 1.6	(36)
Poids des tiques (mg)	207.6 ± 84.2	(91)	180.7 ± 96.7	(36)
Nutrition perturbée (tiques <100 mg)	11.0%	(10) [*]	25.0%	(9) [*]
Fréquence de ponte (%)	92.3%	(84)	83.3%	(30)
Poids des pontes (mg)	81.8 ± 38.5	(84)	82.4 ± 37.9	(30)
Rendement de ponte	0.36 ± 0.10	(84)	0.37 ± 0.11	(30)
Fréquence d'éclosion des pontes (%)	96.4%	(81)	96.7%	(29)

2ème infestation	Traités		Témoins	
	Temps de gorgement (jours)	c 8.4 ± 1.4	(52) *	c 9.1 ± 1.1
Poids des tiques (mg)	d 114.7 ± 78.6	(52)	c 82.6 ± 42.4	(22)
Nutrition perturbée (tiques <100 mg)	d 50.0%	(26)	b 63.4%	(14)
Fréquence de ponte (%)	b 73.1%	(38)	63.4%	(14)
Poids des pontes (mg)	c 52.5 ± 43.1	(38) [*]	c 27.7 ± 20.7	(14) [*]
Rendement de ponte	0.32 ± 0.12	(38) [*]	b 0.24 ± 0.14	(14) [*]
Fréquence d'éclosion des pontes (%)	92.1%	(35) *	b 84.3%	(9) *

Moyennes ± éc. t. ou %

n: nombre de lapins

(): nombre de tiques

*: p<0.05

[*]: 0.05<p<0.06

a: p<0.05; b: p<0.01; c: p<0.001;

d: p<0.0001: entre infestation 1 et 2

Tableau 9: Biologie des tiques

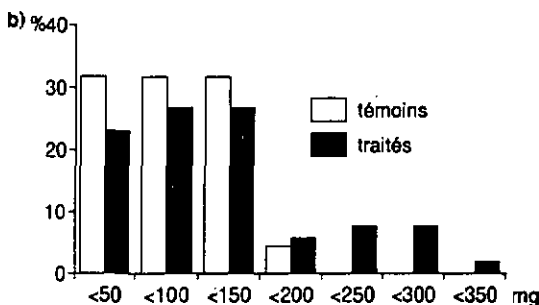
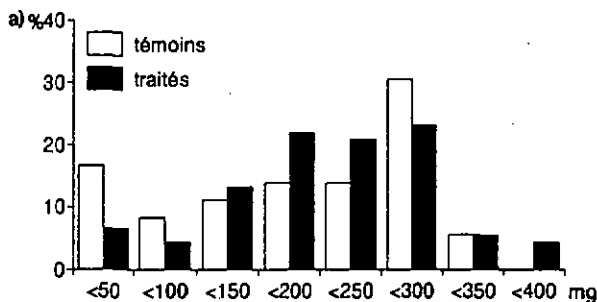


Figure 35: Histogrammes de fréquences. Poids des tiques gorgées.

a) 1ère infestation

b) 2ème infestation

d'administration et du modèle choisi. En effet, des souris sensibilisées avec des globules rouges de mouton, voient leur réponse en anticorps augmentée par des injections intrapéritonéales de faibles quantités de TNF- α (Ghiara *et al.*, 1987). La méthode des plages de lyse directe utilisée dans cette étude, met en évidence au niveau de la rate une augmentation du nombre de cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques, qui sont surtout des IgM (Roitt *et al.*, 1985).

La vaccination des animaux contre le TNF- α entraîne une élévation significative de la concentration de C3 sérique. Le C3 fait partie des protéines de phase aiguë produites par le foie, dont la concentration plasmatique augmente lors de réactions inflammatoires (Pepys, 1992). La production et la libération de ces protéines est sous contrôle de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6, et le TNF- α (Titus *et al.*, 1991).

Dans notre modèle, la concentration de C3 augmente rapidement dans le sérum des lapins vaccinés. Dès le premier rappel, celle-ci est déjà beaucoup plus élevée que chez les animaux témoins. Le TNF- α injecté au cours de la vaccination pourrait activer la synthèse hépatique de C3, directement ou par l'intermédiaire de l'IL-6, et déterminer l'élévation du titre sérique de cette protéine.

Quand le TNF- α est administré par voie intraveineuse aux lapins, aucune différence entre le taux de C3 sérique des animaux traités et celui des témoins n'est observée. Une augmentation de la concentration est mesurée dans les deux groupes au cinquième jour de chaque infestation, ce qui confirme les observations de Papatheodorou et Brossard (1987). Le TNF- α a une demi-vie de six à sept minutes dans le sang (Bentler *et al.*, 1985c). Ce laps de temps est peut-être trop court pour influencer significativement la production hépatique de C3, qui reste dépendante de la présence des tiques en train de se nourrir au moment des injections. Dans l'expérience de vaccination, le TNF- α est émulsifié dans de l'adjuvant de Freund avant d'être injecté intradermiquement, ce qui assure une diffusion beaucoup plus lente et une présence sans doute prolongée de la cytokine dans l'organisme de l'animal.

La réponse lymphocytaire à l'EGS est généralement plus élevée dans les groupes vaccinés et traités que chez les animaux témoins. En présence de conA, les cellules des lapins vaccinés réagissent aussi plus intensément. Yokota *et al.* (1988) montrent que le TNF- α a un pouvoir stimulant direct sur la réponse *in vitro* de lymphocytes, face à un mitogène ou à un antigène. Le TNF- α agit en augmentant la production d'IL-2 et le nombre de récepteurs à l'IL-2 des cellules T (Vassalli, 1992).

Dans notre cas, la sensibilité accrue des lymphocytes à l'EGS ou à la conA observée chez les animaux vaccinés et traités pourrait être expliquée par un effet direct *in vivo* du TNF- α sur les cellules.

Les neutrophiles participent intensément aux réactions inflammatoires provoquées par la piqûre des tiques. Ils infiltreront très rapidement et en grands nombres les sites de fixation des ectoparasites. Les études histologiques concernant des lapins infestés par *H.a. anatolicum* (Gill et Walker, 1985), *R. appendiculatus* (Walker et Fletcher,

1986), *Ixodes dammini* (Wheeler *et al.*, 1989), *A. variegatum* (Latif *et al.*, 1990) et surtout *I. ricinus* (Brossard et Fivaz, 1982), montrent que les neutrophiles prédominent dans la peau, aussi bien en primoinfestation qu'en réinfestation. La formation d'une cavité sous les pièces buccales de la tique et l'oedématisation de la lésion sont fortement liées à leur présence (Tatchell et Moorhouse, 1970).

La salive des tiques *D. variabilis* et *D. andersoni* contient des principes qui provoquent le clivage du C5. Le fragment C5a produit est un facteur chimiotactique pour les neutrophiles, ce qui expliquerait leur infiltration précoce, massive et non spécifique dans la peau infestée (Berenberg *et al.*, 1972, Gordon et Allen, 1991a).

Nos résultats montrent que les neutrophiles prélevés chez les lapins infestés répondent plus massivement au C5a contenu dans le SAct que des neutrophiles de lapins indemnes ou libres de tiques depuis un certain temps (figure 34). Le nombre de neutrophiles circulant dans le sang périphérique augmenta également pendant le repas sanguin (résultats non présentés). Ainsi, comme nous avons pu l'observer pour les lymphocytes, la présence des ectoparasites sur l'hôte semble stimuler fortement l'activité de ces cellules.

Le traitement des lapins par du TNF- α n'influence pas la migration des neutrophiles *in vitro*. Pourtant, l'effet de la cytokine sur ces cellules est prouvé: le TNF- α peut avoir une activité chimiotactique directe (Newman et Wilkinson, 1989; Rampart *et al.*, 1989) ou indirecte (Larsen *et al.*, 1990), et active leur métabolisme (Livingston *et al.*, 1989).

Les concentrations de TNF- α et la méthodologie utilisées dans notre étude sont similaires à celles décrites par Otsuka *et al.* (1990), qui observent une inhibition de la migration *in vitro* des neutrophiles chez des lapins traités au TNF- α . Cette différence de résultats est difficile à expliquer:

- Le test de migration utilisé dans notre travail n'est pas comparable avec celui de Otsuka *et al.* (1990). Pour des raisons pratiques, il est effectué 24h après la prise de sang au lieu d'être fait immédiatement. L'effet inhibiteur du TNF- α sur les neutrophiles pourrait disparaître progressivement chez ces cellules.
- La présence des tiques sur les lapins active les neutrophiles, ce qui pourrait contrecarrer l'inhibition provoquée par le traitement, et décrite pour des animaux indemnes.

Ces considérations nous permettent de commenter les résultats des deux expériences concernant la biologie des tiques.

Rappelons qu'en première infestation, le nombre de tiques dont la nutrition est gravement perturbée est significativement plus grand dans le groupe vacciné que dans le groupe témoin. La ponte et l'embryogenèse ne sont, par contre, pas modifiées par la vaccination. Deux hypothèses basées sur des phénomènes différents pourraient expliquer ces résultats:

a) La présence d'une concentration élevée de C3 dans le sang des lapins vaccinés. Le complément intervient dans les mécanismes de résistance contre les tiques, particulièrement après activation par la voie alterne (Wikel et Allen, 1977). Papatheodorou et Brassard (1987) observent une augmentation du C3 sérique chez des lapins infestés par des adultes de *I. ricinus*. Une concentration maximale est mesurée au sixième jour du repas sanguin; celle-ci est plus élevée lors de réinfestations. La protéine est aussi détectée en quantités croissantes dans l'intestin des tiques nourries sur des animaux résistants. Son activation pourrait occasionner des dégâts tissulaires, notamment au niveau de l'épithélium intestinal et causer des perturbations de la digestion de l'hémoglobine.

Dans le site de fixation des tiques, l'activation du système complément induirait la dégranulation des mastocytes par l'intermédiaire des anaphylatoxines C3a et C5a (Siraganian, 1992). Chez les lapins vaccinés, une concentration élevée de C3 pourrait être à l'origine de l'activation d'un plus grand nombre de mastocytes et de l'infiltration précoce et massive de basophiles. La quantité d'histamine libérée localement serait ainsi beaucoup plus élevée chez les animaux vaccinés que chez les témoins. La présence d'histamine dans les tissus est une cause importante de rejet des tiques (Paine *et al.*, 1983). Ceci pourrait expliquer le nombre plus important d'ectoparasites détachés précocement ou faiblement gorgés (pesant moins de 100mg), récoltés dans le groupe vacciné. Selon cette hypothèse, les anticorps anti-TNF- α n'auraient aucun effet sur la biologie des tiques, les perturbations de la nutrition des ectoparasites n'étant que la conséquence indirecte des injections de cytokine effectuées lors de la vaccination.

b) La neutralisation du TNF- α par les anticorps spécifiques diminuerait l'inflammation et l'infiltration des neutrophiles. Une diminution des réactions tissulaires de l'hôte serait défavorable aux tiques.

Les résultats de première infestation relatifs aux tiques nourries sur les lapins traités avec des injections intraveineuses de TNF- α n'infirmant aucuns des deux hypothèses. Le pourcentage de femelles gorgées pesant moins de 100mg est cette fois plus petit dans le groupe traité que dans le groupe témoin. Ceci pourrait s'expliquer soit par l'absence d'une concentration élevée de C3 sérique chez les animaux traités, soit par la présence d'une plus grande quantité de TNF- α aux sites de fixation, qui amplifierait la réponse inflammatoire de l'hôte. Une inflammation modérée serait ainsi bénéfique aux ectoparasites, alors qu'une forte réaction inflammatoire provoquerait le rejet prématuré des tiques et des perturbations de leur physiologie.

A la seconde infestation, les lapins vaccinés ou traités au TNF- α , ainsi que les animaux témoins sont devenus résistants. En plus des phénomènes inflammatoires non spécifiques observés en primo-infestation, des éléments spécifiques de la réponse immunitaire entrent en action (réponse T effectrice, anticorps). Chez les lapins vaccinés, la proportion des femelles anormalement gorgées (moins de 100mg) reste plus élevée que chez les animaux témoins. L'effet protecteur des anticorps anti-TNF- α

sur les tiques, s'il existe (voir hypothèse "a"), reste cependant limité à l'étape de fixation. En effet, la fréquence, le poids et le rendement de ponte sont moins altérés par la résistance chez les vaccinés.

Chez les lapins traités avec la cytokine en cours d'infestation, les mêmes observations peuvent être faites. Les tiques se nourrissent mieux, sont plus nombreuses à pondre, des pontes plus lourdes et de rendement plus élevé que les tiques nourries sur les lapins témoins.

Ainsi la cytokine semble perturber l'établissement de la résistance des hôtes. Elle pourrait affecter la phase d'induction de la réponse immunitaire.

Injecté à des lapins par voie intraveineuse, à des doses équivalentes à celles que nous avons utilisées, le TNF- α peut provoquer des modifications de la physiologie des lapins, comme l'augmentation de la température du corps (fièvre), ceci par l'intermédiaire de la PGE₂ (Morimoto *et al.*, 1989). Seul (Akama *et al.*, 1990) ou en synergie avec l'IL-1 (Conti *et al.*, 1988), le TNF- α active la synthèse et la sécrétion *in vitro* de PGE₂ par les neutrophiles. La PGE₂, comme nous l'avons vu précédemment, est aussi présente dans la salive de certaines tiques (Ribeiro *et al.*, 1992). Elle a une action inhibitrice sur des fonctions lymphocytaires telles que la synthèse d'IL-2 (Walker *et al.*, 1983), ou l'adhérence des cellules circulantes sur les cellules endothéliales des capillaires, diminuant ainsi leur extravasation vers le lieu d'une infection (To et Schrieber, 1990).

Ainsi, le TNF- α pourrait favoriser la biologie des tiques en augmentant les réactions inflammatoires aux sites de fixation des tiques, et en abaissant la réponse immunitaire spécifique de l'hôte par l'intermédiaire de la PGE₂.

3.3.5 Conclusion

Nos résultats montrent que le TNF- α intervient dans les relations liant la tique et son hôte. Cependant, son rôle dans la séquence des événements se déroulant dans les lésions de fixation reste à élucider. La plupart des activités de cette cytokine décrites dans la littérature ont été démontrées lors d'expériences *in vitro*. Il n'est pas certain qu'elles existent effectivement *in vivo*. Cette cytokine semble agir au détriment de l'hôte et au bénéfice des ectoparasites. Une étude histochimique et l'emploi d'un anti-inflammatoire, tel que l'indométacine qui inhibe la synthèse de PGE₂, pourraient préciser la localisation et la fonction de cette cytokine dans notre modèle. Une autre cytokine dont les effets sont souvent similaires à ceux du TNF- α , l'IL-1, mériterait également d'être étudiée. La complexité des relations intercellulaires au niveau de la peau laisse encore le champ à de multiples hypothèses concernant les mécanismes par lesquels un hôte peut rejeter une tique, et une tique déjouer la réponse immunitaire de l'hôte.

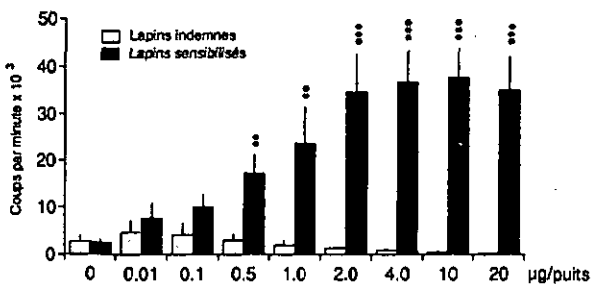


Figure 36: Transformation lymphoblastique. Réponse à l'EGS.
Moyennes \pm SE. Comparaison entre lapins indemnes et sensibilisés: * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$

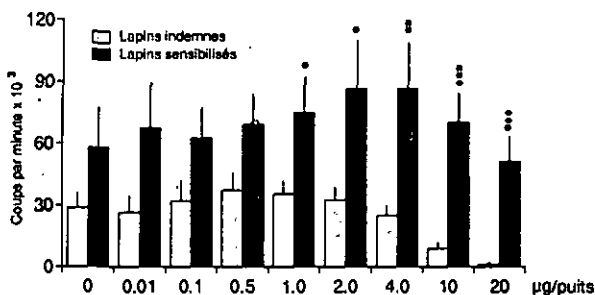


Figure 37: Transformation lymphoblastique.
Réponse à l'EGS en présence de conA.
Moyennes \pm SE. Voir figure 36 pour les valeurs de p.

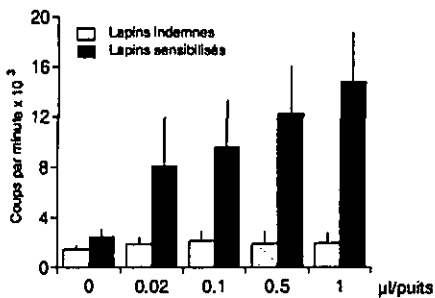


Figure 38: Transformation lymphoblastique.
Réponse à la salive. Moyenne \pm SE.

3.4. Effets *in vitro* des antigènes de tiques sur les lymphocytes et les neutrophiles de lapins indemnes ou sensibilisés par les tiques

3.4.1. Remarque préliminaire

En complément des expériences précédentes, différentes concentrations d'antigènes de tiques ont été testées *in vitro* sur des cellules d'animaux indemnes ou sensibilisés, c'est-à-dire ayant récemment été en contact avec des tiques (voir chap. 2.6.). Dans le test de transformation lymphoblastique, l'effet toxique ou mitogénique des antigènes sur les lymphocytes a été examiné.

La salive n'a pas été utilisée jusqu'à présent dans nos tests *in vitro*, car elle est difficile à récolter, même au moyen de pilocarpine. L'EGS est un extrait brut contenant surtout des protéines structurales qui ne sont pas injectées dans l'hôte par les tiques. C'est pourquoi il était nécessaire d'effectuer une comparaison des réponses lymphocytaires obtenues avec l'EGS et avec la salive, avec laquelle les hôtes sont effectivement en contact lors d'une infestation.

Dans le test de migration des neutrophiles, nous avons voulu vérifier si les antigènes de tiques pouvaient modifier le comportement des cellules face à un facteur chimiotectique comme le C5a contenu dans le sérum activé par le zymosan A (SAct). Ce modèle *in vitro* figure de manière simplifiée ce qui pourrait se passer aux sites de fixation des tiques.

3.4.2. Effet sur les lymphocytes

3.4.2.1. EGS

L'EGS semble être légèrement mitogénique pour les cellules de lapins indemnes, pour des concentrations de 0.01 à 1µg/puits (figure 36). Par contre, les concentrations plus élevées ont un effet inhibiteur, qui est significatif à 20µg/puits ($p < 0.05$, par rapport au témoin sans antigène 0µg/puits).

Les cellules de lapins sensibilisés répondent à l'EGS à la plus petite concentration déjà ($p < 0.05$). La prolifération augmente progressivement jusqu'à 4µg/puits, puis reste constante aux concentrations supérieures. Le comportement des cellules face à l'EGS est différent entre lapins sensibilisés et indemnes ($p < 0.001$).

L'addition de conA aux cultures (figure 37), met en évidence sur les cellules de lapins indemnes, un fort effet inhibiteur de l'EGS aux concentrations de 10 et 20µg/puits (au moins $p < 0.05$ et $p < 0.001$ respectivement, par rapport aux autres concentrations).

La réponse à la conA seule (0µg d'antigène/puite), mesurée pour les lymphocytes de lapins sensibilisés, est en moyenne plus élevée que pour les cellules d'animaux indemnes. La présence d'EGS dans les cultures ne crée pas de changement significatif de la prolifération chez les lapins sensibilisés. Une légère baisse est cependant observée à partir de 10µg/puits.

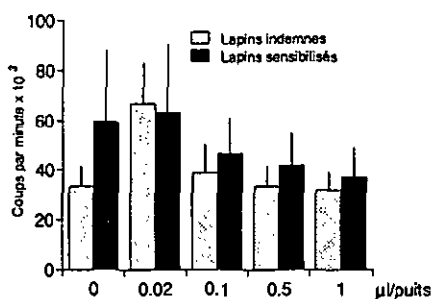


Figure 39: Transformation lymphoblastique.
Réponse à la salive en présence de conA.
Moyennes ± SE.

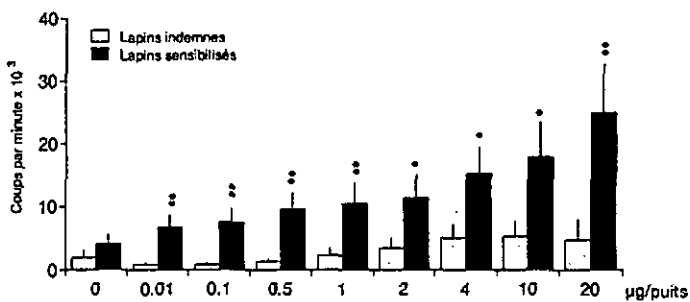


Figure 40: Transformation lymphoblastique. Réponse à l'ET.
Moyennes ± SE. Comparaison entre lapins indemnes
et sensibilisés: * : p < 0.05; ** : p < 0.01

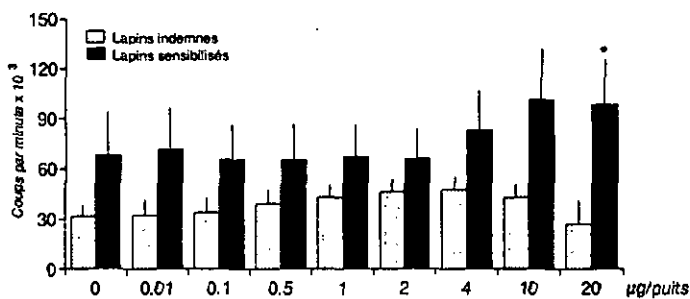


Figure 41: Transformation lymphoblastique. Réponse à l'ET
en présence de conA. Moyennes ± SE.
Voir figure 39 pour les valeurs de p.

3.4.2.2. Salive

Aux concentrations testées, la salive ne provoque pas de modification de la prolifération des cellules de lapins indemnes (figure 38, page précédente). Par contre, les cellules de lapins sensibilisés répondent à la salive à partir de 0.5µl/puits ($p < 0.05$ par rapport au test sans antigène). Le comportement des lymphocytes est très différent entre animaux indemnes et sensibilisés ($p < 0.001$).

En présence de conA (figure 39), la salive n'a aucune influence sur la prolifération des cellules des deux groupes de lapins. Les concentrations d'antigènes utilisées sont vraisemblablement trop faibles pour observer les mêmes effets inhibiteurs qu'avec l'EGS.

3.4.2.3. ET

Aux concentrations les plus élevées, l'antigène est légèrement mitogénique pour les lymphocytes de lapins indemnes (figure 40).

La réponse lymphocytaire est significative à partir de 0.5µg/puits pour les lapins sensibilisés ($p < 0.05$ par rapport à 0µg/puits), et augmente parallèlement à la concentration d'antigène. Ces résultats sont différents de ceux obtenus pour les animaux indemnes ($p < 0.001$).

En présence de conA (figure 41), la prolifération est plus élevée dans le groupe de lapins sensibilisés que dans le groupe d'animaux indemnes ($p < 0.01$). L'ET a un effet inhibiteur sur les cellules de lapins indemnes à la concentration de 20µg/puits (au moins $p < 0.05$ par rapport aux autres concentrations). Chez les lapins sensibilisés, l'extrait aurait tendance à activer les cellules à partir de 10µg/puits.

3.4.3. Effet sur les neutrophiles

Pour les trois antigènes considérés (EGS, salive, ET), la migration des neutrophiles ne diffère pas statistiquement si l'on mélange l'antigène au SAct (facteur chimiotactique) ou à l'HBSS (témoin) dans le compartiment inférieur de la chambre, ou si l'on incube l'antigène dans le compartiment supérieur directement avec les cellules pendant le test. Par conséquent, les deux séries de résultats ont été groupées pour l'analyse des effets des antigènes de tiques sur la migration des neutrophiles.

L'EGS inhibe significativement la migration des neutrophiles vers le SAct à partir de 0.05µg/puits (figure 42, page suivante; voir figure pour les valeurs de p). Un effet similaire est observé avec la salive pour une concentration de 1µl/puits (figure 43, page suivante).

En présence d'HBSS, l'EGS et la salive semblent activer les neutrophiles (figures 44, page suivante, et 45 page 58). La variabilité des résultats ne permet pas d'établir de différences statistiques avec la migration observée avec l'HBSS seul.

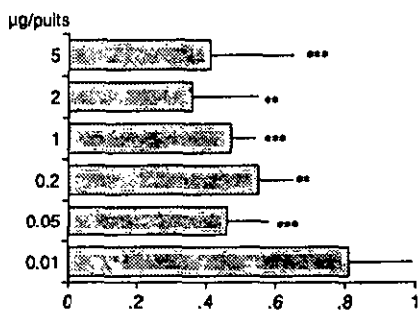


Figure 42: Migration de neutrophiles en présence de SAct et d'EGS.
 Rapport: SAct + EGS/ SAct seul. Moyennes \pm SE.
 ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; par rapport au SAct seul

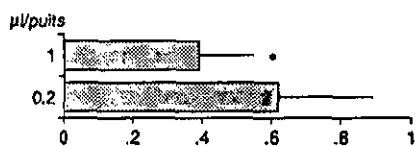


Figure 43: Migration de neutrophiles en présence de SAct et de salive.
 Rapport: SAct + salive/ SAct seul. Moyennes \pm SE.
 * $p < 0.05$

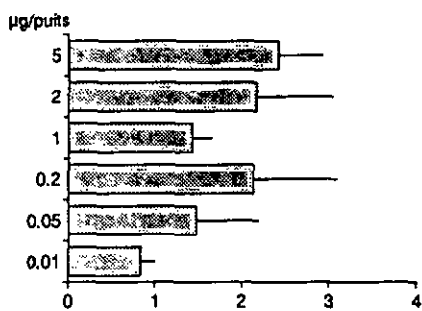


Figure 44: Migration de neutrophiles en présence de HBSS et d'EGS.
 Rapport: HBSS + EGS/ HBSS seul. Moyennes \pm SE.

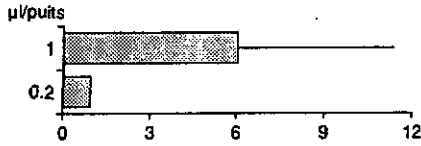


Figure 45: Migration de neutrophiles en présence de HBSS et de salive. Rapport: HBSS + salive/ HBSS seul. Moyennes \pm SE.

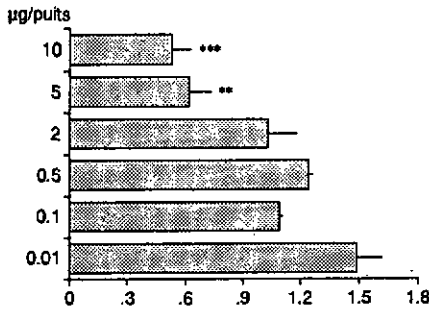


Figure 46: Migration de neutrophiles en présence de SACT et d'ET. Rapport: SACT + ET/ SACT seul. Moyennes \pm SE. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

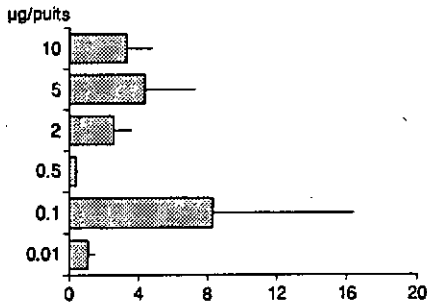


Figure 47: Migration de neutrophiles en présence de HBSS et d'ET. Rapport: HBSS + ET/ HBSS seul. Moyennes \pm SE.

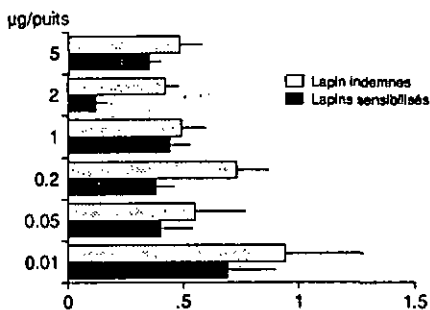


Figure 48: Migration de neutrophiles. Effet du contact de l'hôte avec les tiques. Rapport: SAct + EGS/ SAct seul. Moyennes \pm SE.

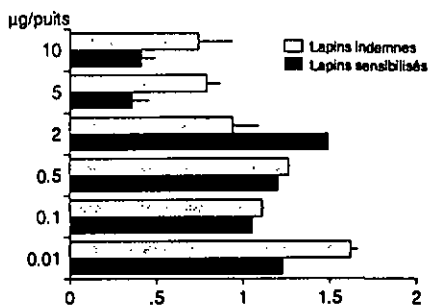


Figure 49: Migration de neutrophiles. Effet du contact de l'hôte avec les tiques. Rapport: SAct + ET/ SAct seul. Moyennes \pm SE.



Figure 50: Migration de neutrophiles. Effet du contact de l'hôte avec les tiques. Rapport: SAct + salive/ SAct seul. Moyennes \pm SE.

Dans le cas de l'ET, seules les concentrations de 5 et 10 μ g/puits diminuent significativement la migration en présence de SAct (figure 46, page 58). L'extrait en présence d'HBSS semble activer la motilité des cellules (figure 47, page 58).

L'inhibition de la migration des neutrophiles provoquée par les extraits antigéniques est dépendante d'un contact préalable des lapins avec les tiques. Ainsi, l'effet inhibiteur de l'EGS et l'ET sur la migration des cellules est plus important lorsque celles-ci proviennent de lapins sensibilisés ($p < 0.05$, figures 48 et 49). En ce qui concerne la salive (figure 50), l'inhibition semble au contraire plus prononcée sur les cellules des lapins indemnes (effet non significatif).

La migration des neutrophiles face au HBSS en présence d'EGS et d'ET (figure 51a et b, page suivante) paraît plus intense pour les animaux indemnes. Alors que le test effectué avec la salive montre à nouveau une tendance inverse (figure 51c). Cependant, vu l'importance des variations individuelles, aucune des différences observées n'est statistique.

N.B. L'inhibition de la migration provoquée par les antigènes n'est pas due à un effet toxique. La viabilité des cellules, testée avec le Bleu de Trypan, n'est pas diminuée par les antigènes aux concentrations utilisées.

3.4.4. Discussion

Certaines des expériences relatées dans ce chapitre complètent les tests de transformation lymphoblastique réalisés précédemment pour suivre l'évolution de la réponse cellulaire des bêtes.

Incubés sans mitogène, l'EGS et la salive ne stimulent pas les cellules d'animaux indemnes. En présence de conA, l'EGS induit une diminution significative de la réponse de ces mêmes lymphocytes à partir de 4 μ g/puits. Ramschandra et Wikel (1992) observent ce type d'inhibition sur des lymphocytes spléniques de souris avec un extrait de glandes salivaires de femelles de *D. andersoni*. La baisse de prolifération est d'au moins 50% pour des extraits prélevés aux jours 1 à 9 du repas sanguin, et testés à la concentration de 1 μ g/puits. Les auteurs mettent ces résultats en rapport avec l'inhibition de la réponse à la PHA observée avec des cellules prélevées chez des cobayes infestés par *D. andersoni* (Wikel, 1982c). Le parallèle est tentant puisque nous avons également remarqué une diminution temporaire de la prolifération des lymphocytes en présence de conA chez des lapins en cours d'infestation. Cependant, dans notre test *in vitro*, à des concentrations équivalentes (4 μ g/puits et 10 μ g/puits), l'EGS n'inhibe pas les lymphocytes de lapins sensibilisés aux tiques. Utilisé sans conA, il stimule même ces cellules. L'effet de cet extrait antigénique sur les lymphocytes est donc très différent selon qu'ils proviennent d'un animal indemne ou sensibilisé.

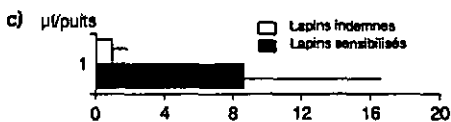
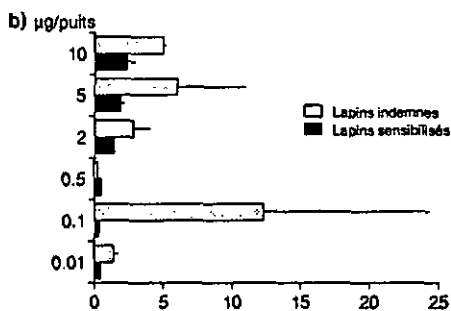
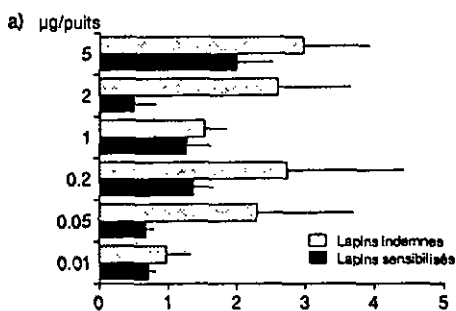


Figure 51: Migration de neutrophiles. Effet du contact de l'hôte avec les tiques. Rapport: HBSS + antigène/ HBSS seul. Moyennes \pm SE. a): EGS; b): ET; c): salive.

La salive stimule les lymphocytes de lapins sensibilisés, mais n'induit pas de diminution de la réponse à la conA sur les cellules de lapins indemnes comme pour l'EGS. Les deux extraits sont sans doute apparentés du point de vue biochimique et antigénique. Cependant, l'EGS contient des protéines normalement absentes de la salive sécrétée, comme des protéines de structure qui pourraient être inhibitrices. La salive de *I.dammini* inhibe la prolifération et la production d'IL-2 d'un hybridôme de cellules T stimulé par des anticorps anti-Thy-1 (Ribeiro *et al.*, 1985). Selon ces auteurs, la suppression serait principalement due à la PGE₂ salivaire. Cette substance n'a pas encore été démontrée dans la salive de *I.ricinus*. Il se pourrait aussi que les volumes de salive utilisés soient trop faibles pour provoquer un effet équivalent à l'EGS ou à la salive d'*I.dammini*.

Contrairement aux deux autres antigènes, l'ET a un effet faiblement mitogénique pour les lymphocytes de lapins indemnes, mais qui est négligeable en comparaison de la réponse obtenue avec les cellules des animaux sensibilisés. En présence de conA, l'ET influence peu les résultats. Seule la concentration de 20µg/puits diminue la prolifération des lymphocytes de lapins indemnes.

Les résultats des tests de migration des neutrophiles varient considérablement d'un individu à l'autre. Pourtant, les effets statistiquement confirmés sont intéressants. Les extraits de tiques provoquent une diminution significative de la migration des neutrophiles en présence de SAct. Le phénomène est dépendant du statut de l'hôte (indemne ou sensibilisé), car l'inhibition est plus élevée avec des neutrophiles de lapins sensibilisés aux tiques.

La réponse des neutrophiles d'animaux sensibilisés à un parasite, en présence d'un facteur chimiotactique non spécifique, diffère selon le modèle étudié. La migration de neutrophiles et de macrophages de souris infectées par *Echinococcus multilocularis* est progressivement inhibée à mesure que l'infection se développe (Alkarmi et Behbehani, 1989). Par contre, des neutrophiles de souris infectées par *Trichinella pseudospirallis* ont une activité plus élevée et sont plus nombreux à migrer que des neutrophiles de souris indemnes (Shupe et Stewart, 1991). Ribeiro *et al.* (1990) ont étudié les effets de la salive d'*I.dammini* sur des neutrophiles péritonéaux de rat. Celle-ci inhibe l'agrégation des cellules, induite *in vitro* par des anaphylatoxines, ainsi que leur activation, ce qui pourrait faciliter le repas sanguin des tiques. Cette salive possède d'ailleurs une activité anti-anaphylatoxique (Ribeiro et Spielman, 1986).

Dans le cas d'*I.ricinus*, l'inhibition observée avec la salive et l'EGS pourrait, de façon similaire, être due à une inactivation du C5a, facteur chimiotactique du SAct. Un effet direct des antigènes sur les neutrophiles est aussi envisageable car l'inhibition est un peu plus accentuée lorsque l'antigène est incubé avec les cellules plutôt qu'ajouté au SAct (résultats non présentés).

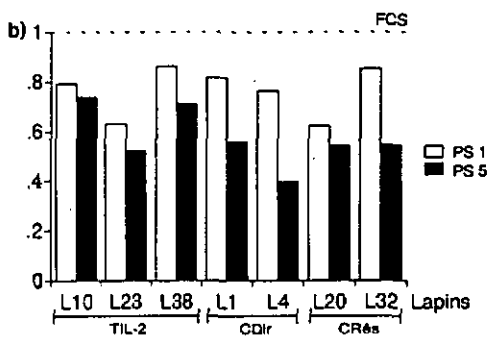
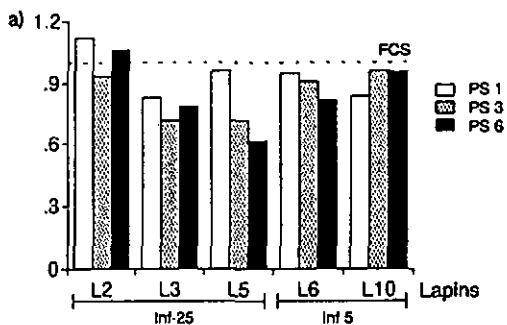


Figure 52: Effet de sérums sur des lymphocytes de lapins indemnes, en présence de conA.
 a) Sérums de l'expérience "charge parasitaire" (chap. 3.1.4.)
 b) Sérums de l'expérience "IL-2" (chap. 3.2.2.)
 Les résultats sont exprimés par rapport à la prolifération obtenue avec le FCS.
 PS1 : prise de sang faite svant expérience. Les autres PS ont été effectuées selon le protocole décrit dans les expériences 3.1.4. et 3.2.2.

Il est difficile de déterminer ici quel protagoniste, de l'hôte ou de la tique, ce phénomène inhibiteur favorise. D'autre part, l'EGS et la salive sont chimiotactiques pour les neutrophiles (voir figures 44 et 45). Nous pourrions conclure que les antigènes injectés par les ectoparasites attirent les neutrophiles aux sites de fixation, puis les empêchent de recirculer. La présence de neutrophiles aux alentours du rostre des tiques, intervenant dans la formation d'une cavité de nutrition, n'est pas défavorable à ces ectoparasites (Tatchell et Moorhouse, 1970).

3.5. Effets du sérum de lapins sensibilisés aux tiques sur la prolifération de lymphocytes d'animaux indemnes ou sensibilisés

3.5.1. Remarque

Des essais préliminaires effectués avec les sérums de quelques lapins des expériences décrites aux chapitres 3.1.4 (figure 52a) et 3.2.2. (figure 52b) montrent que les sérums prélevés pendant l'infestation des animaux (ps3, ps5 ou ps6) diminuent en général la réponse à la conA de lymphocytes de lapins indemnes de manière plus intense que les sérums prélevés avant infestation (ps1). Ce phénomène ne semble pas dépendre de la charge parasitaire appliquée aux lapins. Les résultats obtenus sont généralement plus bas avec les sérums des lapins qu'avec le FCS (rapport égal à 1 sur les figures).

Afin de compléter et de préciser ces observations, tous les sérums de l'expérience "IL-2" (chapitre 3.2.4.) ont été testés. Selon le protocole décrit précédemment (chapitre 2.4.3), les lapins de cette expérience ont été soumis à quatre prises de sang successives: avant infestation (ps1), pendant le repos des tiques (ps2), juste après la fin de l'infestation (ps3), et une dernière prise après 25 jours d'expérience (ps4). Pour une même prise de sang, les résultats individuels sont similaires. Ils ont été groupés pour l'analyse statistique. Seules les moyennes et les erreurs standards sont présentées dans les figures 53 et 54.

3.5.2. Effet sur des lymphocytes de lapins indemnes

La prolifération en présence de conA est significativement plus basse si les tests sont effectués avec les sérums des lapins au lieu du FCS ($p < 0.001$) (barres claires, figure 53, page suivante). Les sérums prélevés en cours d'infestation (ps2), ou juste après (ps3) ont un effet inhibiteur sur les lymphocytes significativement plus grand que les sérums des prises de sang ps1 et ps4 ($p < 0.05$).

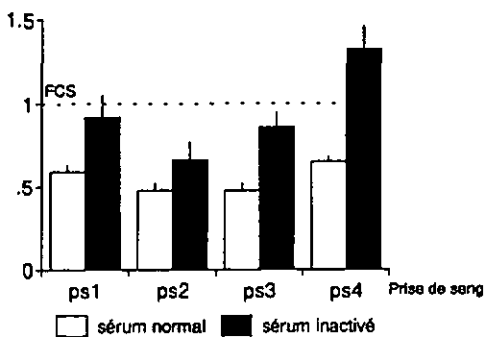


Figure 53: Comparaison des résultats obtenus avec les sérums avant et après inactivation par la chaleur, avec des cellules de lapins indemnea. Moyennes \pm SE des proliférations mesurées en présence de conA pour chaque prise de sang. Résultats exprimés par rapport au FCS.

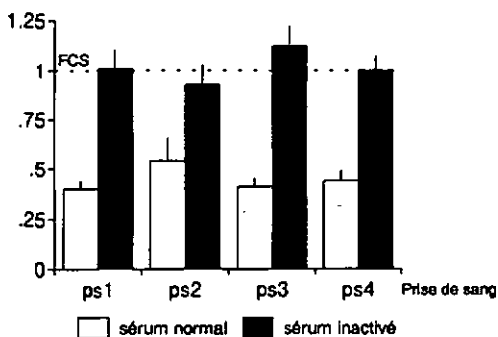


Figure 54: Comparaison des résultats obtenus avant et après inactivation des sérums à la chaleur, avec des cellules de lapins sensibilisés, en présence d'EGS. Moyennes \pm SE des proliférations mesurées pour chaque prise de sang.

Après un chauffage à 56°C pendant 30 minutes, les mêmes sérums sont ajoutés aux cultures de lymphocytes de lapins indemnes en présence de conA (barres foncées, **figure 53**). Le traitement a pour conséquence une augmentation généralisée de la prolifération. Seules les données concernant la prise de sang ps2 restent significativement inférieures à celles obtenues avec le FCS ($p < 0.01$). Elles sont également plus basses que les valeurs mesurées pour les trois autres prises de sang ($p < 0.05$). D'autre part, les sérums prélevés en ps4 stimulent significativement la réponse des lymphocytes par rapport aux sérums des autres prises de sang ($p < 0.05$ au moins).

Une comparaison des résultats avant et après inactivation (**figure 53**) montre que la réponse des cellules est significativement augmentée lorsque les sérums ont été préalablement chauffés ($p < 0.001$). Seul l'effet inhibiteur observé en ps2 (prise de sang effectuée pendant l'infestation) demeure.

3.5.3. Effet sur des lymphocytes de lapins sensibilisés

L'effet des sérums sur les lymphocytes d'animaux sensibilisés est contrôlé en présence d'EGS. La **figure 54** (barres claires) montre que les sérums inhibent fortement la réponse spécifique des cellules à l'antigène, en comparaison des résultats obtenus avec le FCS ($p < 0.001$). Mais contrairement à ce que nous avons observé au paragraphe précédent, les valeurs mesurées pour chaque prise de sang ne sont pas différentes entre elles.

L'inhibition semble ici totalement indépendante du contact avec les tiques, puisqu'elle est déjà présente avec les sérums ps1, prélevés sur les lapins indemnes, et n'est pas accentuée avec les sérums des prises de sang suivantes.

Le chauffage des sérums à 56°C rétablit la prolifération des cellules à un niveau comparable à celui observé avec le FCS (barres foncées, **figure 54**). L'activité inhibitrice des sérums semble ici entièrement thermolabile. Les résultats sont ainsi significativement plus élevés que pour des sérums sans traitement à la chaleur ($p < 0.001$).

3.5.4. Discussion

Le sérum des lapins inhibe, quel que soit le moment de la prise de sang, la prolifération de lymphocytes de lapins indemnes ou sensibilisés. Leur inactivation par la chaleur rétablit généralement une réponse lymphocytaires à la conA et à l'EGS comparable à celle obtenue avec du FCS. L'inhibition serait principalement due à l'action sur les lymphocytes de facteurs thermolabiles, dont font partie certains composants du système complément. Cependant, si l'on se réfère aux résultats concernant les prises de sang ps2 et ps3 en présence de conA, d'autres facteurs

suppresseurs, résistants à la chaleur, semblent circuler dans le sang des lapins pendant les infestations, et disparaître progressivement après la fin du repas sanguin.

Des principes inhibiteurs, insensibles à un traitement à la chaleur à 56°C, ont aussi été démontrés dans les plasmas de patients parasités par *Schistosoma mansoni* (Kamal et Higashi, 1982). Les auteurs incriminent des complexes immuns non spécifiques ou spécifiques dans l'inhibition de la réponse mitogénique de lymphocytes humains non sensibilisés. Dans le cas de bovins infectés par *Mycobacterium johnei* (Johne's disease), Davies *et al.* (1974) situent l'activité inhibitrice dans une fraction sérique riche en IgG. La suppression observée serait due à l'action d'auto-anticorps. Pour Hirah *et al.* (1975), l'effet inhibiteur des sérums de chiens souffrant d'une démodicose généralisée pourrait être attribuée soit à un facteur sérique inconnu, soit à des complexes antigènes-anticorps. Cet effet disparaît à la rémission de la maladie.

Dans notre expérience, une activité inhibitrice thermostable est présente au moins au cinquième jour de la première infestation (ps2), ce qui rend aléatoire la participation des IgG au phénomène. D'autres facteurs pourraient intervenir, tels que des complexes immuns non spécifiques, des substances contenues dans la salive des tiques, ou des médiateurs produits par les hôtes en réponse à la piqûre des ectoparasites (prostaglandines, par exemple).

Le principe inhibiteur des sérums ps2 n'est observé qu'en présence de conA et avec des cellules de lapins indemnes. La réponse spécifique à l'EGS des lymphocytes d'animaux sensibilisés n'est pas affectée, ce qui nous rappelle les observations faites sur l'effet direct des antigènes dans les tests de transformation lymphoblastique: l'EGS, avec ou sans conA, diminue la prolifération de cellules de lapins indemnes, mais pas celle des lymphocytes de lapins sensibilisés.

En conclusion, le sérum des lapins en cours d'infestation pourrait contenir un ou plusieurs facteurs capables de limiter la réponse cellulaire tout en favorisant le repas sanguin. Cette activité inhibitrice ne semble cependant pas affecter la réponse spécifique des lymphocytes avec les antigènes de tiques. Elle aurait peu d'effet sur les mécanismes d'induction de la résistance et sur la phase effectrice de la réponse immunitaire anti-tiques.

4. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Les résultats de ce travail ont permis de montrer que:

a) Le degré de résistance des lapins, ainsi que leurs réponses cellulaires et humorales, sont dépendants de la charge parasitaire. Celle-ci détermine aussi la rapidité avec laquelle les hôtes développent une forte résistance contre les ectoparasites.

b) L'IL-2 joue un rôle central dans l'acquisition d'une forte résistance anti-tiques par les lapins. Elle contrôle l'activation des cellules effectrices importantes pour la protection de l'hôte, tout en initiant des perturbations du cycle de vie des ectoparasites.

c) Le TNF- α , composant important des réactions inflammatoires cutanées, semble faciliter le repas sanguin des tiques, et perturber la mise en place des mécanismes de résistance.

d) La glande salivaire d'*I. ricinus* contient des principes inhibiteurs de la prolifération *in vitro* des lymphocytes d'animaux indemnes à la conA, et de la migration des neutrophiles, ce qui pourrait *in vivo* favoriser le repas sanguin des tiques. Par contre, la réponse des lymphocytes d'animaux sensibilisés est stimulée par les antigènes salivaires. Ainsi, ces substances n'ont pas d'effet sur la réponse spécifique des hôtes. Elles ne semblent pas perturber le développement normal de la résistance.

La réponse du lapin face aux tiques peut être considérée comme la somme de phénomènes inflammatoires (généralement non spécifiques), et immunitaires (spécifiques). La figure 55 (page suivante), modifiée d'après Kaufman (1989), présente un essai de synthèse des réponses dans le modèle *I. ricinus*/lapin, sur lequel est basée la discussion générale de nos résultats.

a) En primo-infection, les tiques fixées à l'hôte provoquent une réaction inflammatoire caractérisée principalement par une infiltration massive de neutrophiles, qui sont responsables de la formation d'une lésion de nutrition (Tatchell et Moorhouse, 1970; Brossard et Fivaz, 1982). La réponse inflammatoire non spécifique semble plutôt favorable aux tiques qui prélèvent des quantités de sang importantes, et présentent des rendements de ponte élevés. Cette réponse semble même être nécessaire aux ectoparasites. Les résultats de l'expérience 3.1, sur les

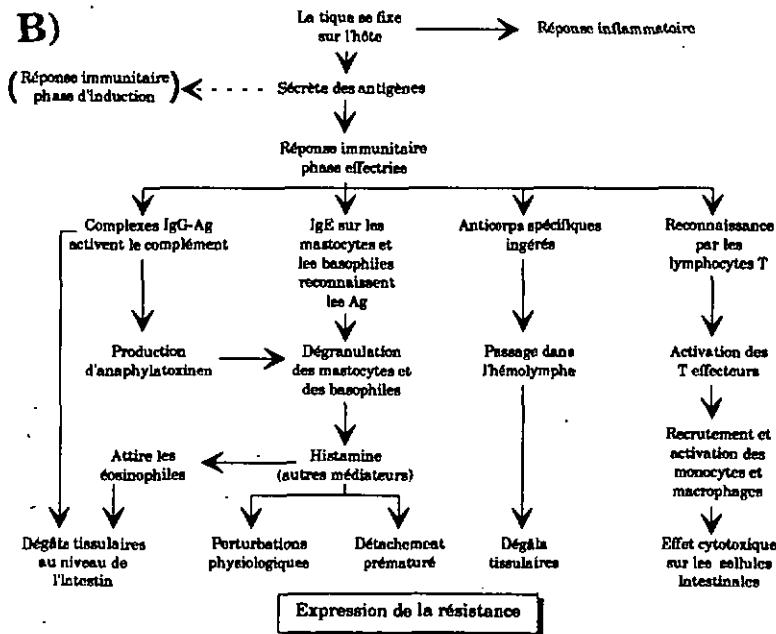
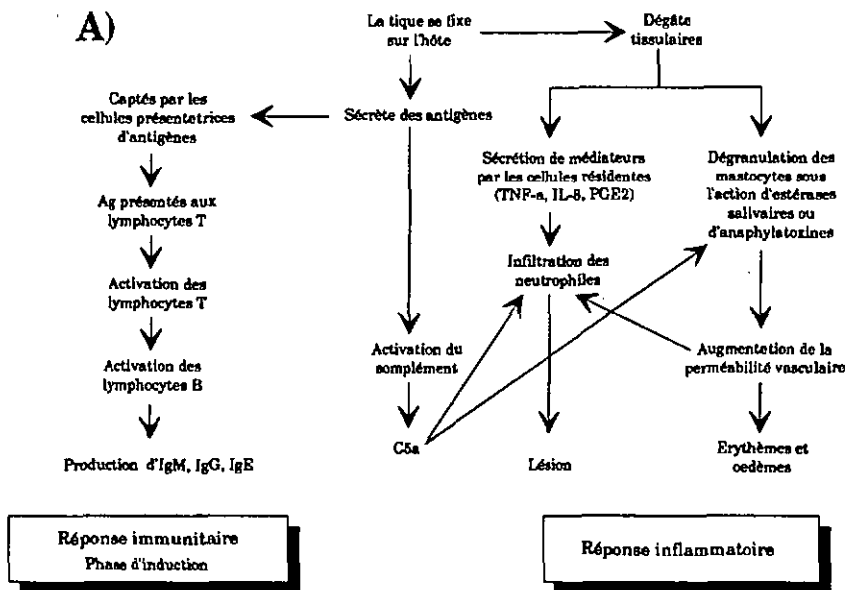


Figure 55

effets de la charge parasitaire, montrent que les tiques sont en moyenne plus grosses lorsqu'elles sont nombreuses à se nourrir simultanément. Le TNF- α , cytokine proinflammatoire, favorise la prise d'un repas copieux lorsqu'il est injecté par voie intraveineuse aux lapins pendant le repas sanguin. La libération de faibles quantités d'histamine par les mastocytes et la présence de PGE₂ dans la salive des tiques pourraient améliorer le flux sanguin au niveau de la lésion, sans causer de perturbations de la nutrition. Le poids des tiques gorgées en première infestation sur des lapins traités avec un antihistaminique comme la mépyramine ne diffère pas statistiquement de celui des tiques provenant des animaux témoins (Brossard, 1982), mais il est tout de même inférieur (198mg en moyenne chez les traités, contre 235mg pour les témoins). Le blocage des récepteurs H₁ par la drogue inhibe l'activité vasodilatatrice de l'amine (Pearce, 1992), ce qui semble freiner légèrement la nutrition des tiques.

Pendant la première infestation se déroule également la phase d'induction de la réponse immunitaire. Cette étape est primordiale, car elle va déterminer le degré de résistance des hôtes durant une réinfestation. Dans notre expérience sur la charge parasitaire, nous avons montré que l'intensité des réponses cellulaire et humorale en seconde infestation, dépendait du nombre de tiques s'étant nourries sur ces animaux lors de la première infestation. Une injection d'IL-2 pendant cette phase d'induction résulte, lors de la phase effectrice de la réponse, dans l'expression d'une résistance amplifiée contre les tiques.

b) Pendant la réinfestation, l'effet bénéfique pour les ectoparasites des réactions inflammatoires non spécifiques est fortement contrebalancé par des mécanismes immunitaires spécifiques. Les anticorps IgG, ingérés par les tiques, peuvent traverser leur paroi intestinale, et ainsi perturber le fonctionnement des organes internes (Brossard et Rais, 1984). Ils se complexeraient aussi à l'intestin, en y occasionnant des dommages (Girardin, 1987). La digestion de l'hémoglobine est altérée chez les tiques nourries sur des animaux résistants (Papatheodorou, 1984). Basophiles et mastocytes dégranulent au cours d'un phénomène d'hypersensibilité de type I (Brossard et Fivaz, 1982). Les médiateurs, dont l'histamine, libérés en grandes quantités, provoqueraient un rejet des tiques, ou des perturbations de leur nutrition (Paine *et al.*, 1983).

Les antigènes injectés activent les cellules responsables des réactions d'HRT. En premier lieu, des lymphocytes T spécifiques libéreraient des lymphokines (surtout de l'INF- τ), qui attireraient et activeraient les monocytes dans les sites de fixation des tiques. Ces cellules sont les principales effectrices de l'HRT (Benjamini et Leskowitz, 1991), tout en présentant des capacités de phagocytose, une activité respiratoire (libération de radicaux peroxyde et superoxyde) et une cytotoxicité directe augmentées. Des altérations graves de l'épithélium intestinal des ectoparasites en résulteraient. L'HRT est un élément important de la résistance anti-tiques. Elle augmente lors de réinfestations (Girardin et Brossard, 1985). L'inhibition de l'HRT par la cyclosporine A va de pair avec une diminution marquée de la protection de l'hôte contre les ectoparasites (Girardin et Brossard, 1989, 1990).

Ainsi, la réponse immunitaire de l'hôte est défavorable aux tiques. Dans l'expérience sur la charge parasitaire, nous avons montré que les lapins infestés par vingt-cinq paires d'*I. ricinus* sont plus résistants en seconde infestation que les animaux infestés par cinq paires. L'injection d'une quantité plus grande d'antigènes stimule plus efficacement la réponse immunitaire et la formation d'un plus grand nombre de cellules à mémoire. En seconde infestation, de nombreuses cellules immunitaires sont ainsi mobilisées rapidement et la production d'anticorps est plus élevée. La quantité d'antigènes injectés lors d'une réinfestation massive (25 paires par rapport à 5 paires de tiques) stimule d'autant plus cette réponse, et induit une perturbation plus prononcée de la biologie des ectoparasites.

Les résultats du traitement à l'IL-2 soulignent l'importance de la réponse immunitaire de l'hôte (par opposition à la réponse inflammatoire) dans la protection contre les tiques. Les injections effectuées en première infestation permettent vraisemblablement une augmentation du nombre de cellules à mémoire. Les cellules T qui fixent un antigène, prolifèrent sous l'influence de l'IL-2 pendant un nombre de cycles limité (Ruscetti, 1990). L'apport expérimental d'IL-2 supplémentaire, directement accessible, pourrait accélérer et augmenter l'expansion clonale de ces cellules. Elles seraient plus nombreuses en réinfestation à reconnaître les antigènes de tiques. La phase effectrice de la réponse serait ainsi amplifiée, la protection antiparasitaire obtenue plus efficace. Dans notre étude, les lapins traités à l'IL-2 sont effectivement plus résistants que les animaux témoins. Le traitement augmente aussi les réactions d'HRT.

L'injection de TNF- α pendant une réinfestation, augmente sans doute la réponse inflammatoire de l'hôte, et favorise ainsi le repas des ectoparasites. En effet, la résistance est plus faible chez les lapins traités que chez les témoins.

Le TNF- α produit localement par les mastocytes ou les monocytes infiltrants, stimulerait la production de PGE₂ par les fibroblastes, les neutrophiles et les monocytes/macrophages présents autour du rostre des tiques. Une des propriétés de la PGE₂ est de contrôler l'intensité des réponses immunitaires en inhibant la production d'IL-2 par les lymphocytes T, limitant ainsi l'expansion clonale et l'activation de cellules pouvant intervenir dans la défense de l'hôte (Swain, 1992). Elle inhibe aussi l'expression des molécules d'histocompatibilité de classe II, interférant ainsi dans les mécanismes de présentation de l'antigène aux cellules T (Pettipher et Whittle, 1992).

Egalement présente dans la salive des tiques (Ribeiro, 1987), la PGE₂ serait une molécule majeure de régulation de la réponse de l'hôte contre les ectoparasites. Dans notre étude, elle pourrait être responsable de l'atténuation de la résistance chez les lapins traités au TNF- α .

L'essai de synthèse des réponses inflammatoires et immunitaires décrit ci-dessus est certainement trop simple pour tenir compte de toutes les interactions cellulaires aux sites de fixation des tiques. Néanmoins, les résultats obtenus au cours de ce travail, compris dans l'ensemble des connaissances sur les relations entre les tiques et leurs hôtes, suggèrent la présence d'un équilibre entre deux systèmes: l'un favorable aux ectoparasites, l'autre assurant la protection de l'hôte.

5. RÉSUMÉS

5.1. Résumé

Les relations entre la tique *Ixodes ricinus* et le lapin ont été examinées dans des expériences cherchant à moduler la réponse immunitaire de l'hôte, afin d'en mieux comprendre les mécanismes.

La première expérience a précisé les effets de la charge parasitaire sur l'acquisition de la résistance. Deux groupes de lapins sont infestés à deux reprises avec un nombre différent de tiques adultes: un groupe (Inf-25) par vingt-cinq couples de tiques, l'autre (Inf-5) par cinq paires. Une troisième infestation est effectuée avec quinze couples dans les deux groupes. Le degré de résistance acquis par les hôtes est comparé au travers de l'examen de la biologie des tiques récoltées.

A la seconde infestation, les tiques nourries sur les lapins Inf-25 présentent de sévères perturbations de leur biologie: la nutrition, la ponte et l'embryogenèse sont fortement diminuées par rapport à la première infestation. Chez les lapins Inf-5, les effets de la résistance sont beaucoup moins prononcés et n'affectent statistiquement que le poids des tiques gorgées. En troisième infestation, l'immunité n'augmente significativement que dans le groupe Inf-5. Dans le groupe Inf-25, les paramètres mesurés reviennent à des valeurs proches de celles observées en première infestation, laissant présumer l'intervention de phénomènes immunosuppresseurs dus aux ectoparasites.

La réponse cellulaire des lapins est examinée *in vitro* dans un test de transformation lymphoblastique en présence d'un extrait de glandes salivaires (EGS) ou d'un extrait tégumentaire (ET) de femelles *I. ricinus* adultes. Celle-ci est plus élevée chez les animaux du groupe Inf-25 pendant les deux premières infestations. En troisième infestation, la prolifération est meilleure pour les cellules des lapins Inf-5, qui sont aussi à ce moment les plus résistantes. La réponse proliférative des lymphocytes en présence de conA est similaire dans les deux groupes. Elle diminue temporairement pendant la durée du repas sanguin, lorsque les tiques sont sur l'hôte.

La production d'anticorps IgG contre l'EGS et l'ET, mesurée par ELISA, reste toujours plus élevée chez les lapins du groupe Inf-25.

La charge parasitaire semble ainsi influencer la réponse cellulaire et humorale des hôtes aux antigènes de tiques, et la résistance qui en résulte.

Dans une seconde expérience, l'effet d'un traitement à l'interleukine-2 (IL-2) sur l'immunité des lapins a été mesuré. Les groupes définis précédemment sont conservés. Un groupe de lapins (TIL-2) reçoit des injections sous-cutanées d'IL-2 recombinante humaine pendant une première infestation avec cinq couples d'adultes de *I. ricinus*. Deux autres groupes servent de contrôles: un groupe infesté par cinq paires de tiques (contrôle direct CDir) et l'autre par vingt-cinq paires (contrôle représentatif d'une forte résistance CRés). Une seconde infestation avec vingt-cinq couples est effectuée dans les trois groupes.

Les lapins TIL-2 développent une meilleure résistance que les animaux des deux groupes témoins. Le poids des tiques gorgées et la fréquence de ponte sont significativement plus bas dans le groupe TIL-2 que dans les groupes CDir et CRés. Les différences les plus prononcées sont observées entre les animaux traités et ceux du groupe contrôle direct CDir.

La production d'anticorps anti-tiques ainsi que la prolifération lymphocytaire en présence d'EGS sont plus faibles dans le groupe TIL-2 que dans les autres groupes. L'expérience a été répétée avec un autre lot de lapins afin de mesurer les réactions d'hypersensibilité retardée de type tuberculitique (HRT). Dans un test cutané, 60% des individus traités avec la lymphokine présentent des réactions d'HRT à l'EGS significativement plus élevées que chez les témoins.

L'IL-2 stimulerait principalement l'immunité à médiation cellulaire des hôtes. Elle favoriserait la production de cellules à mémoire pendant la phase d'induction de la réponse (première infestation), et permettrait ainsi le développement d'une forte résistance, dès la seconde infestation, chez des animaux pourtant faiblement infestés.

Dans l'expérience suivante, nous avons observé les effets d'un traitement par une cytokine proinflammatoire, le tumor necrosis factor-alpha (TNF- α).

Dans un premier volet de l'expérience, un groupe de lapins est vacciné contre la cytokine avant de subir deux infestations successives de vingt-cinq paires d'adultes de *I. ricinus*. En première infestation, la moyenne du poids des tiques gorgées sur les animaux vaccinés est inférieure à celle mesurée dans le groupe témoin, en raison d'un fort pourcentage de tiques dont le poids est inférieur à 100mg. En seconde infestation, par contre, les effets de la résistance sur la biologie des tiques sont moins importants dans le groupe vacciné. Du point de vue de la réponse immunitaire, les groupes se différencient surtout par une prolifération lymphocytaire et un titre de C3 sérique plus élevés chez les lapins vaccinés.

Dans le second volet de l'expérience, les lapins reçoivent des injections intraveineuses de TNF- α à chaque infestation, pendant le repas sanguin des tiques. Celles-ci, récoltées au cours de deux infestations successives, sont plus grosses et pondent mieux dans le groupe traité avec la cytokine que dans le groupe témoin. La réponse cellulaire des lapins à l'EGS, mesurée par transformation lymphoblastique, reste plus élevée chez les animaux traités. Les autres paramètres, production d'anticorps, C3 sérique, migration de neutrophiles sont équivalents dans les deux groupes.

Le traitement au TNF- α semble favoriser la biologie des tiques, au détriment des hôtes. Cette cytokine est normalement présente dans les réactions inflammatoires

cutanées, comme celles provoquées par les tiques. Elle pourrait induire, entre autres, la libération dans les sites de fixation des ectoparasites, de facteurs (prostaglandine E_2 , etc) pouvant inhiber la réponse immunitaire.

Enfin, des expériences *in vitro* montrent que les antigènes de tiques et le sérum de lapins prélevé en cours d'infestation possèdent des activités inhibitrices agissant sur la prolifération des cellules d'animaux indemnes et la migration des neutrophiles. *In vivo*, ces activités pourraient faciliter le repas sanguin des ectoparasites.

Mots clés: *Ixodes ricinus*, tiques, lapin, immunité, inflammation, immunomodulation, charge parasitaire, IL-2, TNF- α , réponse humorale et cellulaire, transformation lymphoblastique, migration de neutrophiles.

5.2. Summary

The relationship between *Ixodes ricinus* adult ticks and rabbits were studied by modulating the host's response.

The first experiment examined the changes in immunity of rabbits infested with either twenty-five (Inf-25) or five (Inf-5) adult pairs. The groups of rabbits were infested twice. A third infestation was performed in both groups with fifteen adult pairs. Tick biology was monitored to analyze the resistance of the host.

During the second infestation, the feeding and the egg production were more perturbed in ticks fed on Inf-25 rabbits. In addition in this group, the embryogenesis was affected. During the third infestation, resistance increased only in Inf-5 rabbits. In Inf-25 rabbits, immunity no longer affected egg laying, and bloodmeal also improved. This reduced resistance could be due to tick-induced immunosuppression. The blastogenic response of peripheral blood lymphocytes and antibody production against ticks was assessed. A salivary gland extract (EGS) and an integumental antigen (ET) from *I. ricinus* adult females initiated lymphocyte proliferation. The response was significantly higher in Inf-25 rabbits, especially at the end of the second infestation, and higher in the Inf-5 rabbits during the third infestation. Non-specific proliferation with concanavalin A temporarily decreased in both rabbit groups during the first and the second infestation.

Specific antibody response to EGS and ET was always the higher in Inf-25 rabbits. Thus, the parasite burden appears to influence the cellular and humoral response of the host and the resulting resistance.

The second experiment considered the importance of interleukin-2 (IL-2) in the immune response displayed by rabbits against the ectoparasites. Rabbits were treated with subcutaneous injections of human recombinant IL-2 (TIL-2) during the first infestation with five adult pairs *I. ricinus*, while untreated controls were infested

by either five (direct control CDir) or twenty-five pairs (resistant control CRés). During the second infestation with twenty-five pairs in each group, the TIL-2 rabbits became more resistant than the two untreated control groups.

Better resistance was manifested by lower engorgement weights and by fewer ovipositing ticks. TIL-2 rabbits had lower anti-tick antibody titres and lower lymphocyte proliferation to EGS than the control rabbits. In contrast, the highest cutaneous responses to EGS were observed in the TIL-2 group. IL-2 appeared to mainly enhance the cell-mediated response of the rabbit immune system. It may stimulate an increase in the production of memory cells during the induction phase of the immune response (first infestation), allowing the development of a strong resistance in poorly infested rabbits.

During the third experiment, the effects on the immune response of rabbits of a proinflammatory cytokine, the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), were investigated. Animals were first vaccinated against TNF- α before two successive infestations with twenty-five pairs of adult *I. ricinus* ticks.

During the first infestation, the frequency of abnormally fed ticks (weighing less than 100mg) was significantly higher in vaccinated rabbits than in the control group. In contrast during the second infestation, the feeding and the oviposition performances were better in ticks that fed on vaccinated rabbits.

Immune response in both groups only differed by better lymphoblastic response to EGS and higher C3 titre in vaccinated rabbits.

TNF- α was next inoculated intravenously into rabbits during the course of two successive infestations. Tick biology was always better in the treated group.

Lymphocyte responsiveness to EGS remained higher in treated rabbits, but other parameters such as antibody and C3 production, and neutrophils migration were similar in both groups. The potential role of the TNF- α is discussed with respect to the fact that the cytokine seems to improve the biology of the ticks that feed on the treated animals. This cytokine may induce the release of factors (prostaglandin E₂, etc.) into the ticks fixation sites, that may inhibit the immune response of the hosts.

In the last experiments, tick antigens and sera collected from rabbits during an infestation had inhibitory activities *in vitro* against lymphocyte and neutrophil functions, that may facilitate the feeding of the ectoparasites *in vivo*.

Key words: *Ixodes ricinus*, ticks, rabbit, immunity, inflammation, immunomodulation, parasite burden, IL-2, TNF- α , humoral and cellular response, lymphoblastic transformation, neutrophils migration test.

ANNEXES**ANNEXE I: Infestation des lapins et récolte des tiques**

Dans le cas d'infestations successives, les tiques (un nombre égal de femelles et de mâles) sont placées alternativement sur l'une ou l'autre des oreilles du lapin. Les infestations massives pour la production d'antigènes sont faites simultanément sur les deux oreilles. L'oreille infestée est recouverte d'un fourreau de doublure blanche fermé hermétiquement aux extrémités par une bande adhésive (Thésa). Un collier de plastic empêche le lapin de se gratter l'oreille. Seules les femelles seront récoltées, car les mâles ne se nourrissent généralement pas et ne servent qu'à la copulation (Balashov, 1972). En effet, les femelles ont besoin d'être fécondées pour atteindre un gorgement optimal leur permettant d'accomplir leur cycle parasitaire (Graf 1978c). Notons que la copulation peut avoir lieu en dehors de l'hôte, avant le repas sanguin (Graf 1978b).

Les femelles détachées sont récupérées matin et soir, pesées et placées dans des tubes en verre contenant un morceau de buvard, et fermés par un bouchon perforé. Elles sont conservées à température ambiante, ou en étuve à 28°C en atmosphère saturée (Graf 1978a).

La ponte est complète chez toutes les tiques après environ 30 jours. A ce moment, certaines pontes ont déjà commencé à éclore. Nous avons choisi de peser les pontes après 25 jours, estimant négligeable la différence de poids engendrée par les oeufs pondus durant les 5 derniers jours. En effet, le pourcentage des oeufs déposés pendant les 15 premiers jours d'oviposition, constitue déjà le 73 à 98% d'une ponte complète (Graf 1978c).

Un rapport représentant l'efficacité de conversion du repas sanguin en oeufs pondus, le rendement de ponte, est calculé selon la formule:

$$\text{Rendement de ponte} = \text{poids de la ponte} / \text{poids de la femelle gorgée}$$

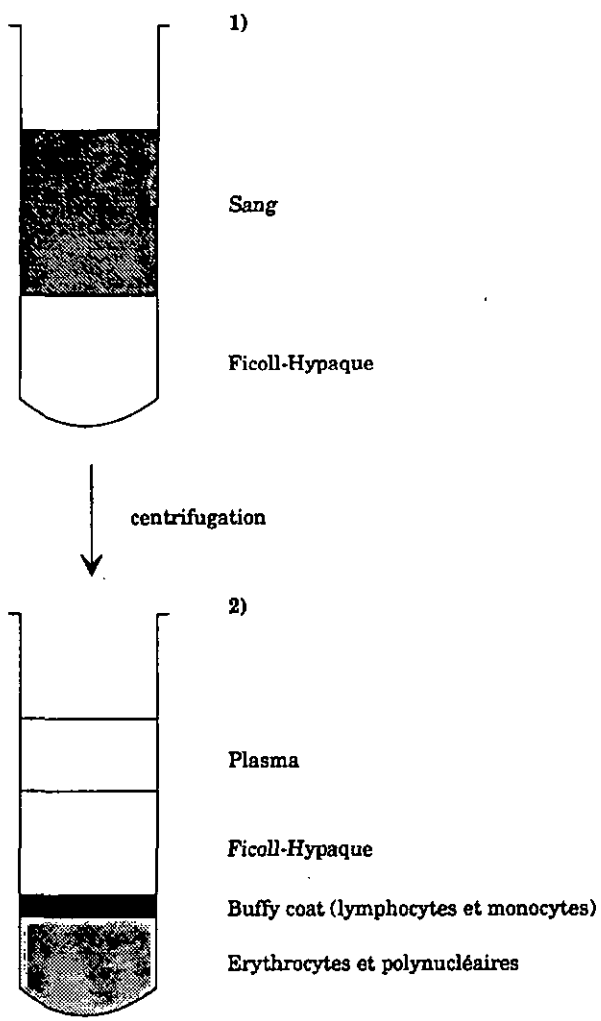


Figure A: Isolation des lymphocytes par centrifugation sur Ficoll-Hypaque

Les pontes sont conservées jusqu'à l'éclosion des larves.

Le pourcentage de tiques capables de pondre, et de pontes produisant des larves est calculé.

Les durées des repas sanguins (de la mise des tiques dans le fourreau jusqu'au détachement), de préoviposition (temps entre la fin du repas sanguin et l'apparition des premiers oeufs) et d'embryogenèse (temps entre l'apparition des premiers oeufs et l'éclosion de la première larve) sont aussi mesurés.

En plus de ces paramètres habituels, nous avons défini une classe de tiques "à nutrition perturbée". Au détachement, le poids de ces tiques est inférieur à 100mg. En première infestation au cours de nos expériences, environ 25% des tiques récoltées pèsent moins de 100mg. Seuls 18% de ces mêmes tiques donneront des pontes viables; alors que chez les tiques de plus de 100mg, environ 70% parviendront à boucler leur cycle parasitaire.

ANNEXE II: Prélèvement et isolation du plasma et des cellules

A. Prélèvement de sang aux lapins

Le test de transformation lymphoblastique utilisé dans nos expériences exige le prélèvement stérile du sang. Celui-ci s'effectue dans l'artère centrale de l'oreille à l'aide d'un Butterfly-23 INT (Venisystem, Abbot Ltd), canule de 0.6mm de diamètre prolongée par un tube flexible de 9cm, connecté à un système de prise de sang sous vide (Vacutainer, Becton Dickinson). Le sang est récolté dans des tubes de 2ml avec ou sans EDTA (0.17 M). Il est centrifugé à 1'200g à température ambiante pendant 20 minutes. Les sérums et les plasmas sont aliquotés stérilement et conservés à -20°C ou -80°C selon les besoins. Le culot de cellules avec EDTA est resuspendu dans un volume égal de HBSS sans Ca^{2+} et Mg^{2+} (Hank's balanced salt solution; Gibco), dans un tube stérile à bouchon à vis (Falcon).

B. Isolation de cellules à partir du sang prélevé sous EDTA

Toutes les manipulations se déroulent sous une hotte stérile à flux laminaire vertical stérile, et à l'aide de matériel stérile (Falcon).

Nombre de cellules comptées dans la chambre: n
 Volume de la chambre de comptage: 10^{-4} ml
 Dilution des cellules à compter: d
 Volume total de la suspension cellulaire: v

Concentration en nombre de cellules/ml: c

$$c = (n \times 10^4 \text{ ml}^{-1}) d$$

Nombre total de cellules: N

$$N = cv$$

Tableau A: Formules de comptage des cellules à l'aide de l'hémacytomètre

Ingrédients	Quantité	Conc. finale
RPMI 1640 (Gibco)	100 ml	
HEPES 1 M (Gibco)	2 ml	20 mM
NaOH 1 N	0,8 ml	8 mM
Foetal calf serum (Gibco)	10 ml	10 %
L-glutamine 200 mM (Sigma)	1 ml	2 mM
Pyruvate de sodium 100 mM (Sigma)	1 ml	1 mM
Acides aminés non essentiels 1M (Sigma)	1 ml	10 mM
β -mercaptoéthanol 50 mM (Fluka)	0.1 ml	0.05 mM
Pénicilline/Streptomycine (Gibco)	1 ml	100 U/ml

Tableau B: RPMI complet

Mononucléaires (lymphocytes et monocytes)

- Isolation

Le culot cellulaire resuspendu dans du HBSS est coulé délicatement sur un volume égal de Ficoll-Hypaque (Pharmacia-LKB) de manière à ce que les solutions ne se mélangent pas (figure A1, page précédente).

Une centrifugation de 20 minutes à 1'200g (Sigma 3E, Salvia) à température ambiante permet de séparer les lymphocytes et les monocytes (L+M), ainsi que les plaquettes sanguines du reste des cellules sanguines (érythrocytes et polynucléaires), comme la montre la figure A2.

Le HBSS est éliminé. La couche contenant les L+M est récupérée avec un minimum de Ficoll et resuspendue dans trois volumes de HBSS.

- Lavage

La suspension est centrifugée à 340g à température ambiante pendant 10 minutes. Deux cycles de lavage (resuspension dans HBSS/centrifugation) supplémentaires sont effectués pour éliminer les restes de Ficoll ainsi que les plaquettes sanguines.

- Comptage

Le culot de cellules est resuspendu dans un volume connu de HBSS. Un échantillon de 100µl de la suspension de cellules est prélevé et mélangé avec 100µl de Bleu de Trypan 0.4% (Sigma). Le comptage est effectué à l'aide d'un hémacytomètre selon la formule indiquée dans le tableau A. Seules les cellules vivantes, c'est-à-dire celles excluant le Bleu de Trypan, sont comptées.

Après comptage, la suspension de L+M est centrifugée à 200g pendant 5 minutes et le culot est resuspendu dans du RPMI 1640 (Gibco) complet (tableau B) à la concentration désirée.

N.B. Par cette méthode d'isolation, la viabilité des cellules est de 97±1%.

Polynucléaires

Le culot contenant les érythrocytes et les polynucléaires (voir ci-dessus) est débarrassé du Ficoll restant par deux cycles de lavage avec HBSS/centrifugation à 1'200g.

- Isolation

Après avoir éliminé le surnageant du dernier lavage, un volume équivalent de gélatine 3% dans HBSS est mélangé au culot de cellules. Cette suspension est laissée entre 30 et 40 minutes à 37°C pour que les érythrocytes sédimentent. Le surnageant riche en polynucléaires est récupéré et centrifugé à 340g pendant 10 minutes à température ambiante.

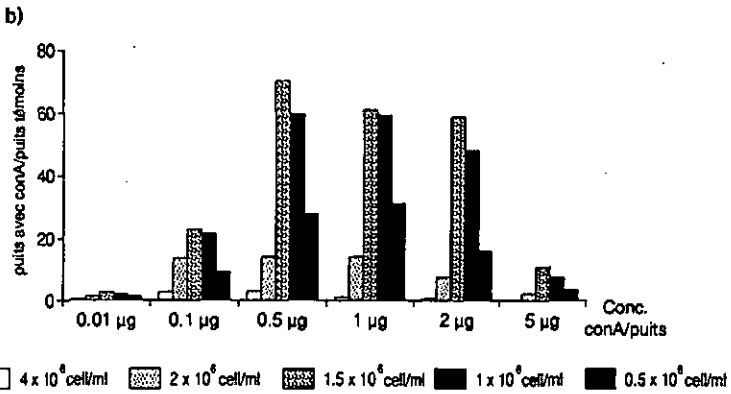
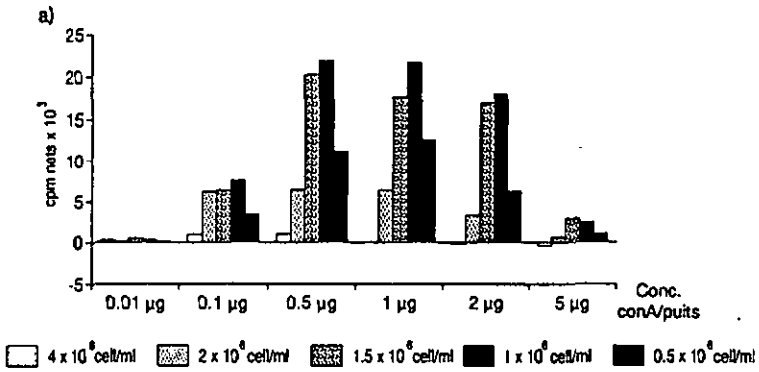


Figure B: Transformation lymphoblastique. Mise au point avec le mitogène.

a) cpm nets

b) rapport: puits avec conA/puits témoins

Lavage avec HBSS/centrifugation à 340g.

Si le culot est encore rouge, trois volumes de NH_4Cl 0.83% sont ajoutés pour provoquer une lyse des érythrocytes par choc osmotique. Après 3 minutes, les cellules sont centrifugées à 200g pendant 5 minutes.

Lavage avec HBSS/ centrifugation à 200g.

- Comptage

Le culot est resuspendu dans un volume connu de HBSS. Le comptage s'effectue comme pour les mononucléaires.

N.B. Les polynucléaires isolés sont en très grande majorité des neutrophiles. La visibilité des cellules est de $92 \pm 5\%$. Pour des raisons pratiques, l'isolation se termine le jour après la prise de sang, ce qui pourrait expliquer la viabilité légèrement inférieure à celle observée pour les L+M.

ANNEXE III: Tests cellulaires

A. Transformation lymphablastique

Ce test permet de contrôler l'état général de la fonction lymphocytaire par l'utilisation d'un mitogène, ainsi que la réponse spécifique des lymphocytes à un antigène. La reconnaissance des antigènes ou des mitogènes par les lymphocytes se traduit par une prolifération. Elle est mesurable en introduisant dans les culture un nucléotide marqué radioactivement, qui sera incorporé dans l'ADN des cellules à chaque division (Oppenheim et Schecter, 1976; Kristensen et al., 1982).

Mise au point

La prolifération des lymphocytes en présence de concentrations croissantes d'un mitogène ne suit pas une progression linéaire (exemple figure B). Pour une concentration de cellules donnée, une concentration de mitogène trop faible n'aura aucun effet stimulateur; alors qu'une concentration trop forte sera toxique et résultera également en une prolifération nulle. Il convient de choisir un couple "concentration de cellules/concentration de mitogène" optimal, dépendant aussi du nombre de cellules à disposition pour effectuer les tests. Dans notre cas, ce nombre était relativement restreint, vu les quantités de sang limitées pouvant être prélevées sur un lapin.

Plusieurs mitogènes ont été testés avec les lymphocytes de lapin:

- la concanavaline A (conA)
- la phytohémagglutinine A (PHA)

Ces deux mitogènes stimulent essentiellement les lymphocytes T.

- le pokeweed mitogen (PWM), stimulant les lymphocytes T et B
- le lipopolysaccharide de *Escherichia coli* (LPS) étant un mitogène de lymphocytes B

Les résultats obtenus avec la PHA et le PWM ont montré une plus grande variabilité et étaient en moyenne deux fois moins élevés que ceux obtenus avec la conA. La prolifération avec le LPS a toujours été très basse, vraisemblablement à cause de la faible représentation des lymphocytes B dans le sang circulant. Finalement, nous avons choisi de ne travailler qu'avec la conA, qui nous semblait donner les meilleurs résultats. Les concentrations définitives pour ce test sont mentionnées dans le mode opératoire.

Mode opératoire

Le protocole général est le même pour tous les tests effectués au cours de ce travail. Les particularités inhérentes à chaque expérience sont précisées dans le chapitre "Matériel et méthodes".

Pour les cultures, des microplaques de 96 puits à fond rond (Nuclon, Nunc) sont utilisées. La rangée de puits externe est remplie de HBSS pour créer un environnement stable dans la plaque. Les lymphocytes sont répartis dans les autres puits à la concentration de 1.5×10^5 cellules dans un volume final de 100 μ l de RPMI complet (tableau B, verso page 72).

Les cultures sont stimulées par des extraits protéiques de tiques (EGS ou ET) ou (et) par 0.5 μ g/puits de conA. Les puits sans addition de réactifs aux cellules servent de témoin. Les tests sont toujours effectués sous forme de triplicats. Après 72 heures d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, 1 μ Ci de thymidine tritiée (activité spécifique: 20-30 Cimmol⁻¹; Amersham) est ajoutée dans chaque puits. Les cellules sont récoltées 16-18h plus tard à l'aide d'un "cell harvester" (Inotech). La radioactivité incorporée est mesurée grâce à un compteur à scintillation liquide. Les résultats sont exprimés en coups nets par minute (cpm nets):

$\text{cpm nets} = \text{cpm des cultures avec antigènes ou (et) mitogènes}$ $- \text{cpm des cultures témoins}$
--

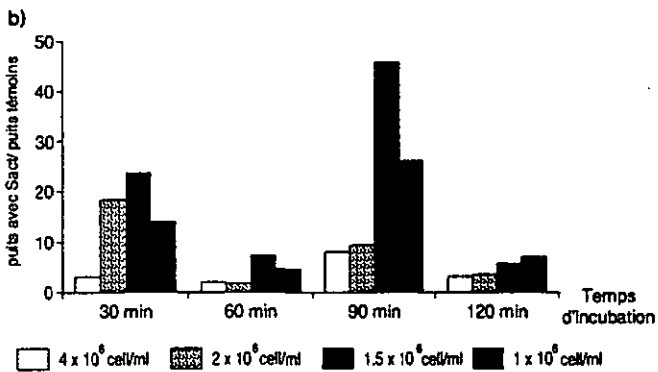
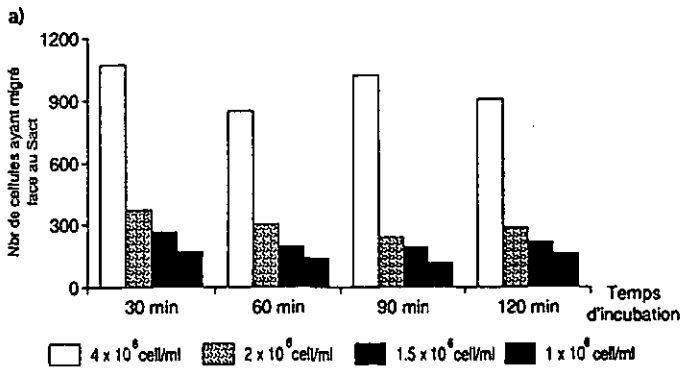


Figure C: Test de migration des neutrophiles. Mise au point.

a) résultats bruts

b) rapport: migration avec Sact/migration avec HBSS

B. Migration de neutrophiles

Ce test permet d'évaluer le pouvoir activateur ou inhibiteur d'un réactif donné sur la migration des neutrophiles. Il s'effectue à l'aide d'une chambre de microchimiotaxie (Neuro Probe; Falk *et al.*, 1980). Cette chambre est constituée de 48 puits pouvant être divisés en compartiments supérieurs et inférieurs par une membrane de polycarbonate percés de pores de 0.5 μ m de diamètre (Nucleopore). La partie inférieure d'un puits, d'un volume de 25 μ l, va recevoir les réactifs, alors que celle du haut (vol. 50 μ l) contiendra la suspension cellulaire. Les pores de la membrane sont légèrement plus petits que le diamètre des neutrophiles au repos. S'ils sont attirés par un réactif, ils devront traverser activement la membrane par mouvements amœboïdes. Les cellules ayant migré sont ensuite récupérées avec la membrane, colorées et comptées.

Mise au point

La concentration de cellules et le temps d'incubation sont importants à déterminer. En effet, une concentration de cellules trop élevée est synonyme, si la migration est massive, de difficultés de comptage au microscope. Un temps d'incubation trop long diminue les différences entre puits tests et puits témoins: au bout d'un certain temps les cellules traversent naturellement la membrane pour occuper tout le volume du puits. De plus, si la migration active est très rapide, un certain nombre de cellules risquent de se détacher de la membrane et de tomber au fond du puits. Elles ne seront donc plus comptabilisées (figure C). Ainsi, il faut trouver la concentration de cellules de départ et le temps d'incubation adéquats permettant d'obtenir un rapport "migration avec un attractant/témoin sans attractant" élevé.

La concentration et le temps d'incubation choisis sont indiqués dans le mode opératoire.

Facteur chimiotactique

Du sérum de lapin (Gibco) est incubé à 37°C pendant 30 minutes avec 1% (p/v) de zymosan A (Sigma). Le zymosan A est un extrait membranaire de levure (ici *Saccharomyces cerevisiae*) dont la présence dans le sérum déclenche l'activation de la voie alterne du complément. Le C5a produit par ce biais est le facteur chimiotactique du sérum activé. Le zymosan est ensuite éliminé par centrifugation et le sérum activé (SAct) est conservé à -20°C en aliquots.

Mode opératoire

La partie inférieure des puits de la chambre est remplie de 25 μ l de SAct ou de HBSS

<p>May-Grünwald: 0.5% (p/v) dans méthanol</p> <p>PBS May-Grünwald pH 7.0: Na₂HPO₄ 20 mM KH₂PO₄ 15 mM</p> <p>PBS Giemsa: Solutions stock: A: KH₂PO₄ 67 mM B: Na₂HPO₄ 67 mM</p> <p>Sol. finale à pH 7.0: 38.9 ml A + 61.1 ml B</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fixer au méthanol 2 à 3 minutes 2. Diluer le May-Grünwald 1:2 avec le PBS 3. Laisser colorer le frottis (la membrane) pendant 5 minutes 4. Vider le colorant, rajouter du Giemsa 1:10 dans PBS pour 10 minutes 5. Laver au PBS, puis sécher
--	--

Tableau C: Coloration au May-Grünwald

pour les puits témoins. La membrane est ensuite déposée délicatement sur les puits en évitant les bulles d'air, un coin de la membrane étant préalablement marqué pour pouvoir reconnaître la disposition des tests ultérieurement. Une garniture de silicone est appliquée pour garantir l'étanchéité du système. La partie supérieure de la chambre est posée et solidement fixée à l'aide des vis prévues à cet effet. La chambre est incubée à 37°C jusqu'à équilibre thermique avant d'ajouter les cellules. Chaque puits reçoit un volume de 50µl de la suspension de neutrophiles à la concentration de 2×10^6 cellules/ml de HBSS.

La chambre est incubée en atmosphère humide à 37°C et 5% CO₂ pendant 30 minutes. Après ce temps, la chambre est ouverte et la membrane récupérée. La face "côté cellules" est d'abord baignée dans du PBS puis passée sur un "wiper blade" (support muni d'une gomme d'essuie-glace), afin d'éliminer les cellules n'ayant pas traversé la membrane. L'opération est répétée plusieurs fois puis la membrane est séchés.

Deux méthodes de fixation/coloration ont été utilisées:

- la coloration classique au May-Grünwald (tableau C)
- un kit de coloration rapide Hemacolor (Merck)

Les deux méthodes donnent des résultats similaires, car le kit est également un May-Grünwald légèrement modifié. Il sera préférentiellement utilisé car il est beaucoup plus rapide.

La membrane est ensuite déposée sur une lame de verre, la face "côté migration" tournée vers le haut. Les cellules se comptabilisent à l'aide du microscope à un grossissement de 400x. Chaque test est effectué en triplicats, deux champs microscopiques sont comptés par triplicat. Une moyenne est calculée pour chaque test.

Les résultats sont exprimés en nombre de cellules ayant migré, ou dans le rapport: nombre de cellules ayant migré en présence de SAct/nombre de cellules migrant en présence de HBSS (témoin).

C. Hypersensibilité du lapin à l'EGS: test cutané

Le test a préalablement été décrit par Brossard et Girardin (1985).

Le ventre des animaux est rasé environ 24h avant le début du test. Les lapins sont étendus sur une planche, maintenus sur le dos, pendant la première heure du test, puis à chaque nouvelle mesure. Deux zones de peau de texture semblable sont délimitées sur le ventre des lapins à l'aide d'un feutre noir. Le premier site est réservé à l'antigène EGS (50µg dans 50µl de RPMI 1640) et le second au tampon de dilution RPMI 1640 (50µl). La réaction cutanée est évaluée par la mesure de

ELISA pour antigènes de tiques

PBS 10 mM pH 7.4	PBS-BSA 1%:	PBS	100 ml
Na ₂ HPO ₄ 1.15 g		Bovine Serum	1 g
KH ₂ PO ₄ 0.2 g		Albumin (Sigma)	
NaCl 8 g	PBS-BSA 0.1%:	PBS	100 ml
KCl 0.2 g		BSA	0.1 g
H ₂ O 1000 ml	PBS-Tween 0.05%:	PBS	1000 ml
		Tween-20 (Merk)	0.5 ml

ELISA pour TNF-α

PBS 10 mM pH 7.4	PBS-Tween 0.2%:	PBS	1000 ml
Na ₂ HPO ₄ 1.15 g		Tween-20	2 ml
KH ₂ PO ₄ 0.2 g	PBS-Tween-BSA 1%:	PBS-Tween	100 ml
NaCl 8 g		BSA	1 g
KCl 0.2 g	PBS-Tween-BSA 0.1%:	PBS-Tween	100 ml
H ₂ O 1000 ml		BSA	1 g

Réaction colorimétrique

Tampon diéthanolamine pH 9.8	Ajouter environ 160 ml d'H ₂ O distillée, puis ajuster à pH 9.8 avec HCl 0.1N.
Diéthanolamine 19.4 ml	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O 20 mg	
NaN ₃ 40 mg	Compléter à 200 ml avec H ₂ O dist.
para-nitrophényl-phosphate (PNPP)	1 mg/ml de tampon

Tableau D: ELISA: solutions et tampons

l'épaississement de la peau au centre des sites ayant reçu les injections sous-cutanées d'antigène ou de tampon. Les mesures sont effectuées à l'aide d'un micromètre, toutes les dix minutes pendant la première heure du test, puis après 6, 24, 48, 72 et 96h. Une mesure faite avant les injections sert de témoin. L'épaississement net est calculé pour chaque site en soustrayant des valeurs obtenues après injection, la mesure témoin.

ANNEXE IV: Tests sérologiques

A. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

ELISA pour la détection d'anticorps IgG dirigés contre l'EGS et l'ET

Les solutions et tampons sont décrits dans le tableau D.

- Sensibilisation des plaques

Les antigènes de tiques, dilués dans du tampon carbonate pH 9.6 à la concentration de 2.5µg/ml pour l'EGS et de 2µg/ml pour l'ET, sont distribués, à raison de 100µl/puits, dans des microplaques en Immulon (Dynastech M 129-A). Les plaques sont recouvertes de parafilm et incubées une nuit à 4°C.

- Lavages

Trois lavages successifs (le premier de quelques secondes, les suivants de 5 minutes environ) sont effectués avec du PBS-Tween 0.05% pH 7.4. Chaque puits reçoit 200µl, distribués à l'aide d'une pipette multicanaux ou d'un appareil (Ultrawash II, Dynatech)

- Saturation des sites

Pour éviter la fixation non spécifique d'immunoglobulines au cours des prochaines étapes, les sites encore libres dans les puits sont saturés d'albumine bovins (BSA) par l'addition de 200µl/puits de PBS-BSA 1%, pendant 30 minutes à 37°C.

Toutes les incubations sont effectuées dans une étuve à circulation d'air pour diminuer les effets de bord.

Lavages identiques aux précédents.

- Incubation des plasmas

Les plasmas à tester sont dilués à 1:100 avec PBS-BSA 0.1% et répartis en

duplicats dans la microplaque à raison de 100µl/puits. Au moins deux puits par plaque ne reçoivent que le tampon de dilution (blancs). Le plasma d'un lapin ayant subi cinq infestations est ajouté dans chaque microplaque comme témoin positif. Les plaques sont incubées 1h à 37°C.

Lavages identiques aux précédents.

- *Anticorps secondaires*

Les anticorps secondaires sont des IgG de chèvre anti-IgG de lapin couplés à de la phosphatase alcaline (Kirkegaard & Perry Lab.). Dilués à 1:1000 avec du PBS-BSA 0.1%, ils sont incubés dans les plaques 1h à 37°C, à raison de 100µl/puits.

Lavages identiques aux précédents.

- *Réaction colorimétrique*

Le substrat, du para-nitrophényl-phosphate (PNPP, Aldrich) dilué à 1mg/ml dans un tampon diéthanolamine-HCl (pH 9.8, 0.5mM MgCl₂), est ajouté à raison de 200µl/puits. L'incubation à 37°C dure de 30 à 60 minutes selon la vitesse de la réaction. Celle-ci est finalement stoppée par l'addition de 50µl/puits de NaOH 3N.

- *Lecture des résultats*

La lecture de la réaction se fait à 405nm à l'aide d'un Autoreader MR 580 (Dynatech). La valeur nulle est prise par rapport aux blancs (puits incubés sans plasmas). La moyenne des densités optiques (D.O.) des duplicats est calculée. Les résultats sont exprimés par le pourcentage que représente cette moyenne par rapport à la moyenne des D.O. obtenus pour le témoin positif. Une comparaison de titres entre des plasmas testés sur des microplaques différentes est ainsi possible.

ELISA pour la détection d'IgG anti-TNF-α humain

Les solutions et tampons sont décrits dans le tableau D (verso page 77). Le mode opératoire est sensiblement le même que pour l'ELISA "antigènes de tiques". Les particularités du test sont indiquées ci-dessous.

- *Sensibilisation des plaques*

L'antigène utilisé est du TNF-α recombinant humain (Genentech) dilué à 0.5µg/ml dans du tampon carbonate pH 9.6.

- *Lavages*

Trois lavages identiques à ceux décrits précédemment sont effectués avec un tampon PBS-Tween 0.2% pH 7.4.

Ingrédients		Quantité	Conc. finale
Acide 5,5-diéthylbarbiturique (barbital)	$C_8H_{12}N_2O_3$	0.8 g	43 mM
5,5-diéthylbarbiturate de sodium (sodium barbital)	$C_8H_{11}N_2NaO_3$	4.1 g	200 mM
Azide de sodium	NaN_3	1.0 g	150 mM
H_2O distillée		1000 ml	

Tableau E: Tampon barbital 240 mM, pH 8.6

- Saturation

Les sites encore libres sont bloqués avec 200µl/puits de PBS-Tween 0.2%-BSA 1%.

Lavages identiques aux précédents.

- Incubation des plasmas

Les plasmas à tester sont dilués à 1:500 dans du PBS-Tween-BSA 0.1%. Des anticorps polyclonaux de lapins anti-TNF- α recombinant humain (Endogen) sont utilisés à la même dilution et servent de témoins positifs.

Lavages identiques aux précédents.

- Anticorps secondaires

Le conjugué est le même que pour l'ELISA "antigènes de tiques". Il est dilué à 1:1000 dans PBS-Tween-BSA 0.1%.

Lavages comme précédemment.

- Substrat

PNPP 1mg/ml de diéthanolamine-HCl (pH 9.8, 0.5mM MgCl₂); incubé comme pour l'ELISA "antigènes de tiques".

- Lecture

Elle se fait à 405nm au spectrophotomètre (Autoreader MR 580, Dynatech). Les résultats sont exprimés de la même manière que dans l'ELISA "antigènes de tiques", par rapport aux valeurs obtenues pour le témoin positif.

B. Immunodiffusion radiale

La méthode de dosage décrite ci-dessous est reprise de Ingild (1983).

- Préparation des plaques

Une solution de 1% d'agarose (type M, LKB/Pharmacia) dans du tampon barbital pH 8.6 (tableau E) est chauffée sous agitation constante. Le mélange est dégazé à 50°C, puis porté à 90°C pour que l'agarose fonde complètement. La solution est ensuite refroidie à 55-60°C et maintenue à cette température dans un bain-marie.

Des anticorps spécifiques de la substance à doser sont mélangés à l'agarose, qui est ensuite déposé en couche mince de 1.5mm sur un film plastique (GelBond film, LKB/Pharmacia) posé à plat sur une plaque chauffante réglée à 55°C. Le gel est régulièrement étalé à l'aide d'une pipette pasteur, puis refroidi toujours en position horizontale. Les gels se conservent à 4°C en chambre humide jusqu'à utilisation.

- Incubation des sérums

Des puits de 2.5mm de diamètre séparés d'au moins 1.5cm sont formés dans les gels à l'aide d'un emporte-pièce. Les sérums à tester sont dilués dans du tampon barbital pH 8.6 et distribués à raison de 5µl/puits. La diffusion se déroule en atmosphère humide à température ambiante. Il se forme des disques de précipitation dont le diamètre sera mesuré après séchage et coloration des gels.

- Elimination des protéines non précipitées

La diffusion est terminée lorsque toutes les molécules d'antigène ont réagi avec les anticorps du gel, et formé des complexes immuns qui précipitent dans le gel (anneau de précipitation marginal visible). Les gels sont alors baignés dans une solution de NaCl 0.3M pendant 30 à 60 minutes, puis déposés sur une surface plane et recouverts de 3 à 4 couches de papier filtre (Whatman n° 1) imbibés d'H₂O distillée. Une dizaine de couches de papier ménage sec sont ajoutées et une légère charge (plaque de verre) est appliquée. Lorsque tout le papier s'est humidifié, les gels sont trempés dans H₂O distillée pendant 5 à 10 minutes.

- Séchage des gels

Sortis de l'eau, les gels sont placés sur une plaque chauffante réglée à 40°C, recouverts à nouveau de papier Whatman mouillé, de papier ménage sec et de la plaque de verre. Lorsque le papier s'est humidifié, la plaque est enlevée. Les gels sont laissés ainsi jusqu'à ce que tout le papier placé au-dessus d'eux ait complètement séché. Les gels sont alors réduits à un film transparent étalé sur le GelBond.

- Coloration des gels

Les gels sont colorés pendant 5 minutes avec du bleu brillant de Coomassie R250 (0.5% dans méthanol 45%, acide acétique glacial 10%, H₂O dist. 45%). L'excès de colorant est éliminé par plusieurs lavages avec la solution décrite ci-dessus, sans le colorant. Les gels sont séchés et peuvent être conservés ainsi indéfiniment.

- Lecture des résultats

Le diamètre des disques de précipitation est mesuré à l'aide d'une loupe (Olympus) munie d'un oculaire gradué. Sur chaque gel, une série de cinq concentrations connues de l'antigène à doser permet l'établissement d'une droite standard. En effet, pour une concentration d'anticorps donnée, la concentration de l'antigène reconnu et le carré du diamètre du disque de précipitation mesuré dans le gel augmentent linéairement ($c = d^2$). Cette droite permet ensuite de déduire des concentrations inconnues du même antigène contenus dans des échantillons à doser.

Dosage du C₃ et des IgM sériques

- Anticorps spécifiques

Les concentrations ont été fixées lors de la mise au point du test:

- sérum de chèvre anti-C₃ de Ispin (BioScience) à la concentration de 1.5µl/ml de gel d'agarose
- sérum de chèvre anti-IgM de Ispin (Kirkegaard & Perry Lab.) à la concentration de 2.5µl/ml de gel.

- Dilution des sérums à tester

Les dilutions sont de 1:16 pour le dosage du C₃ et de 1:11 pour celui des IgM.

Comme nous ne disposons pas d'antigènes purifiés pour l'établissement des courbes standard, un sérum commercial de Ispin (Gibco) est utilisé comme référence. Cinq dilutions sont placées sur chaque gel (voir exemple figure D):

- pour le dosage du C₃: 1:4, 1:6, 1:11, 1:16 et 1:51 dans le tampon barbital pH 8.6. La concentration 1:16 (la même que pour les échantillons à tester) est définie comme la concentration de référence équivalent à 100%. Les autres dilutions seront exprimées en pourcent par rapport à cette concentration de référence: 400%, 266.67%, 145.45%, 100% et 31.37%.
- pour le dosage des IgM: 1:2, 1:4, 1:6, 1:11 et 1:31, qui donnent après transformation en pourcent: 550%, 275%, 183.33%, 100% et 35.5%.

- Incubation des gels

L'anneau épais marquant la fin de la diffusion est visible en transparence dans le gel après environ 48h pour le C₃ et 72h pour les IgM.

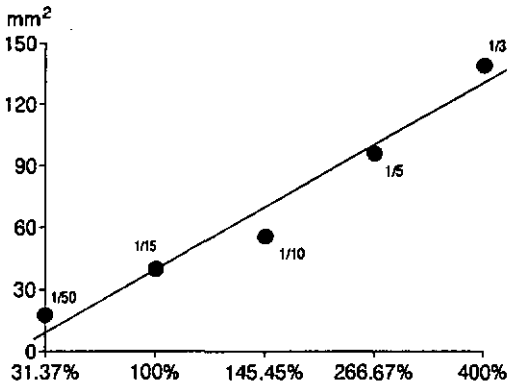


Figure D: Immunodiffusion radiale. Exemple de droite standard. La dilution 1/15 est utilisée comme référence équivalent à 100%. Les autres dilutions sont exprimées en % par rapport à cette référence.

BIBLIOGRAPHIE**A**

- ABOUL-AMR, I.M. & GRAY, J.S. (1987) Resistance of sheep to laboratory infestations of the tick, *Ixodes ricinus*. *Research in Veterinary Science* 49, 266-267.
- ABRAHAM, E., SHAH, S. (1992) Intranasal immunization with liposomes containing IL-2 enhances bacterial polysaccharide antigen-specific pulmonary secretory antibody response. *Journal of Immunology* 149, 3719-3726.
- ACKERMAN, S., CLARE, F.B., MCGILL, T.W. & SONENSHINE, D.E. (1981) Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis* (Say). *Journal of Parasitology* 87, 737-740.
- AESCHLIMANN, A. (1972) *Ixodes ricinus*, Linné 1758 (Ixodoidea, Ixodidae). Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. *Acta Tropica* 28, 321-340.
- AESCHLIMANN, A., BROSSARD, M. & QUENET, G. (1975) Contribution à la connaissance des piroplasmés en Suisse. *Acta tropica* 32, 281-289.
- AESCHLIMANN, A., BURGDORFER, W., MATILE, H., PÉTER, O. & WYLER, R. (1979) Aspects nouveaux du rôle de vecteur joué par *Ixodes ricinus* L. en Suisse. Note préliminaire. *Acta Tropica* 38, 181-191.
- AKAMA, H., ICHIKAWA, Y., MATSUSHITA, Y., SHINOZAWA, T. & HOMMA, M. (1990) Mononuclear cells enhance prostaglandin E₂ production of polymorphonuclear leukocytes via tumor necrosis factor α . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 168, 857-862.
- AKUFFO, H., KAPLAN, G., KIESSLING, R., TEKLEMARIAM, S., DIETZ, M., MCELRATH, J. & COHN, Z.C. (1990) Administration of recombinant interleukin-2 reduces the local parasite load of patients with disseminated cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 161, 775-780.
- ALKARMI, T. & BEHBEHANI, K. (1989) *Echinococcus multilocularis*: Inhibition of murine neutrophil and macrophage chemotaxis. *Experimental Parasitology* 69, 16-22.
- ALLEN, J.R. (1973) Tick resistance: Basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. *International Journal for Parasitology* 3, 195-200.
- ALLEN, J.R. (1986) Immunological responses of mammals to ectoparasites: mosquitoes and ticks. In: *Parasite lives. Papers on parasites, their hosts and their associations. To honour J.F.A. Sprent*, eds. M. Cremin, C. Dobson and D.E. Moorhouse, pp. 79-94, University of Queensland Press, St Lucia.
- ALLEN, J.R. (1989) Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. *Experimental and Applied Acarology* 7, 5-13.
- ALLEN, J.R., DOUBE, B.M. & KEMP, D.H. (1977) Histology of bovine skin reactions to *Ixodes holocyclus*, Neumann. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 41, 26-35.
- ALLEN, J.R., KHALIL, H.M. & GRAHAM, J.E. (1979a) The location of tick salivary antigens, complement and immunoglobulin in the skin of guinea-pigs infested with *Dermacentor andersoni* larvae. *Immunology* 38, 487-472.
- ALLEN, J.R., KHALIL, H.M. & WIKEL, S.K. (1979b) Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick resistant guinea pigs. *Journal of Immunology* 122, 563-565.
- ANDERSON, G., URBAN, O., FEDORKA-CRAY, P., NEWELL, A., NUNBERG, J. & DOYLE, M. (1987) Interleukin-2 and protective immunity in *Haemophilus pleuropneumoniae*: preliminary studies. In: *Vaccines 87. Modern Approaches to New Vaccines*, eds. R.M. Chanock, R.A. Terner, F. Brown and H. Gunsberg, pp. 22-25, NY Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

ASKENASE, P.W., BAGNALL, B.G. & WORMS, M.J. (1982) Cutaneous basophil-associated resistance to ectoparasites (ticks). I. Transfer with immune serum or immune cells. *Immunology* 45, 501-511.

B

BAARS, J.W., HACK, C.E., WAGSTAFF, J., EERENBERG-BELMER, A.J.M., WOLBINK, G.J., THUIS, L.G., STRACK VAN SCHLUNDEL, R.J.M., VAN DER VALL, H.L.J.A. & PINEDO, H.M. (1992) The activation of polymorphonuclear neutrophils and the complement system during immunotherapy with recombinant interleukin-2. *British Journal of Cancer* 65, 96-101.

BACH, M.K. (1982) Mediators of anaphylaxis and inflammation. *Annual Review of Microbiology* 36, 371-413.

BALASHOV, Y.S. (1972) A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea) - Vectors of diseases of man and animals. In: *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*. Vol. B (5), 167-376.

BARRIGA, O.O., ANDUJAR, F., SAHIBI, H. & ANDRZEJEWSKI, W.J. (1991) Antigens of *Amblyomma americanum* ticks recognized by repeatedly infested sheep. *Journal of Parasitology* 77, 710-716.

BELDEN, E.L. & STRELKAUSKAS, A.J. (1981) Mitogen and mixed lymphocyte culture responses of isolated bovine lymphocyte subpopulations. *American Journal of Veterinary Research* 42, 934-937.

BEN-YAKIR, D. (1989) Quantitative studies of host immunoglobulin G in the hemolymph of ticks (Acari). *Journal of Medical Entomology* 26, 243-245.

BENJAMINI, E. & LESKOWITZ, S. (1991) *Immunology, a short course*, 2nd ed., pp. 1-459, Wiley-Liss, New York.

BENNETT, G.F. (1969) *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae): Experimental infestations on cattle restrained from grooming. *Experimental Parasitology* 26, 323-328.

BERENBERG, J.L., WARD, P.A. & SONENSHINE, D.E. (1972) Tick-bite injury: mediation by a complement-derived chemotactic factor. *Journal of Immunology* 109, 451-456.

BETZ, M. & FOX, B.S. (1991) Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *Journal of Immunology* 146, 108-113.

BEUTLER, B. & CERAMI, A. (1986) Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 320, 584-588.

BEUTLER, B. & CERAMI, A. (1989) The biology of cachectin/TNF - a primary mediator of the host response. *Annual Review of Immunology* 7, 625-655.

BEUTLER, B., GREENWALD, D., HULMES, J.D., CHANG, M., PAN, Y.-C.E., MATHISON, J., ULEWITZ, R. & CERAMI, A. (1985a) Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316, 552-554.

BEUTLER, B., MILSARK, I.W. & CERAMI, A.C. (1985b) Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229, 869-871.

BEUTLER, B., MILSARK, I.W. & CERAMI, A. (1985c) Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate *in vivo*. *Journal of Immunology* 135, 3972-3977.

BINNINGTON, K.C. & KEMP, D.H. (1980) Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission. *Advances in Parasitology* 18, 315-339.

BLACK, C.M., ISRAELSKI, D.M. & REMINGTON, J.S. (1989) Effect of recombinant tumor necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* or *Trypanosoma cruzi*. *Immunology* 68, 570-574.

BOVET, L. (1987) Caractérisation d'antigènes d'extraits totaux et de cellules en culture d'*Ixodes ricinus* L. par des sérums de lapins infestés. Travail de Licence, pp. 1-92, Université de Neuchâtel, Suisse.

- BOWESSIDJAOU, J., BROSSARD, M. & AESCHLIMANN, A. (1977) Effects and duration of resistance acquired by rabbits on feeding and egg laying in *Ixodes ricinus* L. *Experientia* 33, 528-530.
- BRAM, R.A. (1975) Tick-borne livestock diseases and their vectors. I. The global problem. *World Animal Review* 16, 1-5.
- BROSSARD, M. (1977) Rabbits infested with the adults of *Ixodes ricinus* L.: passive transfer of resistance with immune serum. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 70, 289-294.
- BROSSARD, M. (1982) Rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L.: effects of mepyramine on acquired resistance. *Experientia* 38, 702-704.
- BROSSARD, M. & AESCHLIMANN, A. (1976) Preliminary studies of *Coxiella burnetii* in Switzerland. Isolation of a strain. Transmission by *Ixodes ricinus*. *Proceedings of the second International Colloquium on Natural Foci of Infectious Diseases in Central Europe*, Graz, 305-312.
- BROSSARD, M. & FIVAZ, V. (1982) *Ixodes ricinus* L.: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or re-infested rabbits. *Parasitology* 85, 583-592.
- BROSSARD, M. & GIRARDIN, P. (1979) Passive transfer of resistance in rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L.: Humoral factors influence feeding and egg laying. *Experientia* 35, 1395-1396.
- BROSSARD, M. & RAIS, O. (1984) Passage of hemolysins through the midgut epithelium of female *Ixodes ricinus* L. fed on rabbits infested or reinfested with ticks. *Experientia* 40, 561-563.
- BROSSARD, M., MONNERON, J.P. & PAPAETHODOROU, V. (1982) Progressive sensitization of circulating basophils against *Ixodes ricinus* L. antigens during repeated infestations of rabbits. *Parasite Immunology* 4, 355-381.
- BROSSARD, M., RUTTI, B. & HAUG, T. (1991) Immunological relationship between hosts and Ixodid ticks. In: *Parasitism: Coexistence or conflict? Proceedings of the 9. International Conference on Comparative Physiology*, pp. 177-200, eds. A. Aeschlimann and C. Toft, Oxford University Press, Oxford.
- BROWN, S.J. (1982) Antibody- and cell-mediated immune resistance by guinea pigs to adult *Amblyomma americanum* ticks. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31, 1285-1290.
- BROWN, S.J. (1985) Immunology of acquired resistance to ticks. *Parasitology Today* 1, 166-171.
- BROWN, S.J. (1988a) Western blot analysis of *Amblyomma americanum*-derived stage-specific and shared antigens using serum from guinea pigs expressing resistance. *Veterinary Parasitology* 28, 163-171.
- BROWN, S.J. (1988b) Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. II. Description of rabbit-acquired immunity to *Amblyomma americanum* ticks and identification of potential tick antigens by Western blot analysis. *Veterinary Parasitology* 28, 245-259.
- BROWN, S.J. (1988c) Highlights of contemporary research on host immune responses to ticks. *Veterinary Parasitology* 28, 321-334.
- BROWN, S.J. & ASKENASE, P.W. (1981) Cutaneous basophil responses and immune resistance of guinea pigs to ticks: Passive transfer with peritoneal exudate cells or serum. *Journal of Immunology* 127, 2164-2167.
- BROWN, S.J. & ASKENASE, P.W. (1983) Immune rejection of ectoparasites (ticks) by T-cell and IgG₁ antibody recruitment of basophils and eosinophils. *Federation Proceedings* 42, 1744-1747.
- BROWN, S.J. & ASKENASE, P.W. (1986) Characterization of *Amblyomma americanum*-derived salivary gland proteins responsible for the elicitation of host immunity. In: *Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks*, eds. J.R. Sauer and J.A., chap. 13, pp. 300-328, Ellis Horwood, Chichester.

- BROWN, S.J., GALLI, S.J., GLEICH, G.J. & ASKENASE, P.W. (1982) Ablation of immunity to *Amblyomma americanum* by anti-basophil serum: cooperation between basophils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasites (ticks) in guinea pigs. *Journal of Immunology* 129, 790-796.
- BROWN, S.J., WORMS, M.J. & ASKENASE, P.W. (1983) *Rhipicephalus appendiculatus*: larval feeding sites in guinea pigs actively sensitized and receiving immune serum. *Experimental Parasitology* 55, 111-120.
- BROWN, S.J., BAGNALL, B.G. & ASKENASE, P.W. (1984a) *Ixodes holocyclus*: Kinetics of cutaneous basophil responses in naive, and actively and passively sensitized guinea pigs. *Experimental Parasitology* 67, 40-47.
- BROWN, S.J., BARKER, R.W. & ASKENASE, P.W. (1984b) Bovine resistance to *Amblyomma americanum* ticks: an acquired immune response characterized by cutaneous basophil infiltrates. *Veterinary Parasitology* 16, 147-165.
- BURGDORFER, W., BARBOUR, A.G., HAYES, S.F., PETER, O. & AESCHLIMANN, A. (1983) *Erythema chronicum migrans* - A tickborne spirochetosis. *Acta Tropica* 40, 79-83.
- C
- CERAMI, A. (1992) Inflammatory cytokines. *Clinical Immunology and Immunopathology* 62, S3-S10.
- CERAMI, A. & BEUTLER, B. (1988) The role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia. *Immunology Today* 9, 28-31.
- CHANG, H.R., GRAU, G.E. & PECHÈRE, J.C. (1990) Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. *Immunology* 69, 33-37.
- CHINERY, W.A. & AYITEY-SMITH, E. (1977) Histamine blocking agent in the salivary gland homogenate of the tick *Rhipicephalus sanguineus sanguineus*. *Nature* 266, 366-367.
- CHOROMANSKI, L. & KUHN, R.E. (1985) Interleukin-2 enhances specific and nonspecific immune responses in experimental Chagas' disease. *Infection and Immunity* 50, 354-357.
- CHOROMANSKI, L. & KUHN, R.E. (1987) Use of parasite antigens and interleukin-2 to enhance suppressed immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infection and Immunity* 55, 403-408.
- CLARK, I.A. (1987) Cell-mediated immunity in protection and pathology of malaria. *Parasitology Today* 3, 300-305.
- CLARK, I.A., HUNT, N.H., BUTCHER, G.A. & COWDEN, W.B. (1987) Inhibition of murine malaria (*Plasmodium chabaudi*) *in vivo* by recombinant interferon- γ or tumor necrosis factor, and its enhancement by butylated hydroxyanisole. *Journal of Immunology* 139, 3493-3496.
- CONTI, P., REALE, M., FIORE, S., CANCELLI, A., ANGELETTI, P.U. & DINARELLO, C.A. (1988) Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor acting in synergy to release thromboxane, 6-KETO-PGF_{1 α} and PGE₂ by human neutrophils. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 75, 316-324.
- D
- DAVIES, D.H., CORBEIL, L., WARD, D. & DUNCAN, J.R. (1974) A humoral suppressor of *in vitro* lymphocyte transformation responses in cattle with John's disease (38016). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 145, 1372-1377.
- DAVIES, P., BAILEY, P.J., GOLDENBERG, M.M., FORD-HUTCHINSON, A.W. (1984) The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annual Review of Immunology* 2, 335-357.
- DELVES, P.J. & ROITT, I.M. (1992) Interleukin-2. In: *Encyclopedia of Immunology*, eds I.M. Roitt and P.J. Delves, pp. 903-906, Academic Press Ltd, London.

- DEFOSE, D.L. & JOHNSON, R.C. (1992) *In vitro* and *in vivo* induction of tumor necrosis factor alpha by *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 60, 1109-1113.
- DENHOLLANDER, N. & ALLEN, J.R. (1985a) *Dermacentor variabilis*: acquired resistance to ticks in BALB/c mice. *Experimental Parasitology* 59, 118-129.
- DENHOLLANDER, N. & ALLEN, J.R. (1985b) *Dermacentor variabilis*: resistance to ticks acquired by mast cell-deficient and other strains of mice. *Experimental Parasitology* 68, 169-179.
- DICKINSON, R.G., O'HAGAN, J.E., SCHOTZ, M., BINNINGTON, K.C. & HEGARTY, M. (1976) Prostaglandins in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Sciences* 54, 475-586.
- DOHLSTEN, M., HEOLUNG, G., SJÖGREN, H.-O. & CARLSSON, R. (1988) Inhibitory effects of histamine on interleukin-2 and gamma interferon production by different human T helper cell subsets. *Scandinavian Journal of Immunology* 28, 727-733.
- DUMMER, R., MILLER, K., EILLES, C. & BURG, G. (1991) The skin: an immunoreactive target organ during interleukin-2 administration? *Clinical Laboratory Investigations* 183, 95-99.

E

- ECONOMOU, J.S., MCBRIDE, W.H., ESSNER, R., RHOADES, K., GOLUB, S., HOLMES, E.C. & MORTON, D.L. (1989) Tumor necrosis factor production by IL-2-activated macrophages *in vitro* and *in vivo*. *Immunology* 67, 614-619.
- ELIAS, J.A., GUSTILO, K., BAEDER, W. & FREUNDLICH, B. (1987) Synergistic stimulation of fibroblast prostaglandin production by recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Journal of Immunology* 138, 3812-3816.

F

- FACCIOLI, L.H., SOUZA, G.E.P., CUNHA, F.Q., POOLE, S. & FERREIRA, S.H. (1990) Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. *Agents and Actions* 30, 344-349.
- FALK, W., GOODWIN, R.H. & LEONARD, E.J. (1980) A 48-wall micro chemotaxis assembly for rapid measurement of leukocyte migration. *Journal of Immunological Methods* 33, 239-247.
- FARRAR, W.L., JOHNSON, H.M. & FARRAR, J.J. (1981) Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin-2. *Journal of Immunology* 128, 1120-1125.
- FERRANTE, A., NANDOSKAR, M., WALZ, A., GOH, D.H.B. & KOWANKO, I.C. (1988) Effects of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha and beta on human neutrophil migration, respiratory burst and degranulation. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 86, 82-91.
- FERRERI, N.R., SARR, T., ASKENASE, P.W. & RUDDLE, N.H. (1992) Molecular regulation of tumor necrosis factor- α and lymphotoxin production in T cells. Inhibition by prostaglandin E₂. *Journal of Biological Chemistry* 267, 9443-9449.
- FIGARI, I.S., MORI, N.A. & PALLADINO, M.A. (1987) Regulation of neutrophil migration and superoxide production by recombinant tumor necrosis factors- α and - β : Comparison to recombinant interferon- γ and interleukin-1 α . *Blood* 70, 979-984.
- FTVAZ, B.H. (1989) Immune suppression induced by the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. *Journal of Parasitology* 75, 946-952.

- FTVAZ, B.H. (1990) Immunological responses of the rabbit host to infestation by the brown ear-tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* 8, 219-238.

G

- GALLIN, J.I. (1989) Inflammation. In: *Fundamental Immunology*, ed. W.E. Paul, pp. 721-733, Raven Press Ltd, New York.

- GAUCI, M., STONE, B.F. & THONG, Y.H. (1988) Isolation and immunological characterization of allergens from salivary glands of the Australian paralysis tick *Ixodes holocyclus*. *International Archives of Allergy and applied Immunology* **87**, 208-212.
- GECZY, A.F., NAUGHTON, M.A., CLEGG, J.B. & HEWETSON, R.W. (1971) Esterases and a carbohydrate-splitting enzyme of the saliva of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Journal of Parasitology* **57**, 437-438.
- GHIARA, P., BORASCHI, D., NENCIONI, L., GHEZZI, P. & TAGLIABUE, A. (1987) Enhancement of *in vivo* immune response by tumor necrosis factor. *Journal of Immunology* **139**, 3676-3678.
- GILL, H.S. (1988) Kinetics of mast cell, basophil and eosinophil populations at *Hyalomma anatolicum anatolicum* feeding sites on cattle and the acquisition of resistance. *Parasitology* **93**, 305-316.
- GILL, H.S. & LUCKINS, A.G. (1987) *Hyalomma anatolicum anatolicum*: The role of humoral factors in the acquisition of host resistance. *Experimental Parasitology* **64**, 430-437.
- GILL, H.S. & WALKER, A.R. (1985) Differential cellular responses at *Hyalomma anatolicum anatolicum* feeding sites on susceptible and tick-resistant rabbits. *Parasitology* **91**, 591-607.
- GILL, H.S. & WALKER, A.R. (1988) The salivary glands of *Hyalomma anatolicum anatolicum*: Nature of salivary gland components and their role in tick attachment and feeding. *International Journal for Parasitology* **18**, 83-93.
- GILL, H.S., BOID, R. & ROSS, C.A. (1986) Isolation and characterization of salivary antigens from *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Parasite Immunology* **8**, 11-25.
- GILLIS, S., FERM, M.M., OU, W. & SMITH, K.A. (1978) T cell growth factor: parameters of production and quantitative microassay for activity. *Journal of Immunology* **120**, 2027-2032.
- GIRARDIN, P. (1987) Immunité du lapin contre la tique *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea, Ixodidae): mécanismes effecteurs et leurs effets sur la biologie de l'ectoparasite. Thèse, Université de Neuchâtel, Suisse.
- GIRARDIN, P. & BROSSARD, M. (1985) Développement d'une hypersensibilité retardée chez des lapins infestés par les femelles d'*Ixodes ricinus* L. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **60**, 299-309.
- GIRARDIN, P. & BROSSARD, M. (1989) Effects of cyclosporin A on humoral immunity to ticks and on cutaneous immediate and delayed hypersensitivity reactions to *Ixodes ricinus* L. salivary-gland antigens in re-infested rabbits. *Parasitology Research* **76**, 667-662.
- GIRARDIN, P. & BROSSARD, M. (1990) Rabbits infested with *Ixodes ricinus* L. adults: Effects of a treatment with cyclosporin A on the biology of ticks fed on naive and immune hosts. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **85**, 262-288.
- GLASER, R., RICE, J., SHERIDAN, J., FERTEL, R., STOUT, J.C., SPEICHER, C.E., PINSKY, D., KOTUR, M., POST, A., BECK, M. & KIECOLT-GLASER, J.K. (1987) Stress-related immune suppression: Health implications. *Brain, Behaviour, and Immunity* **1**, 7-20.
- GOLDBLUM, S.E., YONEDA, K., CIBULL, M.L., PEARSON, T., HALL, C. & MARSHALL, M.E. (1990) Human recombinant interleukin-2 provokes acute pulmonary vascular endothelial injury in rabbits. *Journal of Biological Response Modifiers* **9**, 127-139.
- GOODWIN, J.S. & WEBB, D.R. (1980) Regulation of the immune response by prostaglandins. *Clinical Immunology and Immunopathology* **15**, 106-122.
- GORDON, J.R. & ALLEN, J.R. (1987) Isolation and characterization of salivary antigens from the female tick, *Dermacentor andersoni*. *Parasite Immunology* **8**, 337-352.
- GORDON, J.R. & ALLEN, J.R. (1991a) Nonspecific activation of complement factor 8 by isolated *Dermacentor andersoni* salivary antigens. *Journal of Parasitology* **77**, 296-301.

- GORDON, J.R. & ALLEN, J.R. (1991b) Factors V and VII anticoagulant activities in the salivary glands of feeding *Dermacentor andersoni* ticks. *Journal of Parasitology* 77, 167-170.
- GORDON, J.R. & GALLI, S.J. (1990) Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *Nature* 346, 274-276.
- GORDON, J.R., BURD, P.R. & GALLI, S.J. (1990) Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunology Today* 11, 458-464.
- GOTHE, R., KUNZE, K. & HOOGSTRAAL, H. (1979) The mechanisms of pathogenicity in the tick paralysis. *Journal of Medical Entomology* 18, 367-369.
- GRAF, J.-F. (1978a) Copulation, nutrition et ponte chez *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea: Ixodidae)- 1^{ère} partie. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse* 51, 89-97.
- GRAF, J.-F. (1978b) Copulation, nutrition et ponte chez *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea: Ixodidae)- 2^e partie. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse* 51, 241-253.
- GRAF, J.-F. (1978c) Copulation, nutrition et ponte chez *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea: Ixodidae)- 3^e partie. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse* 51, 343-360.

H

- HAAK-FRENSCHO, M. & CZUPRYNSKI, C.J. (1992) Use of recombinant interleukin-2 to enhance adoptive transfer of resistance to *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and Immunity* 60, 1406-1414.
- HAAK-FRENSCHO, M., YOUNG, K.M. & CZUPRYNSKI, C.J. (1989) Treatment of mice with human recombinant interleukin-2 augments resistance to the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 67, 3014-3021.
- HAUG, T., RUTTI, B. & BROSSARD, M. (1988) Immunohistochemical localization of antigens in the tick, *Ixodes ricinus* and *Rhipicephalus appendiculatus*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene* 306, 323-324. (Abstract)
- HEFENEIDER, S.H., CONLON, P.J., HENNEY, C.S. & GILLIS, S. (1983) *In vivo* interleukin-2 administration augments the generation of alloreactive cytolytic T lymphocytes and resident natural killer cells. *Journal of Immunology* 130, 222-227.
- HIGGS, G.A., VANE, J.R., HART, R.J., POTTER, C. & WILSON, R.G. (1976) Prostaglandins in the saliva of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina, Ixodidae). *Bulletin of Entomological Research* 66, 665-670.
- HIRANO, T., AKIRA, S., TAGA, T. & KISHIMOTO, T. (1990) Biological and clinical aspects of interleukin-6. *Immunology Today* 11, 443-449.
- HIRSH, D.C., BAKER, B.B., WIGER, N., YASKULSKI, S.G. & OSBURN, B.I. (1975) Suppression of *in vitro* lymphocyte transformation by serum from dogs with generalized demodicosis. *American Journal of Veterinary Research* 36, 1691-1595.
- HOFFMANN, A., WALSMANN, P., RIESENER, G., PAINTZ, M. & MARKWARDT, F. (1991) Isolation and characterization of a thrombin inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*. *Pharmazie* 46, 209-212.
- HUGHES, H.P.A., CAMPOS, M., GODSON, D.L., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., MCDUGALL, L., RAPIN, N., ZAMB, T. & BABIUK, L.A. (1991) Immunopotential of bovine herpes virus subunit vaccination by interleukin-2. *Immunology* 74, 461-466.
- HUME, D.A. & WEIDEMANN, M.J. (1980) Immunological functions of activated lymphocytes: interactions between leucocyte subpopulations during mitogenesis. In: *Mitogenic lymphocyte transformation. Research Monographs in Immunology* Vol. 2, pp. 21-76, Elsevier/Noth-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

- I
- INGILD, A. (1983) Single radial immunodiffusion. In: *Scandinavian Journal of Immunology*. Vol. 17, Suppl. 10: *Handbook of Immunoprecipitation-in-Gel Techniques*, ed. N.H. Axelsen, pp. 41-56, Blackwell Scientific Publications, London.
- INOKUMA, H., KERLIN, R.L., KEMP, D.H., WILLADSEN, P. (1993) Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. *Veterinary Parasitology* 47, 107-118.
- ITO, H., YAMAMOTO, S., KUROGA, S., SAKAMOTO, H., KAJIHARA, J., KIYOTA, T., HAYASHI, H., KATO, M. & SEKO, M. (1986) Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA coding for rabbit tumor necrosis factor. *DNA* 5, 149-156.
- J
- JANSE VAN VUUREN, A.M., CRAUSE, J.C., VERSCHOOR, J.A., SPICKETT, A.M. & NEITZ, A.W. (1992) The identification of a shared immunogen present in the salivary glands and gut of ixodid and argasid ticks. *Experimental and Applied Acarology* 15, 205-210.
- JAWORSKI, O.C., MULLER, M.T., SIMMEN, F.A. & NEEHAM, G.R. (1990) *Amblyomma americanum*: Identification of tick salivary gland antigens from unfed and early feeding females with comparisons to *Ixodes dammini* and *Dermacentor variabilis*. *Experimental Parasitology* 70, 217-226.
- JOHNSTON, T.H. & BANCROFT, M.J. (1918) A tick resistant condition in cattle. *Proceedings of the Royal Society of Queensland* 30, 219-317.
- K
- KAMAL, K.A. & HIGASHI, G.I. (1982) Suppression of mitogen-induced lymphocyte transformation by plasma from patients with hepatosplenic *Schistosomiasis mansoni*: role of immune complexes. *Parasite Immunology* 4, 283-298.
- KAPLAN, G., KIESSLING, R., TEKLEMARIAM, S., HANCOCK, G., SHEFTEL, G., JOB, C.K., CONVERSE, P., OTTENHOF, T.H.M., BECK-BLEUMINK, M., DIETZ, M. & COHN, Z.A. (1989) The reconstitution of cell-mediated immunity in the cutaneous lesions of lepromatous leprosy by recombinant interleukin-2. *Journal of Experimental Medicine* 169, 893-907.
- KAPLAN, G., BRITTON, W.J., HANCOCK, G.E., THEUVENET, W.J., SMITH, K.A., JOB, C.K., ROCHE, P.W., MOLLOY, A., BURKHARD, R., BARKER, J., PRADHAN, H.M. & COHN, Z.A. (1991) The systemic influence of recombinant interleukin-2 on the manifestations of lepromatous leprosy. *Journal of Experimental Medicine* 173, 993-1006.
- KAUFMAN, W.R. (1989) Tick-host interaction: A synthesis of current concepts. *Parasitology Today* 5, 47-58.
- KAWASHIMA, K. & PLATT, K.B. (1989) The effect of human recombinant interleukin-2 on the porcine immune response to a pseudorabies virus subunit vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 22, 345-353.
- KEMP, D.J. & BOURNE, A. (1980) *Boophilus microplus*: the effect of histamine on the attachment of cattle-tick larvae: studies *in vivo* and *in vitro*. *Parasitology* 80, 487-496.
- KERN, P., HEMMER, C.J., VAN DAMME, J., GRUSS, H.-J. & DIETRICH, M. (1989) Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 serum levels as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *American Journal of Medicine* 87, 139-143.
- KONGSHAVN, P.A.L. & GHADIRIAN, E. (1988) Enhancing and suppressive effects of tumor necrosis factor/cachectin on growth of *Trypanosoma musculi*. *Parasite Immunology* 10, 581-588.
- KOUDSTAAL, D., KEMP, D.H. & KERR, J.D. (1978) *Boophilus microplus*: rejection of larvae from British breed cattle. *Parasitology* 78, 379-386.

- KOWNATZKI, E., KAPP, A. & UHRICH, S. (1988) Modulation of human neutrophilic granulocyte functions by recombinant human tumor necrosis factor and recombinant human lymphotaxin. Promotion of adherence, inhibition of chemotactic migration and superoxide anion release from adherent cells. *Clinical Experimental Immunology* 74, 143-148.
- KRADIN, R.L., KURNICK, J.T., PREFFER, F.I., DUBINETT, S.M., DICKERSEN, G.R. & PINTO, C. (1989) Adoptive immunotherapy with IL-2 results in the loss of delayed-type hypersensitivity response and the development of immediate hypersensitivity to recall antigens. *Clinical Immunology and Immunopathology* 50, 184-195.
- KRISTENSEN, F., KRISTENSEN, B. & LAZARY, S. (1982) The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 3, 203-277.
- KUPPER, T.S. (1990) Role of epidermal cytokines. In: *Immunophysiology. The role of cells and cytokines in immunity and inflammation*, eds. J.J. Oppenheim and E.M. Shevach, pp. 285-305, Oxford University Press Inc., New York.
- KWIATKOWSKI, D., CANNON, J.G., MANOGUE, K.R., CERAMI, A., DINARELLO, C.A. & GREENWOOD, B.M. (1989) Tumor necrosis factor production in *Falciparum* malaria and its association with schizont rupture. *Clinical Experimental Immunology* 77, 361-366.
- L
- LARRICK, J.W., MORHENN, V., CHIANG, Y.L. & SHI, T. (1989) Activated Langerhans cells release tumor necrosis factor. *Journal of Leukocyte Biology* 45, 429-433.
- LARSEN, C., ZACHARIAE, C., MUKAIDA, N., ANDERSON, A., YAMADA, M., OPPENHEIM, J.J. & MATSUSHIMA, K. (1990) Proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor induce cytokines that are chemotactic for neutrophils, T cells and monocytes. In: *Cytokines and Lipocortins in Inflammation and Differentiation*, pp. 419-431, Wiley-Liss Inc.
- LATIF, A.A., MAINA, J.N., DHADIALLA, T.S. & NOROE, S. (1990) Histological reactions to bites of *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) fed simultaneously on naive or sensitized rabbits. *Journal of Medical Entomology* 27, 316-323.
- LAYBOURN, K.A., HISERODT, J.C., HUNT, J.M., SELL, S. & STRAYER, D.S. (1990) Natural cell-mediated immunity in the rabbit. *Cellular Immunology* 129, 519-527.
- LIEW, F.Y., PARKINSON, C., MILLOTT, S., SEVERN, A. & CARRIER, M. (1990) Tumor necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. I. TNF- α mediates heat protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology* 69, 570-573.
- LIMO, M.K., VOIGT, W.P., TUMBO-OERI, A.G., NJOGU, R.M. & OLE-MOIYOI, O.K. (1991) Purification and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus*. *Experimental Parasitology* 72, 418-429.
- LIVINGSTON, D.L., APPEL, S.H., SONNENFELD, G. & MALANCONI, M.A. (1989) The effect of tumor necrosis factor- α and interferon- γ on neutrophil function. *Journal of Surgical Research* 46, 322-326.
- LIZ, J. & PFISTER, K. (1989) Enquête sur l'Ehrlichiose bovine (fièvre de pèture) en Suisse. *Revue suisse de médecine vétérinaire (Swiss Vet)* 8, 7-8.
- LIZ, J., AESCHLIMANN, A. & PFISTER, K. (1991) Tick-borne fever (*Ehrlichia phagocytophila*) as a significant disease in cattle in Switzerland. In: *Rickettsiae and Rickettsial Diseases: Proceedings of the IVth international symposium Bratislava, 1-6.10.1990*, eds. J. Kazar, D. et D. Raoult, pp. 740-750, Slovak Academy of Sciences.
- LLOYD, A.R. & OPPENHEIM, J.J. (1992) Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunology Today* 13, 159-172.
- LOTZE, M.T., MATORY, Y.L., ETTINHAUSEN, S.E., RAYNER, A.A., SHARROW, S.O., SEIPP, C.A.Y., CUSTER, M.C. & ROSENBERG, S.A. (1985) *In vivo* administration of purified human interleukin-2. II. Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells *in vivo* with recombinant IL-2. *Journal of Immunology* 135, 2865-2875.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the Polin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

M

- MACHIN, S.J. (1992) Clotting system. In: *Encyclopedia of Immunology*, eds I.M. Roitt and P.J. Delves, pp. 359-363, Academic Press Ltd, London.
- MALKOVSKY, M., LOVELAND, B., NORTH, M., ASHERSON, G.L., GAO, L., WARD, P. & FIERS, W. (1987) Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. *Nature* 325, 262-265.
- MARSHALL, M.E., CIBULL, M.L., PEARSON, T., HALL, C. & GOLDBLUM, S.E. (1990) Human recombinant interleukin-2 provokes infiltration of lymphocytes into myocardium and liver in rabbits. *Journal of Biological Response Modifiers* 9, 279-287.
- MATSUDA, H., FUKUI, K., KISO, Y. & KITAMURA, Y. (1985) Inability of genetically mast cell-deficient W/W^m mice to acquire resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks. *Journal of Parasitology* 71, 443-448.
- MATSUDA, H., WATANABE, N., KISO, Y., HIROTA, S., UBHIO, H., KANNAN, Y., AZUMA, M., KOYAMA, H. & KITAMURA, Y. (1990) Necessity of IgE antibodies and mast cells for manifestation of resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks in mice. *Journal of Immunology* 144, 259-262.
- MBOW, M.L., CHRISTE, M., RUTTI, B. & BROSSARD, M. (1993a) Absence of acquired resistance to nymphal *Ixodes ricinus* L. ticks in BALB/c mice developing cutaneous reactions. *Journal of Parasitology* (in press).
- MBOW, M.L., RUTTI, B. & BROSSARD, M. (1993b) Cytokines in the skin of BALB/c mice infested with *Ixodes ricinus* ticks. *Abstracts du Congrès annuel de la Société Suisse d'Immunologie et d'Allergologie*, 15-16.4.1993, Genève. (Abstract)
- MELTZER, M.S. & NACY, C.A. (1989) Delayed-type hypersensitivity and the induction of activated, cytotoxic macrophages. In: *Fundamental Immunology*, ed. W.E. Paul, pp. 765-777, Raven Press Ltd, New York.
- MING, W.J., BERSANI, L. & MANTOVANI, A. (1987) Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Immunology* 138, 1469-1474.
- MORIMOTO, A., SAKATA, Y., WATANABE, T. & MURAKAMI, N. (1989) Characteristic of fever and acute-phase response induced in rabbits by IL-1 and TNF. *American Journal of Physiology* 256, R35-R41.
- MURRAY, M.D. (1987) Effects of host grooming on louse populations. *Parasitology Today* 3, 276-278.

N

- NEED, J.T., BUTLER, J.F. & PECK, A.B. (1992) Cellular responses of laboratory mice to feedings of *Ornithodoros talaje* (Acari: Argasidae) larvae. *Journal of Medical Entomology* 29, 423-429.
- NEWMAN, I. & WILKINSON, P.C. (1989) Chemotactic activity of lymphotoxin and tumor necrosis factor alpha for human neutrophils. *Immunology* 66, 318-320.
- NICKOLOFF, B.J., KARABIN, G.D., BARKER, J.N.W.N., GRIFFITHS, C.E.M., SARMA, V., MITRA, R.S., ELDER, J.T., KUNKEL, S.L. & DIXIT, V.M. (1991) Cellular localization of interleukin-8 and its inducer, tumor necrosis factor-alpha in psoriasis. *American Journal of Pathology* 138, 129-140.
- NITHUTHAI, S. & ALLEN, J.R. (1984) Effects of ultraviolet irradiation on the acquisition and expression of tick resistance in guinea pigs. *Immunology* 51, 153-159.
- NITHUTHAI, S. & ALLEN, J.R. (1985) Langerhans cells present tick antigens to lymph node cells from tick-sensitized guinea pigs. *Immunology* 55, 157-163.

NJAU, B.C. (1989) Resistance to *Rhipicephalus evertsi evertsi* in immunosuppressed rabbits. *Veterinary Research Communications* 19, 93-102.

NUNBERG, J.H., DOYLE, M.V., YORK, S.M. & YORK, C.J. (1989) Interleukin-2 acts as an adjuvant to increase the potency of inactivated rabies virus vaccine. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 86, 4240-4243.

O

OKUSAWA, S., GELFAND, J.A., IKEJIMA, T., CONNOLLY, R.J. & DINARELLO, C.A. (1988a) Interleukin-1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *Journal of Clinical Investigation* 81, 1162-1172.

OKUSAWA, S., YANCEY, K.S., VAN DER MEER, J.W.M., ENDRES, S., LONNEMANN, G., HEFTER, K., FRANK, M.M., BURKE, J.F., DINARELLO, C.A. & GELFOND, J.A. (1988b) C5a stimulates secretion of tumor necrosis factor from human mononuclear cells *in vitro*. Comparison with secretion of interleukin-1 β and interleukin-1 α . *Journal of Experimental Medicine* 168, 443-448.

OLD, L.J. (1985) Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230, 630-632.

OPDEBEECK, J.P. & DALY, K.E. (1990) Immune responses of infested and vaccinated Hereford cattle to antigens of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 25, 99-108.

OPPENHEIM, J.J. & SCHECTER, B. (1976) Lymphocyte transformation. In: *Manual of Clinical Immunology*, ed. Rose & Friedman, pp. 81-94, American Society of Microbiology, Washington.

OTSUKA, Y., NAGANO, K., NAGANO, K., HORI, K., OH-ISHI, J.-I., HAYASHI, H., WATANABE, N. & NIITSU, Y. (1990) Inhibition of neutrophils migration by tumor necrosis factor. *Ex vivo* and *in vivo* studies in comparison with *in vitro* effect. *Journal of Immunology* 146, 2639-2643.

P

PAINE, S.H., KEMP, D.H. & ALLEN, J.R. (1983) *In vitro* feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and other mediators. *Parasitology* 88, 419-428.

PAPATHEODOROU, V. (1984) Réaction immunitaire du lepin contre la tique *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea, Ixodidae): Effets sur la composition et la digestion du repas sanguin. Thèse, Université de Neuchâtel, Suisse.

PAPATHEODOROU, V. & BROSSARD, M. (1987) C3 levels in the sera of rabbits infested and reinfested with *Ixodes ricinus* L. and in midguts of fed ticks. *Experimental and Applied Acarology* 3, 53-59.

PEARCE, F.L. (1992) Histamine. In: *Encyclopedia of Immunology*, eds. I.M. Roitt and P.J. Delves, pp. 678-681, Academic Press Ltd, London.

PENNICA, D., NEOWIN, G.E., HAYFLICK, J.S., SEEBURG, P.H., DERYNCK, R., PALLADINO, M.A., KOHR, W.J., AGGARWAL, S.B. & GOEDOEL, D.V. (1984) Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312, 724-729.

PEPYS, M.B. (1992) Acute phase proteins. In: *Encyclopedia of Immunology*, eds. I.M. Roitt and P.J. Delves, pp. 16-18, Academic Press Ltd, London.

PETTIPHER, E.R. & WHITTLE, S.J.R. (1992) Prostaglandins. In: *Encyclopedia of Immunology*, eds. I.M. Roitt and P.J. Delves, pp. 1279-1282, Academic Press Ltd, London.

PHIPPS, R.P., STEIN, S.H. & ROPER, R.L. (1991) A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunology Today* 12, 349-352.

PICKER, L.J. & BUTCHER, E.C. (1992) Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annual Review of Immunology* 10, 561-591.

R

- RAMACHANDRA, R.N. & WIKEL, S.K. (1992) Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): Effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *Journal of Medical Entomology* 29, 818-826.
- RAMPART, M., DE SMET, W., FIERS, W. & HERMAN, A.G. (1989) Inflammatory properties of recombinant tumor necrosis factor in rabbit skin *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine* 168, 2227-2232.
- RECHAV, Y., KUHN, H.G. & KNIGHT, M.M. (1980) The effects of the tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) on blood composition and weight of rabbits. *Journal of Medical Entomology* 17, 555-560.
- RECHAV, Y., CLARKE, F.C., ELS, D.A. & DAUTH, J. (1991) Development of resistance in laboratory animals to adults of the tick *Rhipicephalus evertsi evertsi*. *Medical and Veterinary Entomology* 5, 29-34.
- REDDY, P.G., BLECHA, F., MINOCHA, H.C., ANDERSON, G.A., MORRILL, J.L., FEDORKA-CRAY, P.J. & BAKER, P.E. (1989) Bovine recombinant interleukin-2 augments immunity and resistance to bovine herpesvirus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 23, 61-74.
- REES, R.C. & WILTROUT, R.H. (1990) The biology and clinical applications of interleukin-2. *Immunology Today* 11, 36-38.
- REMICK, D.G., NGUYEN, D.T., ESKANDARI, M.K. & KUNKEL, S.L. (1991) Interleukin-2 induces tumor necrosis factor gene expression *in vivo*. *Immunological Investigations* 20, 395-405.
- RIBEIRO, J.M. (1987a) Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology* 32, 463-478.
- RIBEIRO, J.M. (1987b) *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Experimental Parasitology* 64, 347-353.
- RIBEIRO, J.M.C. (1989) Role of saliva in tick/host interactions. *Experimental and Applied Acarology* 7, 15-20.
- RIBEIRO, J.M. & SPIELMAN, A. (1988) *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Experimental Parasitology* 62, 292-297.
- RIBEIRO, J.M.C., MAKOUL, G.T., LEVINE, J., ROBINSON, D.R. & SPIELMAN, A. (1985) Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *Journal of Experimental Medicine* 161, 332-344.
- RIBEIRO, J.M.C., MAKOUL, G.T. & ROBINSON, D.R. (1988) *Ixodes dammini*: Evidence for salivary prostacyclin secretion. *Journal of Parasitology* 74, 1068-1069.
- RIBEIRO, J.M., WEIS, J.J. & TELFORD, S.R. (1990) Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Experimental Parasitology* 70, 382-388.
- RIBEIRO, J.M.C., EVANS, P.M., MACSWAIN, J.L. & SAUER, J. (1992) *Amblyomma americanum*: Characterization of salivary prostaglandins E₂ and F_{2α} by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Experimental Parasitology* 74, 112-116.
- ROBERTS, J.A. (1988) Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifest. *Journal of Parasitology* 54, 687-673.
- ROBERTS, J.A. & KERR, J.D. (1976) *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. *Journal of Parasitology* 62, 485-488.
- ROITT, I.M., BROSTOFF, J. & MALE, D.K. (1985) *Immunologie fondamentale et appliquée*, pp. 1.1-25.10, ed. W.H. Fridman, MEDSI, Paris.
- ROMAGNANI, S. (1992) Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunology Today* 13, 379-381.

- ROSENBERG, S.A., GRIMM, E.A., MCGROGAN, M., DOYLE, M., KAWASAKI, E., KOTHES, K. & MARK, D.F. (1984) Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli*. *Science* **223**, 1412-1415.
- ROSENBERG, S.A. (1988) Immunotherapy of cancer using interleukin-2: current status and future prospects. *Immunology Today* **9**, 58-62.
- ROT, A. (1992) Endothelial cell binding of NAP-1/LIL-8: role in neutrophil emigration. *Immunology Today* **13**, 291-294.
- ROYALL, J.A., BERKOW, R.L., BECKMAN, J.S., CUNNINGHAM, M.K., MATALON, S. & FREEMAN, B.A. (1988) Tumor necrosis factor and interleukin-1 α increase vascular endothelial permeability. *American Journal of Physiology* **257**, L399-L410.
- RUSCETTI, F.W. (1990) Interleukin-2. In: *Immunophysiology. The role of cells and cytokines in immunity and inflammation*, eds. J.J. Oppenheim and E.M. Shevach, pp. 46-66, Oxford University Press Inc., New York.
- RUTTI, B. & BROSSARD, M. (1989) Repetitive detection by immunoblotting of an integumental 25-kDa antigen in *Ixodes ricinus* and a corresponding 20-kDa antigen in *Rhipicephalus appendiculatus* with sera of pluriinfested mice and rabbits. *Parasitology Research* **75**, 325-329.
- RUTTI, B., BOVET, L. & BROSSARD, M. (1988a) Antigenic properties of a 25 kDa protein of *Ixodes ricinus* in rabbits. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene* **306**, 327. (Abstract)
- RUTTI, B., HAUG, T., BOVET, L. & BROSSARD, M. (1988b) Immunogenic properties in rabbits and immunohistochemical localization of a 25 kDa protein of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). *Proceedings of the 18. International Congress of Entomology*, Vancouver, p. 293. (Abstract)
- RUTTI, B., MOUCHET, M. & BROSSARD, M. (1990) Immunity against ticks: effect on the synthesis of a 25 kDa protein in the integument. *Bulletin de Société Française de Parasitologie* **8**, S5F30, p. 651. (Abstract)
- RUTTI, B., MAILLAT, I. & BROSSARD, M. (1992) Immunity against ticks: effect on the deposition of cuticular material in the integument of *Ixodes ricinus*. *Proceedings of the 1st International Conference on Tick-Borne Pathogens at the Host-Vector Interface*, St Paul, Minnesota, p.250. (Abstract)
- S
- SALAMIN, J.-L. (1988) Stimulation d'une immunité anti-*Ixodes ricinus* L. chez le lapin. Quelques aspects. Travail de certificat, Université de Neuchâtel, Suisse.
- SCHLEGER, A.V. & LINCOLN, D.T. (1976) *Boophilus microplus*: Characterization of enzymes introduced into the host. *Australian Journal of Biological Sciences* **29**, 487-497.
- SCHLEGER, A.V., LINCOLN, D.T., MCKENNA, R.V., KEMP, D.H. & ROBERTS, J.A. (1976) *Boophilus microplus*: cellular responses to larval attachment and their relationship to host resistance. *Australian Journal of Biological Sciences* **29**, 499-512.
- SCHORDERET, S. & BROSSARD, M. (1993a) Changes in immunity to *Ixodes ricinus* by rabbits infested at different levels. *Medical and Veterinary Entomology* **7**, 186-192.
- SCHORDERET, S. & BROSSARD, M. (1993b) Effects of human recombinant interleukin-2 on resistance, and on the humoral and cellular response of rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* ticks. *Veterinary Parasitology* (submitted).
- SCHREIBER, I. & CRABTREE, G.R. (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunology Today* **13**, 136-142.
- SCUDERI, P., STERLING, K.E., LAM, K.S., FINLEY, P.R., RYAN, K.J., RAY, C.G., PETERSEN, E., SLYMEN, D.J. & SALMON, S.E. (1986) Raised serum levels of tumor necrosis factor in parasitic infections. *The Lancet* **13**, 1364-1365.

- SHAPIRO, S.Z., BUSCHER, G. & DOBBELAERE, D.A.E. (1987) Acquired resistance to *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae): Identification of an antigen eliciting resistance in rabbits. *Journal of Medical Entomology* 24, 147-154.
- SHUPE, K. & STEWART, G.L. (1991) Stimulated chemotactic response in neutrophils from *Trichinella pseudospiralis*-infected mice and the neutrophilotactic potential of *Trichinella* extracts. *International Journal for Parasitology* 21, 625-630.
- SIEGEL, S. (1956) The Mann-Whitney test. In: *Non parametric statistics for the behavioral sciences*, ed. McGraw-Hill, pp. 117-127, Kogakusha Company Ltd, Tokyo.
- SILBERSTEIN, D.S. (1992) Eosinophils. In: *Encyclopedia of Immunology*, eds. I.M. Roitt and P.J. Delves, pp. 612-514, Academic Press Ltd, London.
- SIRAGANIAN, R.P. (1992) Mast cells. In: *Encyclopedia of Immunology*, eds. I.M. Roitt and P.J. Delves, pp. 1035-1038, Academic Press Ltd, London.
- SPICKETT, A.M. & HEYNE, H. (1988) A survey of Karoo tick paralysis in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 55, 89-92.
- SPRINGELL, P.H. (1983) The cattle tick in relation to animal production in Australia. In: *Selected articles from the World Animal Review*, pp. 1-5, Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome.
- STAMPA, S. (1959) Tick paralysis in the Karoo areas of South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 28, 169-226.
- STEELMAN, C.D. (1976) Effects of external and internal arthropod parasites on domestic livestock production. *Annual Review of Entomology* 21, 155-178.
- STEEVES, E.B.T. & ALLEN, J.R. (1990) Basophils in skin reactions of mast cell-deficient mice infested with *Demacenter variabilis*. *International Journal for Parasitology* 20, 655-667.
- STEEVES, E.B.T. & ALLEN, J.R. (1991) Tick resistances in mast cell-deficient mice: histological studies. *International Journal for Parasitology* 21, 265-268.
- STEVENSON, M.M., TAM, M.F. & NOWOTARSKI, M. (1990) Role of interferon- γ and tumor necrosis factor in host resistance to *Plasmodium chabaudi* AS. *Immunology Letters* 26, 115-122.
- SWAIN, S.L. (1991) Lymphokines and the immune response: The central role of interleukin-2. *Current Opinion in Immunology* 9, 304-310.
- T
- TATCHELL, R.J. (1967) A modified method for obtaining tick oral secretions. *Journal of Parasitology* 53, 1104-1107.
- TATCHELL, R.J. & MOORHOUSE, D.E. (1968) The feeding processes of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). Part II. The sequence of host-tissue changes. *Parasitology* 58, 441-459.
- TATCHELL, R.J. & MOORHOUSE, D.E. (1970) Neutrophils: their role in the formation of a tick feeding lesion. *Science* 167, 1002-1003.
- THOMSON, A.W., SMITH, S.W.G. & CHAPPEL, L.H. (1986) Cyclosporin A: immune suppressant and antiparasitic agent. *Parasitology Today* 2, 288-290.
- TITUS, R.G. & RIBEIRO, J.M.C. (1990) The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitology Today* 8, 167-160.
- TITUS, R.G., SHERRY, B. & CERAMI, A. (1989) Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine* 170, 2097-2104.
- TITUS, R.G., SHERRY, B. & CERAMI, A. (1991) The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. *Parasitology Today* 7, A13-A16.

- TO, S.T.T. & SCHRIEBER, L. (1990) Effect of leukotriene B₄ and prostaglandin E₂ on the adhesion of lymphocytes to endothelial cells. *Clinical and Experimental Immunology* 81, 160-165.
- TRACEY, K.J., BEUTLER, B., LOWRY, S.F., MERRYWEATHER, J., WOLPE, S., MILSARK, I.W., HARIRI, R.J., FAHEY, T.J., ZENTELLA, A., ALBERT, J.D., SHIRES, T. & CERAMI, A. (1986) Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234, 470-474.
- TRACEY, K.J., FONG, Y., HESSE, D.G., MANOGUE, K.R., LEE, A.T., KUO, G.C., LOWRY, S.F. & CERAMI, A. (1987) Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330, 662-664.
- TRAGER, W. (1939) Acquired immunity to ticks. *Journal of Parasitology* 25, 57-79.
- U
- UNANUE, E.R. (1992) Antigen presenting cells. In: *Encyclopedia of Immunology*, eds. I.M. Roitt and P.J. Delves, pp. 114-115, Academic Press Ltd, London.
- V
- VANARSDDEL, P.P. (1992) Acute inflammatory reaction. In: *Encyclopedia of Immunology*, eds. I.M. Roitt and P.J. Delves, pp. 15-16, Academic Press LTD, London.
- VASSALLI, P. (1992) The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annual Review of Immunology* 10, 411-452.
- VILJOEN, G.J., BEZUIDENHOUT, J.D., OBEREM, P.T., VERMEULEN, N.M.J., VISSER, L., GOTHE, R. & NEITZ, A.W.H. (1986) Isolation of a neurotoxin from the salivary glands of female *Rhipicephalus evertsi evertsi*. *Journal of Parasitology* 72, 865-874.
- W
- WAAGE, A., HALSTENSEN, A., SHALABY, R., BRANDTZAEG, P., KIERULF, P. & ESPEVIK, T. (1989) Local production of tumor necrosis factor α , interleukin-1, and interleukin-6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *Journal of Experimental Medicine* 170, 1859-1867.
- WALKER, A.R. & FLETCHER, J.D. (1986) Histological study of the attachment sites of adult *Rhipicephalus appendiculatus* on rabbits and cattle. *International Journal for Parasitology* 16, 399-413.
- WALKER, C., KRISTENSEN, F., BETTENS, F. & DEWECK, A.L. (1983) Lymphokine regulation of activated (G₁) lymphocytes. I. Prostaglandin E₂-induced inhibition of interleukin-2 production. *Journal of Immunology* 130, 1770-1773.
- WANG, B.S., HEACOCK, E.H., ZHENG, C.-X., TILNEY, N.L. & MANNICK, J.A. (1982) Restoration of allogeneic responsiveness of lymphocytes from cyclosporin A-treated animals with interleukin-2. *Transplantation* 33, 454-456.
- WARREN, J.S. (1990) Interleukins and tumor necrosis factor in inflammation. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 28, 37-59.
- WEINBERG, A. & MERIGAN, T.C. (1988) Recombinant interleukin-2 as an adjuvant for vaccine-induced protection. Immunization of guinea pigs with *Herpes simplex virus* subunit vaccines. *Journal of Immunology* 140, 294-299.
- WESTERMANN, J. & PABST, R. (1990) Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunology Today* 11, 406-410.
- WEYAND, C.M., GORONZY, J., DALLMAN, M.J. & FATHMAN, C.G. (1986) Administration of recombinant interleukin-2 *in vivo* induces a polyclonal IgM response. *Journal of Experimental Medicine* 163, 1607-1612.
- WHEATER, P.R. & BURKITT, H.G. (1988) *Histologie fonctionnelle*. MEDSI/McGraw-Hill, Paris.

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée sous la direction du professeur Michel Brossard de l'Université de Neuchâtel. Je tiens ici à lui exprimer ma plus profonde gratitude pour le soutien, les conseils et les encouragements qu'il a su me prodiguer tout au long de ce travail.

Je remercie les Dr. Bernard Rutti de l'Université de Neuchâtel, Serge Martinod de SmithKline Beecham Nebraska, et Kurt Pfister du K. Pfister Labor de Berna, d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Ma gratitude s'adresse également à la direction et au personnel du laboratoire Bio-Vet de Ciba-Geigy à Saint-Aubin, et plus particulièrement au Dr. Serge Martinod et à Mme Béatrice Siegenthaler-Dafion, pour m'avoir accueillie dans leurs locaux et permis d'apprendre certaines techniques nécessaires à mon travail. Je garde un souvenir merveilleux de ce séjour.

Je remercie aussi toutes les personnes qui m'ont aidés et encouragés dans la réalisation de ce travail:

- Le Professeur André Aeschlimann, pour sa bienveillance paternelle à mon égard, et pour m'avoir donné le goût à la parasitologie.
- Mme Marlène Knutti, pour sa collaboration et les soins prodigués aux animaux de l'animalerie.
- Olivier Rais et Albin Collaud, pour leurs innombrables coups de main "au bon moment".
- Mme Jacqueline Moret, pour ses conseils concernant le traitement statistique des résultats.
- Les Dr Bernard Rutti, Jean-Marc Weber et Patrick Guerin pour l'aide aux corrections des manuscrits de publications.
- Le Dr Ellen M. Dotson pour les améliorations apportées au résumé anglais du manuscrit de thèse.
- Mme Josiane Pont, pour sa disponibilité et son aide dans mes recherches bibliographiques.
- L'équipe du labo d'Immunologie, pour les discussions souvent fructueuses et tous les petits services rendus.
- Le personnel du Diagnostique parasitaire, toujours prêt à "être dérangé" pour n'importe quoi, avec le sourire.
- Toutes les personnes amies de l'institut de Zoologie, avec une pensée émue et triste pour Jacques Beuret, pour les bons moments passés "au thé" et ailleurs...

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement mon ami Jean-Marc, ainsi que mes parents, pour leur soutien moral tout au long de ces années de thèse.

Ce travail a bénéficié du soutien financier du Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique, bourse n°3.628.087.

- WHEELER, C.M., COLEMAN, J.L., HABICHT, G.S. & BENACH, J.L. (1989) Adult *Ixodes dammini* on rabbits: development of acute inflammation in the skin and immune responses to salivary gland, midgut and spirochetal components. *Journal of Infectious Diseases* 169, 265-273.
- WIKEL, S.K. (1979) Acquired resistance to ticks. Expression of resistance by C4 deficient guinea pigs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 28, 586-590.
- WIKEL, S.K. (1982a) Immune responses to arthropods and their products. *Annual Review of Entomology* 27, 21-48.
- WIKEL, S.K. (1982b) Histamine content of tick attachment sites and the effects of H_1 and H_2 histamine antagonists on the expression of resistance. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 76, 179-185.
- WIKEL, S.K. (1982c) Influence of *Dermacentor andersoni* infestation on lymphocyte responsiveness to mitogens. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 76, 627-632.
- WIKEL, S.K. (1984) Immunomodulation of host responses to ectoparasite infestation - an overview. *Veterinary Parasitology* 14, 321-339.
- WIKEL, S.K. (1985) Effects of tick infestation on the plaque-forming cell response to a thymic dependent antigen. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 79, 195-198.
- WIKEL, S.K. & ALLEN, J.R. (1976a) Acquired resistance to ticks. I. Passive transfer of resistance. *Immunology* 30, 311-316.
- WIKEL, S.K. & ALLEN, J.R. (1976b) Acquired resistance to ticks. II. Effects of cyclophosphamide on resistance. *Immunology* 30, 479-484.
- WIKEL, S.K. & ALLEN, J.R. (1977) Acquired resistance to ticks. III. Cobra venom factor and the resistance response. *Immunology* 32, 457-465.
- WIKEL, S.K. & ALLEN, J.R. (1982) Immunological basis of host resistance to ticks. In: *Physiology of ticks*, eds. F.D. Obenchain and R. Galun, pp. 169-196, Pergamon Press, Elmsford, New York.
- WIKEL, S.K. & OSBURN, R.L. (1982) Immune responsiveness of the bovine host to repeated low-level infestations with *Dermacentor andersoni*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 76, 405-414.
- WIKEL, S.K. & WHELEN, A.C. (1986) Ixodid-host immune interaction. Identification and characterization of relevant antigens and tick-induced host immunosuppression. *Veterinary Parasitology* 20, 149-174.
- WIKEL, S.K., GRAHAM, J.E. & ALLEN, J.R. (1978) Acquired resistance to ticks. IV. Skin reactivity and *in vitro* lymphocyte responsiveness to salivary gland antigen. *Immunology* 34, 257-263.
- WILLADSEN, P. (1980) Immunity to ticks. *Advances in Parasitology* 18, 293-313.
- WILLADSEN, P. & RIDING, G.A. (1979) Characterization of a proteolytic-enzyme inhibitor with allergenic activity. Multiple functions of a parasite-derived protein. *Biochemical Journal* 177, 41-47.
- WILLADSEN, P. & RIDING, G.A. (1980) On the biological role of proteolytic-enzyme inhibitor from the ectoparasite tick *Boophilus microplus*. *Biochemical Journal* 189, 295-303.
- WILLADSEN, P., WILLIAMS, P.G., ROBERTS, J.A. & KERR, J.D. (1978) Responses of cattle to allergens from *Boophilus microplus*. *International Journal for Parasitology* 8, 89-96.
- WILLADSEN, P., WOOD, G.M. & RIDING, G.A. (1979) The relation between skin histamine concentration, histamine sensitivity, and the resistance of cattle to the tick, *Boophilus microplus*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 69, 87-93.
- WILLADSEN, P., MCKENNA, R.V. & RIDING, G.A. (1987) Purification and characterization of an esterase from the tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry* 17, 659-664.

WILLADSEN, P., RIDING, G.A., MCKENNA, R.V., KEMP, D.H., TELLAM, R.L., NIELSEN, J.N., LAHNSTEIN, J., COBON, G.S. & GOUGH, J.M. (1989) Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *Journal of Immunology* 143, 1346-1351.

WILLIAMSON, B.D., CARSWELL, E.A., RUBIN, B.Y., PRENDERGAST, J.S. & OLD, L. (1983) Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 80, 5397-5401.

WONG, J.Y.M. & OPDEBEECK, J.P. (1989) Protective efficacy of antigens solubilized from gut membranes of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Immunology* 66, 149-155.

Y

YOKOTA, S., GEPPERT, T.D. & LIPSKY, P.E. (1988) Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor- α . *Journal of Immunology* 140, 531-538.

Z

ZACHARIAE, C.O.C. & MATSUSHIMA, K. (1992) Interleukin-8. In: *Encyclopedia of Immunology*, eds. I.M. Roitt and P.J. Delves, pp. 922-925, Academic Press Ltd, London.

ZALOOM, Y., WALSH, L.P., MCCULLOCH, P. & GALLAGHER, G. (1991) Enhancement of a delayed hypersensitivity reaction to a correct allergen, by the systemic administration of interleukin-2. *Immunology* 72, 584-587.

ZHANG, Y., RAMOS, B.P. & JAKSCHIK, B.A. (1992) Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science* 258, 1957-1959.