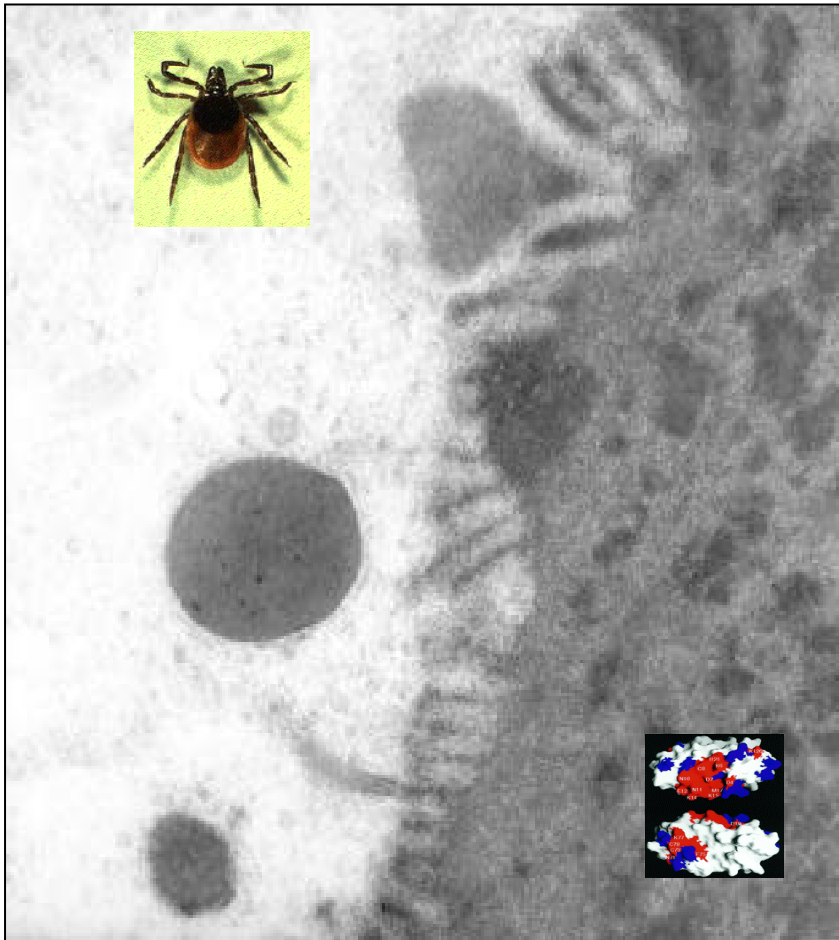


Etude des gènes exprimés au cours du repas sanguin dans l'intestin de la tique *Ixodes ricinus*



Thèse

Présentée à la faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
Pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences

Par

Steve Jacot

IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Etude des gènes exprimés au cours du repas
sanguin dans l'intestin de la tique *Ixodes Ricinus***

de M. Steve Jacot

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES


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

Mmes L. Gern, S. Schorderet Weber (St-Aubin)
MM. B. Betschart (directeur de thèse) et
P. Diehl

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 5 février 2003

Le doyen:



F. Zwahlen

Tables des matières

Résumé	p.4
---------------	-----

I. Introduction

I.1. Généralités	p.7
I.2. Ecologie et cycle biologique d' <i>Ixodes ricinus</i>	p.8
I.3. Biologie et physiologie de la digestion chez les Ixodidés	p.8
I.3.1. Anatomie de l'appareil digestif	p.9
I.3.2. Histologie de l'appareil digestif à jeun et pendant le repas sanguin	p.9
I.3.3. Physiologie de la digestion	p.11
I.4. Substances impliquées dans la physiologie des tiques	p.13
I.4.1. Descriptions et fonction	p.13
I.4.2 Méthodes utilisées pour l'isolement des substances impliquées dans la physiologie des tiques	p.16
I.5. La membrane péritrophique chez les tiques	p.17
I.6. Buts du travail	p.18

II. Matériel et Méthodes

II.1. Tiques	p.20
II.1.1. Dissection des tiques femelles	p.20
II.2. Isolement de l'ARN total	p.20
II.3. Isolement de l'ARNm	p.21
II.4. RT-PCR	p.22
II.5. Clonage des produits issus de la RT-PCR (pour la constitution d'une banque d'ADNc)	p.22
II.6. RDA	p.23
II.7. RACE	p.26
II.8. Isolement de la partie codante des gènes	p.28
II.9. Clonage de la partie codante des gènes	p.29
II.10. Séquençage	p.29
II.11. Expression et purification des protéines de fusion	p.30
II.12. Production des anticorps	p.32
II.13. Western Blots	p.33
II.14. Microscopie électronique et immunocytochimie	p.33
II. 15. Cultures de borrelies <i>in vitro</i>	p.34

III. Résultats

III.1. Caractéristiques des banques d'ADNc de l'intestin des tiques	p.37
III.2. Gènes spécifiques aux tiques gorgées	p.40
III.2.1. Constitution d'une banque soustractive d'ADNc provenant de l'intestin au cours du repas sanguin par la méthode RDA	p.40

III.2.2. Isolement des gènes complets par RACE	p.44
III.2.3. Caractérisation des gènes complets	p.47
III.3. Expression des protéines cystatine et allergène	p.54
III.3.1. Amplification des parties codantes	p.54
III.3.2. Purification des protéines recombinantes	p.55
III.4. Caractérisation de la spécificité des anticorps produits contre la cystatine et l'allergène	p.58
III.5. Cinétique de l'expression de la cystatine et de l'allergène durant le repas sanguin de la tique	p.60
III.6. Localisation de la cystatine et de l'allergène dans l'intestin des tiques par immunocytochimie	p.62

IV. Discussion

IV.1. Préparation des tiques pour l'Isolement de l'ARNm	p.74
IV.2. Caractéristiques des banques d'ADNc	p.74
IV.3. Gènes spécifiques aux tiques gorgées	p.76
IV.3.1. Fragments obtenus par RDA	p.76
IV.3.2. Identification des gènes soustractifs obtenus par RACE	p.78
IV.3.3. Cystatine	p.79
IV.3.4. Glutathion peroxydase	p.82
IV.3.5. Allergène	p.83
IV.4. Conclusions	p.87

V. Bibliographie

p.90

VI. Remerciements

p.103

Résumé

Les tiques sont parmi les plus importants vecteurs de maladies humaines et animales en raison de leurs multiples repas sanguins nécessaires pour leur développement. Ces arthropodes ectoparasites sont responsables de très grandes pertes économiques dans l'élevage du bétail notamment. De nombreux scientifiques ont cherché à isoler des molécules impliquées dans des rôles physiologiques essentiels pour les tiques (lutte contre le système immunitaire de l'hôte, digestion du sang par exemple), dans le but de produire un vaccin pour lutter efficacement contre ces parasites.

Les différentes cellules intestinales des tiques produisent une variété de substances pendant le repas sanguin. La digestion chez ces arthropodes est principalement intracellulaire, mais plusieurs molécules sont aussi sécrétées dans la lumière intestinale ainsi que dans l'hémolymphe. Les séquences nucléotidiques et protéiques de nombreuses molécules ont été décrites chez les tiques, la majorité étant isolée à partir des glandes salivaires. Quelques études biochimiques et histologiques ont été réalisées sur l'intestin des tiques et peu de gènes fonctionnels impliqués dans la digestion du repas sanguin ont été décrits. Seules quelques séquences codant pour des enzymes protéolytiques comme des cathepsines ont été publiées.

Ce travail porte sur les gènes impliqués dans la physiologie de la digestion chez *Ixodes ricinus*, la tique la plus commune en Suisse. Les travaux décrivant des molécules isolées dans l'intestin chez cette espèce sont très rares. L'approche utilisée dans cette étude pour identifier des substances intestinales impliquées dans la physiologie de la digestion a été de fabriquer des banques d'ADNc à partir d'ARNm provenant d'intestins de tiques femelles à jeun et partiellement gorgées pendant 5 jours. Ces banques ont été analysées pour la recherche de gènes participant à la digestion. Seul un gène codant pour une cathepsine L, une enzyme protéolytique déjà décrite chez d'autres espèces de tiques, a pu être identifié de cette manière. Une technique d'hybridation soustractive, la RDA (Representational Difference Analysis) a été utilisée pour obtenir des fragments de gènes spécifiques aux tiques gorgées uniquement. Les parties manquantes de ces fragments ont été obtenues grâce à la technique RACE (Rapid amplification of cDNA Ends). Trois gènes ont été obtenus, dont les parties codantes ont été identifiées. La recherche d'homologies de séquences avec les banques de données existantes a permis de caractériser ces trois gènes : un gène de 875 pb codant pour une cystatine (15 kDa), un de 914 pb codant pour une glutathion peroxydase (23.8 kDa) et un gène de 717 pb codant pour un allergène d'acarien (12.3 kDa). La cystatine et l'allergène sont des protéines sécrétées dans la lumière intestinale car toutes les deux présentent un peptide signal à leur extrémité N-terminale. La détermination du compartiment intra- ou extracellulaire de la glutathion peroxydase est plus floue, deux acides aminés méthionine différents pouvant être chacun le codon « start », impliquant la présence d'un peptide signal dans un cas et pas l'autre. Des anticorps anti-cystatine et anti-allergène ont été produits dans des souris pour pouvoir suivre la cinétique de sécrétion de ces protéines pendant le repas sanguin et permettre leur localisation par immunocytochimie. La détection de la cystatine n'a pas donné de résultats probants, celle-ci étant probablement sous une forme masquant les épitopes. La protéine allergène a démontré une présence spécifique au niveau de certaines vésicules de sécrétion des cellules sécrétrices intestinales. Du premier jour de gorgement jusqu'au 6^{ème} jour, cet allergène est présent dans ces cellules, avec une concentration maximale aux jours 3 à 5.

Les fonctions possibles de ces 3 molécules isolées dans l'intestin d'*I. ricinus* ont été discutées. La cystatine serait impliquée dans la défense antibactérienne des tiques en inhibant probablement les protéases des pathogènes contenus dans l'intestin. La glutathion peroxydase empêcherait l'oxydation des molécules biologiques due aux radicaux peroxydes dans la cellule si cette enzyme est intracellulaire, et empêcherait les dommages oxydatifs de l'épithélium intestinal dus à la toxicité

de l'hème si cette enzyme est extracellulaire. L'allergène serait impliqué dans un processus digestif indéfini ou ferait partie du système antibactérien des tiques.

Ces trois substances permettent de compléter la connaissance des mécanismes de digestion des tiques, et ainsi de mieux comprendre leur mode de vie particulier.

I. Introduction

I.1. Généralités

Les tiques sont des arthropodes ectoparasites obligatoires présents sur tous les continents et sont parmi les plus importants vecteurs de maladies humaines et animales. La diversité des organismes pathogènes transmis par les tiques inclut champignons, virus, rickettsies, nématodes, bactéries et protozoaires et excède ceux trouvés chez tous les autres arthropodes (Sonenshine, 1991).

Les dommages résultant du repas sanguin des tiques et le coût du contrôle des pathogènes qu'ils transmettent sont les plus grandes sources de pertes économiques dans l'élevage du bétail (Mulenga et al., 2001). La seule méthode de lutte disponible partout est le contrôle des tiques par l'utilisation d'acaricides. Cette approche est associée à de sérieuses limitations telles que la contamination de l'environnement et de la chaîne alimentaire par ces substances ainsi que la résistance des tiques à ces acaricides (Willadsen et al., 1989). D'autres méthodes récentes sont plus écologiques, comme la protection immunologique des hôtes contre l'infection des tiques par vaccination. Cependant le succès de cette méthode est dépendant de l'identification de molécules clefs impliquées dans la médiation de rôles physiologiques indispensables. Ces molécules pourraient être utilisées comme antigènes pour la fabrication de vaccins (Elvin et Kemp, 1994). Quelques résultats probants de vaccination du bétail contre les tiques ont été obtenus avec une protéine réceptrice provenant de la surface membranaire des cellules intestinales de tiques en Australie (Willadsen et al., 1989). Il faudrait néanmoins combiner un vaccin contenant des anticorps dirigés contre plusieurs antigènes (intestinaux et des glandes salivaires notamment) pour une meilleure efficacité (Riding et al., 1994). Pour ça, il faut que les antigènes soient des substances (par exemple protéines) sécrétées à l'extérieur de la cellule ou des molécules réceptrices associées aux membranes du côté extracellulaire (comme c'est le cas avec la protéine isolée par Willadsen et al.(1989)) pour que les anticorps puissent y avoir accès (Mulenga et al., 2001).

Il faut donc connaître les mécanismes physiologiques de digestion des tiques dans tous les détails pour mieux comprendre leur physiologie durant le repas sanguin et ainsi pouvoir lutter efficacement contre elles.

Les tiques sont des arthropodes hématophages appartenant à l'ordre des Acariens qui est divisé en trois familles (tableau 1) : les tiques dures (Ixodidés) présentant dorsalement un scutum sclérotisé, les tiques molles (Argasidés) sans scutum, et les Nuttalliellidés représentés par une seule espèce (*Nuttalliella namaqua*) et montrant des caractères particuliers intermédiaires.

Tableau 1 : Taxonomie des tiques avec les genres principaux (Hoogstraal et Aeschlimann, 1982)

Phylum	Arthropoda						
Classe	Chelicerata						
Sous-Classe	Arachnida						
Ordre	Acari						
Sous-Ordre	Metastigmata						
Famille	Ixodidés					Argasidés	Nuttalliellidés
Sous-famille	Ixodinés	Amblyomminés	Rhipicephalinés	Hyalomminés	Haemaphysalinés		
Genre	<i>Ixodes</i>	<i>Aponomma</i> <i>Amblyomma</i>	<i>Boophilus</i> <i>Dermacentor</i> <i>Rhipicentor</i> <i>Rhipicephalus</i>	<i>Hyalomma</i>	<i>Haemaphysalis</i>	<i>Argas</i> <i>Ornithodoros</i> <i>Otobius</i>	<i>Nuttalliella</i>

I.2. Ecologie et cycle biologique d'*Ixodes ricinus*

Les tiques de la famille des Ixodidés ont une distribution mondiale (Hoogstraal et Aeschlimann, 1982). La tique *I. ricinus* est la plus commune en Suisse où elle abonde. Sa distribution géographique est associée aux forêts riches en feuillus et dépend des conditions thermiques et hygrométriques nécessaires à son développement (Gigon, 1985). De manière générale, elle préfère les milieux relativement humides ne présentant pas un ensoleillement trop intense. Ainsi, elle se rencontre dans les 4 régions géographiques de Suisse, bien présente à des altitudes inférieures à 1000 mètres (Aeschlimann, 1972), mais peut être observée jusqu'à des hauteurs comprises entre 1200 et 1500 mètres (Graf, 1978a). Cotty et al. (1986) ont observé *I. ricinus* en Suisse à une altitude maximale de 1450 mètres.

I. ricinus évite les forêts composées uniquement de conifères, mais est présente dans les forêts de feuillus riches en sous-bois. Elle abonde également le long des lisières de forêt et des chemins forestiers (Aeschlimann, 1972).

Le cycle biologique comporte 3 stades successifs : larve, nymphe, adulte. Chacun d'eux effectue un repas sanguin sur un vertébré (cycle triphasique trixène). A la suite de son repas sur un hôte, la femelle dépose sa ponte au sol, composée de 2 à 3 milliers d'œufs, puis elle meurt peu de temps après (Graf, 1978c). Chaque larve fraîchement éclosée va alors prendre un repas sanguin qui dure 3 à 5 jours, puis la larve gorgée abandonne son hôte, et, après une phase libre de quelques semaines, se mue en nymphe. Celle-ci doit à son tour procéder à la recherche d'un hôte adéquat sur lequel elle effectuera un repas sanguin de 3 à 5 jours. La phase libre qui suit, permettra le passage au stade adulte. Une nouvelle quête de l'hôte interviendra alors, et ce quel que soit le sexe, bien qu'habituellement, seule la femelle effectue un véritable repas sanguin, d'une durée de 7-10 jours. L'accouplement peut avoir lieu sur l'hôte ce qui suppose qu'un même animal soit parasité simultanément par des individus des deux sexes de la même espèce de tique. Graf (1978b) a cependant montré que la copulation chez *I. ricinus* avait principalement lieu hors de l'hôte dans la végétation. Le mâle peut féconder plusieurs femelles, puis meurt peu de temps après.

Le choix de l'hôte se fait suivant le stade de la tique : les larves se nourrissent principalement sur les rongeurs, les nymphes sur de plus grands hôtes (rongeurs, oiseaux, vertébrés de taille moyenne) et les adultes sur de grands animaux (chevreuils, cerfs, bétail). Les hôtes appartiennent donc à un large spectre d'espèces et l'homme constitue toujours un hôte accidentel pour ces tiques qui ne sont jamais domestiques ou péridomestiques (Aeschlimann, 1972 ; Turrian-Vittoz et Humair, 1990). La durée du cycle est d'environ 3 ans, avec en moyenne un repas sanguin par année.

I.3. Biologie et physiologie de la digestion chez les Ixodidés

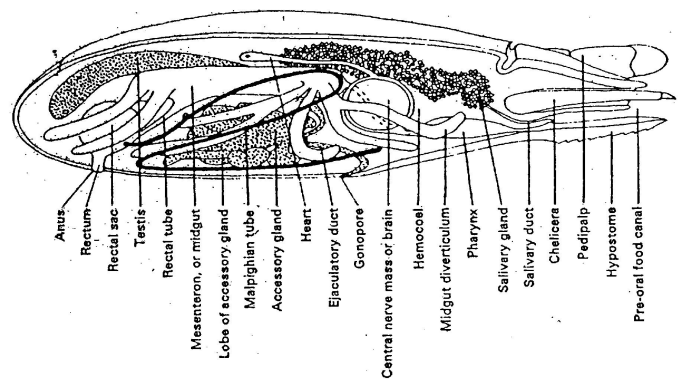
La digestion du repas sanguin joue un rôle essentiel dans la biologie de la tique. Des processus importants tels que la mue ou la production des œufs requièrent une énergie considérable et ne peuvent avoir lieu que grâce aux apports de nutriments fournis par l'activité digestive (Grandjean, 1984).

I.3.1. Anatomie de l'appareil digestif

Le système digestif se divise en 3 parties (cf figure 1 A) : la partie antérieure (comprenant le pharynx et l'œsophage), l'intestin moyen (composé d'un ventricule central ou estomac et de plusieurs diverticules ou caeca qui remplissent la cavité générale) et la partie postérieure (formée par l'ampoule rectale qui débouche sur l'anus). Le système excréteur est formé de deux tubes de Malpighi qui éliminent les produits azotés sous forme de guanine dans l'ampoule rectale. Chez les Ixodidés tous les processus digestifs ont lieu dans le ventricule et les caeca (Coons et Alberti, 1999).



A



B

Figures 1 : Anatomie interne d'une tique Ixodide (*Dermacentor andersoni*) (Schmidt et Roberts, 1985).
A : Vue dorsale d'une femelle
B : Vue latérale d'un mâle

I.3.2. Histologie de l'appareil digestif à jeun et pendant le repas sanguin

L'intestin moyen est composé d'une couche de cellules épithéliales reposant sur une membrane basale qui est recouverte extérieurement par deux couches de muscle circulaire et longitudinal qui déplacent le repas sanguin à travers l'intestin moyen par péristaltisme (Coons et Alberti, 1999). Chez les tiques femelles à jeun, cet épithélium consiste en une simple couche de cellules indifférenciées avec quelques endosomes contenant de l'hémoglobine non-digérée provenant du repas sanguin du stade nymphal précédent (Koh et al., 1991 ; Tarnowski et Coons, 1989). Ceci suggère que l'épithélium intestinal sert de réserve de nourriture chez les tiques à jeun. Très peu d'ARN est présent dans les cellules épithéliales des tiques à jeun (Aguey et al., 1992). Les organites cellulaires (mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi), ainsi que les microvillis sont également en nombre très réduit dans les cellules intestinales des femelles à jeun (Tarnowski et Coons, 1989) et la lumière de l'intestin est très petite.

Dès le début du repas sanguin, il y a une accumulation d'ARN dans les cellules intestinales, preuve d'une synthèse intense de protéines (Agyei et al., 1992). La lumière intestinale va augmenter progressivement de volume. La différenciation des cellules intestinales au cours du repas sanguin a été étudiée par de nombreux chercheurs (Agbede et Kemp (1985), (1987) sur *Boophilus microplus*; Agyei et al. (1992) et Agyei et Runheim (1995) sur *B. microplus* et *Rhipicephalus appendiculatus*; Araman (1979) sur *Rhipicephalus sanguineus*; Balashov (1972) sur les Ixodidés en général ; Coons et al. (1986) sur *Ornithodoros moubata* et *Dermacentor andersoni* ; Grandjean (1984) sur *O. moubata* ; Koh et al. (1991) sur *Haemaphysalis longicornis* ; Tarnowski et Coons (1989) sur *D. andersoni*). La majorité de ces études ont donc été réalisées sur les Ixodidés. Si le nombre de cellules décrites (de trois types à plus de six) varie suivant les auteurs, quatre types de cellules se distinguent d'une manière générale chez tous ces auteurs, même si les noms varient :

- des cellules absorbant du matériel (ou cellules digestives)
- des cellules sécrétant du matériel (ou cellules sécrétrices)
- des cellules indifférenciées (« Stem cell »)
- des cellules vitellogènes (chez les femelles)

Certains auteurs écrivent que les cellules sécrétrices sont des cellules digestives différenciées (Balashov, 1972), d'autres encore montrent que les cellules sécrétrices forment une classe à part (Agyei et Runham, 1995 ; Agbede et al., 1987). Certains séparent aussi ces mêmes cellules en trois classes (S1, S2, cellules basophiles ; Agbede et Kemp, 1987). Concernant les cellules digestives, certains auteurs les séparent en cellules d'endocytose et de phagocytose (Coons et Alberti, 1999). D'autres encore divisent ces cellules en un grand nombre de classes en fonction de l'état dans lequel elles se trouvent durant les différentes parties du repas sanguin (« Prodigest cell », « Sessile digest cell », « Residual sessile digest cell », « Detached digest cell », « Spent digest cell », « Empty digest cell » ; Agyei et Runham, 1995).

Pour résumer, il semble donc qu'il existe 3 types principaux de cellules (sans compter les cellules indifférenciées) participant à la digestion : les cellules sécrétrices, digestives et vitellogènes. Ces dernières seraient une forme évoluée des cellules sécrétrices (Agbede et Kemp, 1987). Ces 3 types de cellules proviennent tous des cellules indifférenciées (« Stem cell », Tarnowski et Coons, 1989). Les différents auteurs s'accordent néanmoins sur l'ultrastructure de ces 3 types cellulaires :

- Cellules sécrétrices : leur cytoplasme est granuleux et contient une très grande concentration en réticulum endoplasmique granuleux (REG) et en vésicules provenant du Golgi. Pendant le repas sanguin, de très nombreuses vésicules se trouvent à l'apex de la cellule pour fusionner ensuite avec la membrane cellulaire pour relâcher leur contenu dans la lumière. Il n'y a par contre aucune vésicule de pinocytose ou d'endocytose à la surface de ces cellules (Agbede et Kemp, 1987). De même, aucun granule d'hématine ne se trouve dans le cytoplasme de ces cellules (Agbede et Kemp, 1987). De très nombreuses mitochondries sont présentes, preuve d'un grand besoin d'énergie pour la synthèse et le transport de molécules (Agbede et Kemp, 1987).
- Cellules digestives : celles-ci sont impliquées dans l'endocytose. Le système lysosomal bien développé est produit par le REG et l'appareil de Golgi. Ces 2 types d'organites sont néanmoins en moins grande quantité que chez les cellules sécrétrices (Tarnowski et Coons, 1989). Ces cellules actives possèdent beaucoup de microvillies bien développés et de nombreuses vacuoles de pinocytose à l'apex des cellules (Koh et al., 1991 ; Tarnowski et Coons, 1989). Le cytoplasme contient en outre des endosomes contenant des grains d'hématine (Grandjean, 1984 ; Agbede et Kemp, 1987).
- Cellules vitellogènes : chez la femelle uniquement. Leur cytoplasme contient beaucoup de vésicules, différentes de celles des cellules sécrétrices (Agbede et Kemp, 1987) car ces cellules

vitellogènes vont sécréter des substances dans l'hémolymph impliquées dans la production des œufs (Coons et Alberti, 1999).

Les observations de Diehl et Vlimant (communication personnelle) montrent que ces 3 types de cellules se retrouvent bien chez les femelles d'*I. ricinus* au cours du repas sanguin.

I.3.3. Physiologie de la digestion

Le processus de digestion chez les tiques diffère de beaucoup des insectes. Chez ces derniers, la digestion des protéines a lieu rapidement et dans la lumière intestinale. Chez les tiques, la digestion est un processus principalement intracellulaire lent (Akov, 1982). Ainsi, les pathogènes présents dans la lumière intestinale ne seraient pas directement en contact avec les enzymes protéolytiques de la tique, donc le milieu serait plus favorable pour les pathogènes qu'il ne l'est chez les insectes (Akov, 1982). Néanmoins, plusieurs auteurs ont décrit des substances antibactériennes chez les tiques (voir chapitre I.4.). Aucune enzyme qui participe à la digestion de sang n'a été montrée dans les sécrétions salivaires (Akov, 1982).

La digestion a lieu en 2 étapes : la première implique la lyse des globules rouges par une hémolysine dans la lumière intestinale (Ribeiro, 1988 ; Agbede et Kemp, 1985), la deuxième se passe intracellulairement dans les cellules intestinales, à pH acide, et implique principalement des protéines lysosomales (Mulenga et al., 1999a). Le pH du contenu des lysosomes est voisin de 3.0, alors que le pH du contenu intestinal est de 6.5 (Bogin et Hadani, 1973). Certains auteurs pensent néanmoins qu'il doit y avoir des molécules (par exemple protéases, ADNases) sécrétées dans la lumière au début de la digestion (Agyei et al., 1992 ; Renard et al., 2002 ; Diehl, comm. personnelle) en plus d'une hémolysine.

Le repas sanguin sur l'hôte peut être divisée chez les Ixodidés en une phase lente d'engorgement, elle-même subdivisée en 2 étapes (préparatoire et de croissance), et une phase rapide d'engorgement (ou phase d'expansion) (Coons et Alberti, 1999) :

1) Phase lente (dès la fixation sur l'hôte jusqu'à l'accouplement)

- préparatoire : ingestion de sang et digestion très faible, avec développement de l'épithélium intestinal et concentration du repas sanguin par élimination d'eau et de ions par les glandes salivaires (Kaufman et Sauer, 1982).
- croissance : ingestion et digestion intensive : les nutriments sont utilisés à diverses fins physiologiques dont la construction de la cuticule nécessaire à l'accroissement énorme de taille lors de la phase rapide.

L'hémolyse des globules rouges a lieu dès le 2-3^{ème} jour qui suit l'attachement (ce qui produit l'hémoglobine), et augmente durant la phase de croissance (Ribeiro, 1988). Trois types de cellules intestinales sont impliqués dans la phase lente : les cellules digestives, les cellules de remplacement et les cellules sécrétrices. Les cellules digestives internalisent le repas sanguin par endocytose principalement. Les vésicules ainsi formées vont fusionner pour donner des endosomes. Ensuite, la digestion intracellulaire commence avec la fusion de lysosomes et d'endosomes (Akov, 1982). Les produits finaux de la digestion de l'hémoglobine sont les corps résiduels (Tarnowski et Coons, 1989) ou grains d'hématine (Balashov, 1972). Certaines cellules digestives accumulent ces corps résiduels dans leur cytoplasme, et lorsque ces produits d'accumulation sont en trop grand nombre, les cellules se détachent de la membrane basale et sont libérées dans la lumière. Elles sont alors remplacées par des cellules digestives inactives (cellules de remplacement) (Coons et Alberti, 1999). De grandes concentrations d'hématine sont alors retrouvées dans la lumière intestinale (Agyei et al., 1992).

Les cellules sécrétrices synthétisent du matériel (Agbede et Kemp, 1987) dont la composition est peu décrite dans la littérature. Ces produits sécrétés sont probablement d'autres substances qu'une hémolysine (Diehl, comm. personnelle), comme des enzymes protéolytiques (voir chapitre I.4) ou les constituants de la membrane péritrophique (voir chapitre I.5).

Si la femelle fixée ne s'est pas accouplée, celle-ci reste des semaines sur l'hôte en prenant très peu de sang (phase lente) jusqu'à ce qu'elle meurt ou que l'hôte se gratte (Akov, 1982).

2) Phase rapide (après l'accouplement jusqu'au détachement de l'hôte)

expansion : phase relativement courte. La femelle prend énormément de sang, mais il y a peu de digestion (le système lysosomal est très peu actif). Coons et al. (1986) suggèrent que le passage d'une digestion active (phase lente) à une digestion très réduite (phase rapide) est le résultat d'une grande réduction ou cessation de la production des lysosomes. La quantité de sang ingéré dépend de l'espèce de tique, des conditions ambiantes, de l'hôte et de la provenance des tiques. Les *I. ricinus* au laboratoire ingèrent par exemple moins de sang que celles de la nature (Vlimant, comm. personnelle) ; le lapin, animal de laboratoire par excellence, ne constituant pas un hôte idéal pour les femelles de cette espèce (Graf, 1978c). Sur une observation de 5 *I. ricinus* du laboratoire, celles-ci passent d'un poids moyen de 2 mg avant le repas sanguin à celui de 170 mg gorgées complètement, le poids moyen après 5 jours d'engorgement étant de 30 mg (Vlimant, communication personnelle). Graf (1978c) donne le poids moyen d'*I. ricinus* femelles pleinement gorgées de 263 mg. Les poids bien inférieurs obtenus dans notre travail pourraient être le fruit d'une dégénérescence progressive de l'élevage au fil du temps, celui-ci n'ayant jamais subi aucun brassage génétique avec des tiques d'autres souches depuis sa mise en place à Neuchâtel (Schorderet Weber, comm. personnelle).

les cellules digestives ainsi que la lumière intestinale fonctionnent comme un site de stockage pour le repas sanguin (Coons et Alberti, 1999). Il n'y a pratiquement plus de corps résiduels dans le cytoplasme des cellules digestives, mais uniquement de larges endosomes remplis de composants du repas sanguin qui occupent presque tout le cytoplasme (Tarnowski et Coons, 1989). Les cellules digestives ne sont pas remplacées par les cellules de remplacement, et des cellules vitellogènes apparaissent chez les femelles (Coons et Alberti, 1999 ; Tarnowski et Coons, 1989).

Les protéases sont en quantité très faible au tout début du repas sanguin chez certaine Ixodidé (*Hyalomma excavatum* ; Bogin et Hadani (1973)), puis cela augmente toujours avec un maximum au 3^e jour qui suit la fixation. Dans les femelles gorgées complètement, l'activité est de nouveau plus basse (Bogin et Hadani, 1973).

3) Après le détachement

Les femelles de la famille des Ixodidés ont besoin habituellement de 7-10 jours pour se gorger pleinement. Il faut compter ensuite une semaine depuis le détachement jusqu'à l'apparition des œufs, puis encore quelques jours pour la ponte après quoi la femelle meurt (Graf, 1978c).

Après le détachement, la digestion dans l'intestin est constante jusqu'à la fin de la vitellogenèse et de l'oviposition. Le système lysosomal devient donc de nouveau actif, particulièrement au début de cette phase (Coons et Alberti, 1999). La majorité du repas sanguin digéré à ce stade est utilisé pour produire une protéine spécifique de la femelle appelée « vitellogénine » (Araman, 1979 ; Coons et Alberti, 1999), sécrétée par les cellules vitellogènes en très grand nombre à ce stade (Coons et Alberti, 1999).

I.4. Substances impliquées dans la physiologie des tiques

I.4.1. Descriptions et fonctions

De nombreux chercheurs ont étudié les différentes substances impliquées dans la physiologie des tiques, depuis un grand nombre d'années déjà. Certains types de molécules ont été plus étudiés que d'autres, et 3 types principaux différents de molécules se distinguent dans la littérature : les substances contenues dans les glandes salivaires, les substances antibactériennes et les enzymes protéolytiques. Les scientifiques ont également isolé plusieurs neuropeptides et neurotransmetteurs, dont les mutations génétiques chez les tiques entraînent une résistance aux acaricides (Baxter et Barker, 1999). Vu que ces substances n'ont aucune relation avec les différents mécanismes de digestion (au contraire des 3 types de molécules décrites ci-après), ces neuropeptides et neurotransmetteurs ne seront pas détaillés ici.

Substances contenues des glandes salivaires

La grande majorité des études sur les substances impliquées dans la physiologie des tiques a été réalisée sur les molécules contenues dans les glandes salivaires. Celles-ci sécrètent une grande variété de substances nécessaires à la survie des tiques pendant leur attachement en empêchant la réponse immunitaire de l'hôte et en permettant leur activité d'engorgement. Ceci inclut des molécules modulant la réponse immunitaire, qui sont probablement impliquées dans la capacité de la tique à se maintenir sur l'hôte pendant une longue période (Tsuji et al., 2001). De nombreux chercheurs manifestent un grand intérêt pour ces molécules sécrétés car les hôtes des tiques acquièrent tout de même une immunité en développant des anticorps contre ces substances des glandes salivaires après une morsure de tique déjà. Cette immunité a une influence défavorable sur l'alimentation, la mue et la fécondité des tiques (Das et al., 2001). La balance dynamique entre résistance acquise et modulation de la réponse immunitaire de l'hôte par la tique est très importante car elle influence l'engorgement et la transmission de pathogènes (Wikel, 1996). Les substances se trouvant dans les glandes salivaires peuvent être divisées en trois catégories suivant leurs modes d'action : les molécules impliquées dans l'hémostase, celles intervenant dans les processus anti-inflammatoires et enfin celles empêchant la réponse immunitaire de l'hôte à l'endroit de la morsure. Ainsi, les séquences nucléotidiques et protéiques de plusieurs **molécules intervenant dans l'hémostase** ont été décrites ; il s'agit entre autres de protéines anticoagulantes (Joubert et al., 1998 ; Das et al., 2000 ; Van de Locht et al., 1996), et d'enzymes empêchant l'aggrégation des plaquettes (Waxmam et Connolly, 1993, notamment). Une molécule similaire à l'enzyme convertissant l'angiotensine chez les mammifères, responsable de l'élévation de la pression artérielle a également été publiée (Riding et al., 1994). **Les séquences décrites des substances impliquées dans des processus anti-inflammatoires** sont composées entre autres d'une lipocaline, protéine bloquant la sérotonine et l'histamine empêchant ainsi l'inflammation de se produire (Sangamnatdej et al., 2002) et d'une protéine inhibant des cytokines responsables de l'inflammation (Leboulle et al. 2002b). **Les séquences des molécules empêchant la réponse immunitaire de l'hôte** sont les plus décrites dans la littérature. Il s'agit notamment de protéines empêchant le système complément de l'hôte de fonctionner (Valenzuela et al., 2000 ; Bergman et al., 1998) ; d'une cytokine empêchant l'action des macrophages de l'hôte (Jaworski et al., 2001) ; d'une peroxyrédoxine protégeant les tissus contre les dommages dus aux radicaux oxygène libres (Tsuji et al., 2001) et d'une glutathion peroxydase, qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène sécrété par les leucocytes empêchant ainsi l'oxydation des tissus (Das et al., 2001). Le gène codant pour une glutathion-S-transférase a également été décrit, enzyme impliquée dans de nombreuses réactions métaboliques dont la détoxification de composés xénobiotiques et la protection contre les radicaux oxygène libres (He et al., 1999 ; Rosa de Lima et al., 2002). A noter encore que cette dernière enzyme se trouve également dans l'intestin (He et al., 1999 ; Rosa de Lima, 2001). Das et al. (2001) ont décrit quant à eux 14 autres molécules présentes dans les glandes salivaires de

nymphes d'*Ixodes scapularis*, sans toutefois caractériser toutes leurs fonctions. Récemment, Valenzuela et al. (2002) ont séquencé 87 gènes exprimés dans les glandes salivaires d'*I. scapularis* femelles partiellement gorgées, le quart étant des molécules inconnues. En parcourant la littérature, il ressort donc que la majorité des substances contenues dans les glandes salivaires a été séquencée, la fonction exacte de plusieurs d'entre elles reste cependant encore à déterminer.

Toutes ces études traitant des substances sécrétées par les glandes salivaires ont été réalisées chez la famille des Ixodidés principalement. Les études traitant du genre *Ixodes* sont sous-représentées par rapport aux travaux consacrés aux autres genres. Das et al. (2001) et Valenzuela et al. (2002) ont travaillé sur de nombreux gènes exprimés dans les glandes salivaires d'*I. scapularis*. Valenzuela et al. (2000) ont isolé une enzyme qui empêche l'activation du système complément de l'hôte à l'endroit de la piqûre d'*I. scapularis*. Das et al. (2000) ont décrit une protéine anticoagulante et Das et al. (2001) ont isolé une glutathion peroxydase qui empêche l'oxydation des tissus. Lebouille et al. (2002b) ont localisé très précisément dans les glandes salivaires d'*I. ricinus* une protéine responsable de l'inhibition de cytokines intervenant dans l'inflammation. Ces auteurs ont montré, par de nombreux tests immunologiques, que cette protéine modulait la réponse immunitaire de l'hôte à l'endroit de la piqûre vers une réponse de type Th2.

Substances antibactériennes

Les tiques ont besoin d'un mécanisme de protection efficace pour se défendre contre les pathogènes potentiels (dont les bactéries) qui peuvent se trouver dans l'intestin lors du repas sanguin et migrer ensuite dans l'hémolymphe pour perturber la physiologie de la tique. La lumière intestinale des tiques, étant donné que la digestion est principalement intracellulaire, est d'ailleurs un milieu idéal pour la survie et la multiplication des microbes ingérés (Munderloh et Kurtti, 1995). Les substances antibactériennes, qu'elles aient un pouvoir lytique ou antiseptique, sont donc importantes pour le bon déroulement de la digestion de la tique et ses mécanismes physiologiques ultérieurs.

Cette catégorie de molécules a été beaucoup plus étudiée chez les insectes que chez les tiques. Des études très anciennes décrivent déjà la présence de substances présentant un pouvoir bactéricide pour certaines espèces de bactéries dans l'intestin de quelques espèces de tiques (*O. moubata* et *Argas persicus*), de moustiques, de mouches et de punaises hématophages, (Hindle et Duncan, 1925 ; Duncan, 1926). L'action de ces substances ressemble à celle d'un antiseptique (Duncan, 1926). Podboronov (1991) a montré une activité antimicrobienne contre la bactérie *Bacillus lysodeikticus* en isolant une lysozyme contenue dans l'hémolymphe et l'intestin de plusieurs espèces de tiques (*Ornithodoros pallidipes*, *O. moubata*, *Argas lahorensis* et *Hyalomma asiaticum*). Beaucoup d'articles très récents traitent de substances antibactériennes chez des insectes hématophages (Hamilton et al., 2001 ; 2002 ; entre autres) et non-parasites (Yang et al., 1998 ; entre autres). Chez les tiques, la phagocytose de bactéries du genre *Borrelia burgdorferi* a été démontrée dans l'hémolymphe de *D. variabilis* (Johns et al., 2001) et de *I. ricinus* (Kuhn et al., 1994). Chez la tique *I. scapularis* au contraire, la présence d'une activité antibactérienne dans l'hémolymphe contre *B. burgdorferi* n'a pas vraiment été observée (Johns et al., 2001).

Chez les tiques, trois substances antibactériennes spécifiques ont été isolées et caractérisées : il s'agit d'une défensine, présente dans l'hémolymphe et l'intestin d'*O. moubata* (Nakajima et al., 2001), contenant un pouvoir antibactérien contre *Staphylococcus aureus* ; d'une lysozyme de l'intestin d'*O. moubata* (Kopacek et al., 1999), substance lytique pour la bactérie *Micrococcus luteus* ; d'une boophiline, présente chez *B. microplus*, substance ayant une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* (Potterat et al., 1997) et d'un fragment de l'hémoglobine- de bovin présent dans l'intestin et l'hémolymphe de *B. microplus* (Fogaça et al., 1999), substance antimicrobienne agissant notamment contre les bactéries Gram-positives. Ainsi, d'après ces derniers auteurs, la dégradation de l'hémoglobine (cette molécule ne montre aucune activité antibactérienne si elle est entière ; Fogaça et al., 1999) via un clivage enzymatique au niveau des résidus phénylalanine produit un peptide dont l'activité est antimicrobienne. La défensine a été observée chez les tiques à jeun déjà, la synthèse quant à elle augmentant grandement chez les tiques gorgées (Nakajima et al., 2001). A noter encore que les gènes codant pour toutes ces substances

antibactériennes n'ont pas été décrits, mis à part la défensine dont les séquences nucléotidique et protéique ont été démontrées (Nakajima et al., 2001).

Enzymes protéolytiques

De manière générale, le rôle des enzymes protéolytiques des endoparasites (helminthes et protozoaires) a été étudié intensivement, mais par contre, les études sur les protéases des ectoparasites, particulièrement les tiques, sont limitées (Coombs et Mottram, 1997). Les protéases sont de 4 types : cystéine - , sérine - , aspartique - et métallo- protéases (Coombs et Mottram, 1997 ; McKerrow, 1989 ; Sajid et McKerrow, 2002). Cette nomenclature est basée sur le résidu actif où a lieu l'hydrolyse durant le mécanisme catalytique (Coombs et Mottram, 1997 ; McKerrow, 1989 ; Sajid et McKerrow, 2002). Les cystéines protéases sont les plus étudiées et les plus intéressantes, car elles sont très importantes par exemple pour le cycle vital et la pathogénicité de nombreux parasites (Sajid et Mckerrow, 2002). Les travaux concernant les sérine - et aspartique protéases sont moins nombreux (Coombs et Mottram, 1997 ; Sajid et McKerrow, 2002); les études traitant des métallo-protéases des parasites quant à elles sont en nombre très réduit. Les cathepsines, protéases les plus connues, sont de plusieurs types. Les cathepsines B, C, H, L et S appartiennent à la classe des cystéine protéases, et plus spécialement à la famille des papaines (Sajid et McKerrow, 2002) ; les cathepsines D appartiennent à la classe des aspartique protéases. Toutes ces cathepsines sont limitées aux lysosomes du compartiment intracellulaire ou sont sécrétées si un peptide signal est présent au début de la séquence codante (Sajid et Mckerrow, 2002). Chez de nombreux parasites, les cystéines protéases ont un grand nombre de fonctions qui sont extra-lysosomales, comme par exemple invasion de tissus ou implication dans la mue notamment (Sajid et Mckerrow, 2002).

Les cystéines protéases sont très sensibles à certaines **protéines inhibitrices** qui se nomment **cystatines** et bloquent leurs action (Sajid et Mckerrow, 2002). Basé sur leur complexité, les cystatines, protéines très stables, ont été divisées en trois catégories (Turk et Bode, 1991) : les stefines (type I) représentent la plus simple forme principalement localisées dans les tissus, les kininogènes (type III) représentent la forme la plus complexe des cystatines présentes dans le plasma sanguin exclusivement. Les cystatines au sens stricte (type II) enfin représentent un groupe intermédiaire et sont localisées dans les tissus et les fluides corporels y compris la salive. Les cystatines de type II et III contiennent des ponts disulfures, et sont considérées comme les formes les plus avancées de la famille des cystatines (Al-Hashimi et al., 1988). A noter encore que les kininogènes sont des molécules beaucoup plus grandes que les stefines ou les cystatines, ces deux dernières étant de poids moléculaires assez proches (Turk et Bode, 1991).

Les enzymes protéolytiques des tiques sont localisées dans l'intestin et quelques auteurs ont réalisé des études biochimiques sur ces enzymes il y a plusieurs dizaines d'années déjà (Akov and al., 1976 ; Akov, 1982 ; Bogin et Hadani, 1973 ; Tatchell et al., 1972). Se basant sur ces travaux, Akov (1982) écrit que l'enzyme protéolytique majeure dans l'intestin des tiques est similaire à la cathepsine D des mammifères, une aspartique protéase localisée principalement dans les lysosomes. Dans les études plus récentes, Vundla et al. (1992) ont décrit deux aspartique protéases similaires à la cathepsine D provenant de l'intestin de *R. appendiculatus* et Mendiola et al. (1996) ont purifié une aspartique protéase ainsi qu'une cystéine protéase similaire à une cathepsine L à partir d'intestins de *B. microplus*. Récemment, Mulenga et al. (1999a) ont décrit cinq enzymes protéolytiques appartenant aux familles des cystéines protéases et des serines protéases. Gough et Kemp (1995) ont démontré la présence d'une phosphatase acide dans les lysosomes de l'intestin de la tique *B. microplus*. Cette enzyme serait aussi impliquée dans la digestion du repas sanguin. Ribeiro (1988) a décrit une hémolysine, produite par l'intestin au début du repas sanguin qui serait responsable de la lyse de la membrane des globules rouges chez *Ixodes dammini*.

Tous les articles cités plus haut ont décrit les activités biochimiques de ces enzymes protéolytiques intestinales, sans une analyse génétique. Avec le développement des nouvelles techniques d'isolement de gènes, plusieurs auteurs se sont penchés à nouveau sur les enzymes protéolytiques des tiques en essayant de déterminer également leurs séquences nucléotidique et protéique. Ainsi,

des gènes codant pour des cathepsines L chez *B. microplus* (Renard et al., 2000a) et *H. longicornis* (Mulenga et al., 1999b) ont été décrits. Ces cathepsines, présentes dans les cellules sécrétrices intestinales (Renard et al., 2002) sont capables à certains pH d'hydrolyser des substrats synthétiques comme l'hémoglobine, la vitelline et la gélatine (Renard et al., 2000). De même, deux gènes codant pour des sérine protéases dans l'intestin d'*Haemaphysalis longicornis* (Mulenga et al., 2001) ont été trouvés. Ces dernières enzymes seraient similaires aux précurseurs de la trypsine et de la chymotrypsine des mammifères, enzymes responsables de la fragmentation des protéines en peptides. La séquence d'une dernière enzyme différente des enzymes protéolytiques a été décrite : il s'agit d'une nucléotidase, présente dans plusieurs tissus de la tique *B. microplus*, dont les tubes de Malpighi (Liyou et al., 1999 ; 2000). Cette enzyme serait impliquée dans la récupération des purines par la déphosphorylation des nucléotides provenant des acides nucléiques contenus dans le sang ingéré (Liyou et al., 2000).

Beaucoup de ces enzymes protéolytiques ont été observées chez les tiques à jeun déjà, leur concentration augmentant simplement chez les tiques gorgées. Il s'agit, entre autres, des enzymes protéolytiques décrit par Mulenga et al. (1999a) et Akov (1976) ainsi que de la cathepsine L décrite par Renard et al. (2000). Toutes ces études traitant des enzymes intestinales ont été réalisées chez la famille des Ixodidés principalement, mais aucun article, à l'exception de celui de Ribeiro (1988) ne traite du genre *Ixodes*.

I.4.2. Méthodes utilisées pour l'isolement des substances impliquées dans la physiologie des tiques

Il est intéressant et utile de préciser que la majorité des séquences nucléotidiques des substances citées plus haut ont été découvertes à partir de molécules déjà connues chez d'autres organismes. En effet, la majorité des auteurs a pris des amorces homologues à des fragments de gènes hautement conservés pour examiner simplement une banque d'ADNc de tique (provenant de l'ARN de la tique entière ou des glandes salivaires uniquement, l'intestin seul n'ayant presque jamais été étudié) afin de dépister des gènes homologues. L'autre manière utilisée par divers chercheurs pour trouver de nouvelles enzymes de tique était de screener une banque d'ADNc d'expression avec un sérum de lapin préalablement immunisé avec un extrait de glandes salivaires ou de la tique entière.

Seules trois études moléculaires décrivent l'isolement de gènes exprimés au cours du repas sanguin de manière soustractive, en ne partant pas avec des séquences homologues : Weiss et al. (2002) ont hybridé l'ARNm de gonades d'*Amblyomma americanum* à jeun avec l'ARNm des gonades de cette espèce gorgée, pour ne récolter que le matériel propres aux tiques gorgées. Bior et al. (2002) avec *A. americanum* et *D. andersoni* ainsi que Leboulle et al. (2002a) avec *I. ricinus* ont hybridé l'ARNm des glandes salivaires de ces espèces à jeun avec l'ARNm des glandes salivaires de ces espèces gorgées pour ne récolter que les gènes spécifiques aux tiques gorgées. Si Leboulle et al. (2002a et b) ont décrit en détail une protéine spécifique des glandes salivaires comme déjà mentionné plus haut, Bior et al. (2002) ainsi que Weiss et al. (2002) ont observé les gènes différentiellement exprimés sur gel d'agarose, et séquencé quelques-un pour les comparer aux banques de données sans aller plus loin dans leur caractérisation.

I.5. La membrane péritrophique chez les tiques

La membrane péritrophique est une structure qui entoure l'intestin dans la lumière dont la composition est essentiellement un réseau de chitine auquel sont fixés les principaux constituants qui sont les protéines, les glycoprotéines et les mucopolysaccharides (Peters, 1992).

De nombreuses protéines (appelées peritrophines) parmi les substances qui la composent ont été décrites chez un grand nombre d'insectes (Tellam et al., 1999). Ce n'est que depuis six ans que le premier gène codant pour une péritrophine a été décrit (Elvin et al., 1996). Néanmoins, les fonctions précises de ces protéines sont encore très peu connues (Tellam et al., 1999).

Cette membrane, connue chez presque tous les phylas d'arthropodes ainsi que chez quelques vertébrés (Amphibiens notamment ; Peters, 1992), a beaucoup été étudiée chez les insectes hématophages (Shao et al., 2001) et chez les mouches causant des myases cutanées (Elvin et al., 1994 ; Schorderet et al., 1998 ; notamment). Celle-ci a été observée également chez les acariens, comme par exemple chez *Dermatophagoides farinae* (Wharton et Brody, 1972).

Chez les tiques, peu d'auteurs décrivent cette membrane. Celle-ci a été démontrée pour la première fois par Samson (1909). Cet auteur a observé qu'une « intima » apparaissait 6 jours après le début du repas sanguin à la surface apicale des cellules intestinales d'*I. ricinus*. Rudzinska et al. (1982) et Zung et al. (1989) l'ont observé plus tard chez *I. dammini* ; ces auteurs ont décrit cette membrane très superficiellement d'après des photos prises au microscope électronique. Grandjean (1984) a observé une structure similaire à la membrane péritrophique d'insecte chez *O. moubata*, sans toutefois l'étudier plus précisément. Si Girardin (1987) l'a observé chez *I. ricinus*, Zhu et al. (1991) ont décrit cette membrane péritrophique plus récemment en détail chez cette même espèce de tique. Cette membrane a été observée dans les larves, nymphes et adultes gorgées (Rudzinska et al., 1982 ; Zhu et al., 1991) mais était absente chez les trois stades à jeun ainsi que chez les mâles gorgés (Rudzinska et al., 1982 ; Zhu et al., 1991). Rudzinska et al. (1982) ont montré que le protozoaire parasite *Babesia microti* pouvait traverser cette membrane grâce à une structure spécialisée en pointe qui se développe pendant le séjour du parasite dans l'intestin de la tique. Chez le genre *Ixodes*, cette membrane consiste en une structure tubulaire et diverticulée produite par les cellules intestinales après stimulation du repas sanguin (Rudzinska et al., 1982 ; Zhu et al., 1991). Cette membrane divise la lumière de l'intestin en deux compartiments, un espace endopéritrophique (= la lumière au sens propre) et un espace ectopéritrophique localisé entre la membrane péritrophique et les cellules épithéliales de l'intestin (Rudzinska et al., 1982 ; Zhu et al., 1991). A noter encore qu'une membrane péritrophique a également été observée chez les espèces *Ixodes trianguliceps*, *persulcatus*, *hexagonus* et *uriae* (Gern et al., 1995). Le début de la sécrétion de matériel nécessaire à l'élaboration de cette membrane commence chez *Ixodes* quelques heures (18 heures pour *I. ricinus*, 9 heures plus tard pour *I. dammini*) après l'attachement à l'hôte, quel que soit le stade (Rudzinska et al., 1982 ; Zhu et al., 1991). La membrane devient de plus en plus grosse et elle demeure intacte chez les femelles en oviposition, même 20 jours après le début de la ponte (Vlimant, communication personnelle). A ce moment-là néanmoins, elle se trouve à une certaine distance de la surface de l'intestin. Des cellules de l'épithélium intestinal sécrètent les constituants de la membrane péritrophique (Richards et Richards, 1977). Cette observation laisse penser que des processus digestifs doivent avoir lieu extracellulairement impliquant des protéines et des enzymes (Diehl, communication personnelle), comme il a été mentionné au chapitre I.3.3.

Les fonctions de cette membrane ne sont pas bien connues, si ce n'est qu'elle protégerait l'épithélium intestinal, surtout chez les espèces d'insectes hématophages, dont les produits de digestion du sang, particulièrement les cristaux d'hème, peuvent endommager l'intestin par abrasion (Berner et al., 1983 ; Richards et Richards, 1977). Cette membrane serait également une barrière contre les attaques chimiques d'agents potentiellement toxiques, comme les radicaux oxygènes libres (Pascoa et al., 2002 ; Peters, 1992) provenant du sang ingéré et de la dégradation de celui-ci. Cette membrane serait, chez les moustiques du moins, le lieu de la détoxification de l'hème (Pascoa et al., 2002). D'autre part, cette membrane doit servir comme barrière contre des

pathogènes, pour protéger l'intestin (Shao et al., 2001). Les pathogènes transmis par les arthropodes hématophages doivent donc posséder des structures spécialisées pour passer outre cette membrane, pour finir leur cycle (Eisemann et Binnington, 1994), comme par exemple la structure en pointe décrite chez *B. microti* (Rudzinska et al., 1982). Certains endoparasites des tiques, comme les bactéries, pourraient sécréter aussi des protéases qui seraient capables de dégrader la membrane péritrophique. Zung et al. (1989) ont observé sur des coupes d'intestins que *B. burgdorferi* pouvait traverser la membrane péritrophique d'*I. dammini*. Coleman et al. (1997) ont démontré que *Borrelia burgdorferi* peut utiliser le plasminogène contenu dans le sang ingéré par la tique pour traverser l'intestin d'*Ixodes scapularis* et dégrader la fibronectine. D'autres protéases capables de dégrader des tissus ont été isolées chez le nématode parasite *Haemonchus contortus* (Rhoads et Fetterer, 1996), l'amibe parasite *Entamoeba histolytica* (Keene et al., 1986 ; Luaces et Barrett, 1988) ou encore chez le trématode *Fasciola hepatica* (Halton, 1997) notamment. Ces trois espèces ne sont pas parasites des tiques, mais on peut imaginer que d'autres endoparasites, présents chez les tiques cette fois, pourraient contenir des enzymes similaires, qui dégraderaient la membrane péritrophique et l'épithélium intestinal pour permettre l'invasion des tissus des vecteurs.

I.6. Buts du travail

L'objectif principal de ce travail a été d'isoler des gènes exprimés dans l'intestin d' *I. ricinus* pendant le repas sanguin, après 5 jours de gorgement plus précisément. Nous avons voulu éliminer tous les gènes communs aux tiques partiellement gorgées et à jeun par une technique d'hybridation soustractive pour ne récupérer que les gènes exprimés chez les tiques partiellement gorgées pendant 5 jours.

Nous avons voulu étudier ces gènes spécifiques d'un point de vue fonctionnel, en produisant des protéines recombinantes. Celles-ci, via la fabrication d'anticorps, nous permettent d'identifier la localisation exacte de ces protéines dans l'intestin de la tique, et de suivre la cinétique de leur production au cours du repas sanguin.

II. Matériel et méthodes

II.1. Tiques

Toutes les tiques utilisées proviennent de l'élevage d'*I. ricinus* du laboratoire de parasitologie (Graf, 1978a).

Les tiques femelles à jeun et au stade 5 jours de gorgement ont été employées. Celles-ci étaient âgées environ de 2 à 5 mois. Les tiques femelles ont été nourries sur des oreilles de lapins (Néo-Zélandais, provenant de l'élevage des Dombes, France), et retirées après 5 jours à l'aide de brucelles en prenant soin d'abîmer le moins possible chaque tique. Les femelles à jeun ont été utilisées directement.

Des nymphes provenant d'un lot infecté par *Borrelia burgdorferi* sensu stricto ont été également utilisées pour la microscopie électronique (Ch.II.14). Celles-ci (âgées également entre 2 et 5 mois) ont été partiellement nourries pendant 2 à 3 jours sur des souris Balb/C provenant de l'élevage du laboratoire de parasitologie, avant d'être utilisées.

Une tique femelle à jeun contenant des spirochètes ayant été récoltée dans la nature a également été utilisée pour la microscopie électronique.

II.1.1. Dissection des tiques femelles

Tous les ustensiles nécessaires aux dissections et à l'isolement de l'ARN (brucelles, aiguilles, pipettes, lames de scalpel) ont été incubés une nuit à 220°C pour inactiver les ARNases. Après prélèvement, les tiques nourries ont été disséquées le plus vite possible : les derniers individus disséqués sont restés maximum 4 heures à température ambiante.

Ainsi, 450 tiques à jeun et 2 lots de 70 tiques nourries 5 jours ont été utilisées. Dans tous les cas, le déroulement de la dissection a été le même :

Les tiques ont été fixées sur un bloc de paraffine (préalablement rincé avec une solution 0.1 M NaOH/1mM EDTA) à l'aide d'une aiguille planté dans le scutum. Ensuite, la cuticule a été découpée et la moitié supérieure enlevée. A ce moment-là, la tique a été immergée dans une goutte de tampon physiologique (150mM NaCl) contenant 0.2% Diethyl Pyrocarbonate (DEPC), puis l'intestin a été prélevé et tout de suite transféré dans un tube Falcon rempli avec du N₂ liquide et placé dans un bac contenant ce même N₂ liquide pour une conservation pendant une longue période.

II.2. Isolement de l'ARN total

Pour les tiques à jeun, l'ARNm a été isolé directement à partir d'intestins ; avec les tiques partiellement gorgées pendant 5 jours, l'ARN total a d'abord été isolé avant de procéder à l'isolement de l'ARNm. Dans les deux cas, les intestins disséqués ont été transférés dans un mortier refroidi à l'aide de N₂ liquide. Ils ont été broyés à l'aide d'un pilon pour obtenir une fine poudre. Les intestins ont été à chaque instant recouverts de N₂ liquide pour éviter une altération due aux enzymes.

Ensuite, pour l'isolement de l'ARN total, cette poudre d'intestins a été transvasée dans un tube contenant 15 ml de solution de TRIzol (GIBCO, LIFE TECHNOLOGIES). Les étapes suivantes ont été réalisées selon le protocole GIBCO modifié. La solution a été incubée 5 min à T°C ambiante, puis passée quelques fois à travers une aiguille de seringue (18G) pour bien casser les cellules et diminuer la viscosité. Ensuite, la solution a été centrifugée quelques minutes à 10 000 g pour séparer les débris insolubles. Le surnageant a été récupéré et transféré dans un tube propre. Trois millilitres de chloroforme ont été ajoutés et le tube a été secoué vigoureusement pendant 20 sec avant d'être incubé 3 minutes à T°C ambiante. La solution a été centrifugée à 12 000 rpm

pendant 15 min. à 4°C. La phase aqueuse supérieure contenant l'ARN a été récupérée, précipitée en ajoutant 8 ml d'isopropanol et incubée à -20°C pendant 20 min. Le culot a été enfin lavé avec 15 ml d'éthanol 75%, et resuspendu dans 200 µl d'H₂O RNase free (_ contenant 0.2% DEPC) après l'incubation du tube à 55°C pendant 10 min. Aux 200 µl d'ARN ont été ajoutés 10 µl d'enzyme DNase (PROMEGA) et 23 µl de tampon de digestion (PROMEGA). Cette solution a été incubée 50 min à température ambiante. L'ARN a été purifié par l'adjonction de 250 µl de Phénol/Chloroforme (GIBCO) à la solution contenant l'ARN-Dnase, puis, après avoir été secouée vigoureusement, cette solution a été centrifugée 2 min à 12 000 rpm. Le surnageant a été récupéré, et un volume égal de chloroforme a été ajouté. Après une nouvelle centrifugation, le surnageant a été transféré dans un nouveau tube, puis précipité avec 2x le volume d'éthanol 100 % et 0.15 % du volume d'acétate de sodium (2 M). Après incubation à -20°C pendant 1h suivi d'une centrifugation à 12 000 rpm à 4°C pendant 30 min, le culot d'ARN ainsi obtenu a été lavé avec de l'éthanol 75 %, redissout dans 50 µl de tampon Tris-HCl 10Mm pH 7.5. L'ARN pur a pu ensuite être stocké à -80°C.

II.3. Isolement de l'ARNm

Le kit FastTrack 2.0 version E (Invitrogen, San Diego) a été utilisé et les procédures ont été réalisées selon le protocole livré par le distributeur. Brièvement, la poudre d'intestins contenant l'ARN a été transférée dans du tampon de lyse (200mM NaCl, 200mM Tris pH 7.5, 1.5 mM MgCl₂, 2% SDS) contenant une solution de protéases. Après une incubation de 1h à 45°C, du NaCl a été ajouté pour atteindre une concentration finale de 0.5 M. La solution ainsi obtenue a été passée 3-4 fois à travers une aiguille 18G pour diminuer la viscosité. Pour l'isolement d'ARNm à partir cette fois-ci d'ARN total et non pas d'intestins, 200 µl d'ARN totaux ont été ajoutés au tampon de lyse contenant la solution de protéases. Ensuite, dans les deux cas (intestins ou ARN total), la cellulose oligo (dT) du kit a été ajoutée à la solution pour que la queue Poly A de l'ARNm puisse s'y fixer. Le tube a alors été agité gentiment pendant 1 heure. Après centrifugation et élimination du surnageant, la cellulose (contenant l'ARNm) a été lavée plusieurs fois avec du tampon de lavage (500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, dans de l'H₂O DEPC), avant d'être passée à travers une colonne. La cellulose ainsi piégée va être lavée 3 fois avec du tampon de lavage, et ensuite le tampon d'éluion (10 mM Tris-HCl pH 7.5, DEPC) préalablement chauffé à 65°C a été ajouté. L'ARNm a été ainsi décroché de la cellulose et a pu être récupéré dans un tube propre. L'ARNm a été alors précipité en présence d'acétate de sodium 2 M et d'éthanol 100% pendant 30 min à -80°C. Après centrifugation à haute vitesse (14 000 rpm), le culot d'ARNm obtenu a été resuspendu dans 50 µl de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7.5 (DEPC) et stocké ainsi à -80°C.

Les ARN totaux et messagers ont été chargés sur gel d'électrophorèse à 1.2% d'agarose en présence de Radiant Red (BIORAD) (100µl / 50 ml tampon TBE 1 X). Le tampon TBE 10 X contient : 154.5 g de Tris, 26.2 g d'acide borique, 9 g d'EDTA dans un total d'un litre. Après migration à 90 volts, les ARN ont été visualisés aux rayons UV (Gel Doc 1000 BIORAD).

II.4. RT (Reverse Transcriptase)-PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'ARNm a été rétro-transcrit en ADNc en utilisant le kit SMART PCR cDNA synthesis kit (CLONTECH, USA). Ce kit permet d'obtenir la séquence nucléotidique complète (full length) des ADNc en position 5', ce qui n'est pas toujours le cas, car la reverse transcriptase n'arrive pas toujours à transcrire la totalité de la séquence à l'extrémité 5'. Ce kit le permet, grâce à une amorce oligonucléotide spéciale (appelée SMART II) qui va se fixer sur l'extrémité 5' de l'ADN simple brin après l'action de la RT. Ensuite, grâce à une amorce complémentaire de l'oligonucléotide SMART II, l'ADN double brin a été obtenu par PCR.

Toutes les étapes de synthèse du premier brin d'ADNc ont été réalisées en respectant scrupuleusement les indications du kit. Brièvement, 0.1-0.4µg d'ARNm d'intestins ont été rétro-transcrits en ADN simple brin pendant 1 heure à 42°C en utilisant la Superscript II Rnase H⁻ reverse transcriptase (GIBCO, Life Technologies) et les amorces CDS 3' et SMART II (CLONTECH). Les concentrations en ARNm ont été déterminées grâce un spectrophotomètre Ultraspec 4000 (PHARMACIA) et une cuve en quartz à des longueurs d'ondes de 260 et 280 nm.

Pour la synthèse du second brin d'ADN et l'amplification par PCR, l'enzyme Expand High Fidelity *Taq* polymérase(ROCHE) a été utilisée. Deux mélanges ont été réalisés, suivant le protocole fourni par le distributeur de l'enzyme :

Mélange 1 : 8 µl dNTP 2.5 mM, 6 µl amorce PCR (kit CLONTECH) 10 mM, 11 µl H₂O

Mélange 2 : 5 µl tampon 10 X Expand (ROCHE), 2 µl cDNA simple brin, 0.5 µl *taq* polymérase (ROCHE), 17.5 µl H₂O

Les 2 tubes contenant les mélanges ont été chauffés dans un appareil PCR MWG-BIOTECH primus jusqu'à 95°C, puis le mix 2 a été ajouté au mix 1, et l'amplification a commencé suivant le programme suivant : 1 min de dénaturation à 95°C, suivi de 25 cycles d'amplification [dénaturation 25 sec à 95°C, hybridation et élongation 5 min à 68°C], et terminé par 10 min d'élongation à 72°C. Le produit de la réaction a été chargé sur gel d'électrophorèse à 1% d'agarose en présence de bromure d'éthidium (3µl/50 ml TBE 1 X). Après migration à 120 volts, l'ADNc a été visualisé aux rayons UV (Gel Doc 1000 BIO-RAD) à 260 nm.

II.5. Clonage des produits issus de la RT-PCR (pour la constitution d'une banque d'ADNc)

Isolement, ligation et clonage des produits PCR :

Les 2 populations d'ADNc obtenues (tiques à jeun et gorgées) sur gels d'agarose ont été séparés en 4 sous-populations chacune à l'aide d'un scalpel. Ces 2 x 4 fragments ont été purifiés grâce au kit Nucleotrap (MACHEREY-NAGEL). Toutes les étapes de purification ont été réalisées en suivant exactement le protocole du kit. A la fin, l'ADNc a été élué 2 fois dans 50 µl de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7.5. Le volume a été ensuite ramené à 20 µl grâce à l'utilisation d'un Speedvac SVC-100H (SAVANT, NY). Les 8 sous-populations (environ 20 ng chacune) ont ensuite été liguées dans le plasmide pCR 4 TOPO (INVITROGEN) et transformées dans les cellules compétentes One Shot TOP10 (INVITROGEN) en suivant le protocole fourni par le distributeur du kit TOPO TA Cloning kit for Sequencing (version C) (INVITROGEN). La moitié (150 µl) de ces cellules a été étalée sur des boîtes de Petri contenant le milieu de culture LB (Luria-Bertani)-agar (10 g Bacto-trypton, 5 g Yeast extract, 10 g NaCl 20 g agar / 1lt H₂O) avec 50 µg/ml d'ampicilline. Ces boîtes ont été incubées à 37°C pendant une nuit. Certaines colonies ont été prélevées au hasard à l'aide

d'un cure-dent stérile, puis transférées dans 3 ml de milieu de culture LB. Ces cultures ont été incubées à 37°C sous agitation pendant une nuit dans le but de faire des « minipreps ». L'autre moitié (150 µl) des 8 cultures a été transvasée dans des tubes stériles auxquels du glycérol a été ajouté pour obtenir une concentration finale de 20 %. Après mélange par inversion, les 8 tubes contenant les 8 sous-populations d'ADNc ont été stockés à -80°C en tant que banques d'ADNc.

Isolement et purification des plasmides par « minipreps » :

Des « minipreps » ont été réalisées avec les 1.5 ml de culture (les autres 1.5 ml ont été stockés quelques jours à 4°C) d'après le protocole modifié de Maniatis et al. (1989), dans le but d'isoler l'ADN plasmidique pour vérifier plus tard la réussite de la ligation. Les tubes Eppendorf contenant 1.5 ml de culture bactérienne ont été centrifugés à 12 000 rpm pendant 30 sec, puis les surnageants ont été éliminés et les culots de bactéries resuspendus dans 100 µl de solution I froide (Tris-HCl 25 mM pH 8, Glucose 50 mM, EDTA 10 mM pH 8). Après une incubation de 3 min à T°C ambiante, 200 µl de solution II (NaOH 0.2 N, 1 % de SDS 20 %), préparée fraîchement, ont été ajoutés. Les tubes ont été agités jusqu'à l'obtention d'homogénats transparents, ensuite incubés 5 min dans la glace. Cent cinquante microlitres de solution III froide (acétate de potassium 5 M, acide acétique glacial 11.5 %) ont été alors ajoutés. Les tubes ont été bien agités, puis incubés pendant 5 min dans la glace. Une centrifugation à 12 000 rpm pendant 5 min à T°C ambiante a été effectuée, puis les surnageants ont été récupérés et transférés dans des tubes Eppendorf stériles. Quatre cents microlitres de chloroforme ont été ajoutés et les tubes ont été bien agités. Après une centrifugation à 12 000 rpm (4 min) à T°C ambiante, les phases aqueuses supérieures ont été transférées dans de nouveaux tubes. L'ADN plasmidique a été précipité en ajoutant 900 µl d'éthanol absolu et incubé 15 min à -20°C. Les culots d'ADN ont été récupérés après une centrifugation de 15 min à 12 000 rpm. Ceux-ci ont été lavés avec 500 µl d'éthanol 70 %. Après une dernière centrifugation, les surnageants ont été éliminés et les culots ont été séchés à l'air (15 min). A la fin, les culots ont été resuspendus dans 50 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, EDTA 1mM pH 8) contenant de l'ARNase (STRATAGENE) bouillie (20 µg/ml).

Vérification de la présence d'inserts :

Après l'extraction de l'ADN plasmidique, 3 µl de cet ADN ont été digérés par une enzyme de restriction. La réaction a été effectuée en utilisant 3 µl d'ADN, 2 µl de tampon de digestion, 0.2 µl EcoR I (PROMEGA) et 14.8 µl H₂O pour un volume total de 20 µl. Cette solution a été incubée à 37°C pendant 1 heure. Le produit de la digestion a été chargé sur gel d'électrophorèse à 1 % d'agarose coloré au bromure d'éthidium (3 µl/ 50 ml TBE 1 X). Après migration à 120 volts (45 min), l'ADN avec les inserts ont été visualisés aux rayons UV (Gel Doc 1000 BIO-RAD).

Quelques plasmides contenant des inserts provenant des 4 sous-populations d'ADNc de tiques gorgées uniquement ont été séquencés (voir Chapitre II.10). La recherche d'homologie avec ces quelques inserts a été réalisée en utilisant le programme BLAST (BLASTN pour les séquences nucléotidiques (The National Center for Biotechnology Information)) parmi les séquences publiées dans GenBank, EMBL.

II.6. RDA (Representational Difference Analysis)

La RDA est une technique combinant hybridation soustractive et PCR pour amplifier des différences entre 2 populations d'ARNm proches mais néanmoins dissemblables. Cette technique élimine les ARNm présents dans les 2 populations, en ne laissant que les différences. Si un fragment amplifiable existe dans une population (la cible ou « tester » = tiques gorgées) et est absent de l'autre (le témoin ou « driver » = tiques à jeun), un enrichissement de ce fragment peut être réalisé par hybridation de la cible en présence d'un excès de témoin. Les séquences

homologues au témoin sont rendues inamplifiables par l'absence d'adaptateurs sur l'ADNc. Toutes les étapes ont été réalisées suivant les protocoles décrits par Hubank et Schatz (1994 ; 1999). Le résumé schématique de cette méthode se trouve sur la figure 2. Brièvement, les ADNc des tiques gorgées (cible) et des tiques à jeun (témoin) ont été digérés par l'enzyme de restriction DpnII (NEB), puis ligés à des adaptateurs R et ensuite amplifiés par PCR pour générer des amplicons. Les adaptateurs ont été ensuite enlevés par digestion avec DpnII suivie par une purification sur colonne Microcon 100 (AMICON) en respectant le protocole décrit par le distributeur. Pour générer la cible, des adaptateurs J ont été ligés à la cible uniquement, puis l'excès a été enlevé par colonne Microcon 100. Après hybridation soustractive, le produit d'hybridation a été ré-amplifié pour générer le DP1, le premier produit différentiel ou soustractif (« Differential Product 1 »). Après avoir changé les adaptateurs J au profit des N sur le DP1, un nouveau tour d'hybridation soustractive a été réalisé pour générer le DP2, le deuxième produit différentiel. En tout, 3 soustractions ont été réalisées pour obtenir le DP3 à la fin. Dans le premier tour d'hybridation soustractive, un ratio cible : témoin de 1 : 100 a été utilisé, dans le second tour 1 : 800 et dans le troisième 1 : 20 000. Pour les réactions de PCR, la taq polymérase (QIAGEN) a été employée. Pour les réactions de ligations, la T4 DNA ligase (NEB) a été utilisée, et pour la digestion des ADNc simples brins, la Mung Bean nucléase (NEB). Les amorces R, J et N proviennent tous de MWG-BIOTECH et leurs séquences sont exactement celles décrites par Hubank et Schatz (1994). Les concentrations de départ des 2 populations d'ADNc provenant des tiques à jeun et gorgées (2 µg) ainsi que toutes les mesures de concentration en cours de protocole ont été déterminées grâce à un spectrophotomètre Ultraspect 4000 (PHARMACIA) et une cuve en quartz.

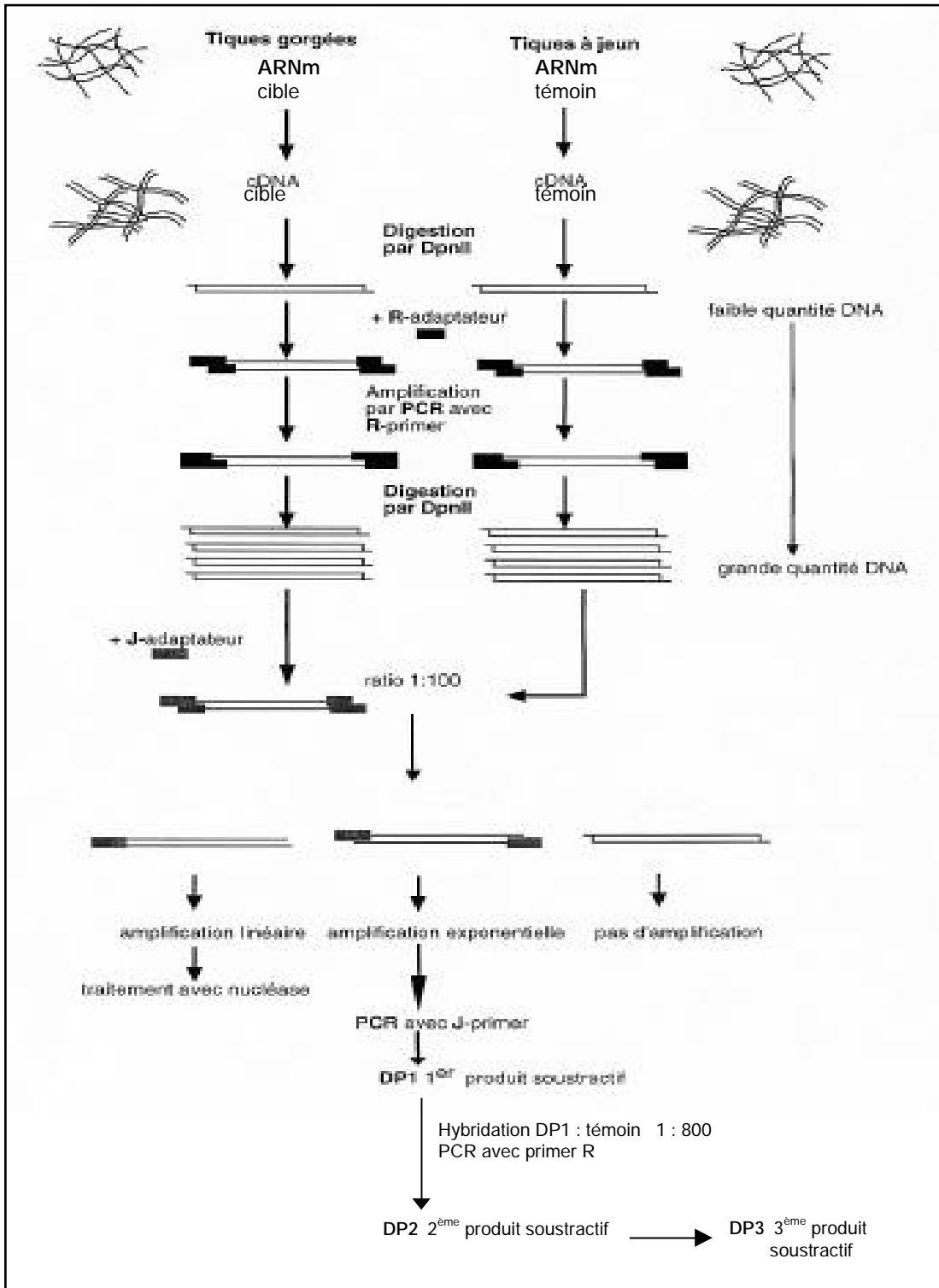


Figure 2 : représentation schématique de la RDA

Les produits DP2 et DP3 ont été chargés sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium (3 µl/50 ml TBE 1 X). Après migration, l'ADN a été visualisé, les bandes extraites et l'ADN purifié grâce au kit Nucléotrap (MACHERY-NAGEL). A la fin, l'ADN a été élué 2 fois dans 50 µl de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7.5. Le volume a été ensuite ramené à 20 µl grâce à l'utilisation d'un Speedvac

SVC-100H (SAVANT, NY). Ensuite, les produits DP2 et DP3 ont été ligués dans le plasmide pCR 4 TOPO (INVITROGEN) et transformés dans les cellules compétentes One Shot TOP10 (INVITROGEN) selon le protocole du kit TOPO TA Cloning kit for Sequencing (version C) (INVITROGEN). Les cellules ont été étalées sur boîte de Petri contenant du milieu LB-agarose avec de l'ampicilline (50 µg/ml) et incubées toute la nuit à 37°C. Plusieurs colonies ont été repiquées avec un cure-dent stérile dans 3 ml de milieu LB liquide contenant de l'ampicilline et incubées une nuit à 37°C. Des minipreps (voir chapitre II.5) ont ensuite été réalisées avec ces colonies et l'ADN plasmidique isolé contenant les inserts DP2 et DP3 a été ensuite séquencé (chapitre II.10). Des amorces spécifiques aux produits DP2 et DP3 ont été préparées ensuite pour vérifier au cours d'une réaction PCR, si les bandes obtenues sur gel d'agarose avec DP2 et DP3 étaient bien spécifiques aux tiques gorgées. Les réactifs suivants ont été assemblés : 1µl ADNc (tiques gorgées et non-gorgées), 5 µl amorce spécifique 5', 5 µl amorce spécifique 3', 3 µl dNTP 10 mM, 5 µl tampon 10 X (QIAGEN) 30 µl H₂O, 0.5 µl taq polymérase (QIAGEN). Le programme appliqué a été le suivant : 1 min à 94°C, puis une boucle [45 sec à 94°C, 45 sec à 58°C, 1 min à 72°C] 30 X, puis une étape finale de 10 min à 72°C. Le produit de cette PCR a été visualisé sur gel d'agarose. A la fin, la recherche d'homologie avec les fragments DP3 a été réalisée en utilisant le programme BLAST (BLASTN pour les séquences nucléotidiques, BLASTX et BLASTP pour les séquences protéiniques (The National Center for Biotechnology Information)) parmi les séquences publiées dans GenBank, EMBL.

II.7. RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Grâce à cette technique, les gènes entiers provenant des produits DP3 peuvent être isolés. Des amorces spécifiques orientées dans la direction des séquences inconnues ont été choisies pour 3 gènes (tableau 2). Les amorces sont différentes suivant la direction de la séquence désirée (extrémité 3' ou 5'). Toutes les étapes ont été réalisées suivant les indications de Frohman (1994). La figure 3 illustre le principe général. Brièvement, pour obtenir l'extrémité 3' des gènes, l'ARNm a été retro-transcrit grâce à une amorce (Q_T) qui consiste en un oligo (dT) suivi par 35 bases correspondant aux séquences de 2 autres amorces (nommées Q_I et Q_O) accolées. La synthèse du double brin et l'amplification ont été ensuite réalisées grâce à l'amorce Q_O qui se lie à chaque ADNc à son extrémité 3'd'une part, et grâce à une amorce dérivée du gène qui nous intéresse (3'GSP1 « Gene Specific Amorce ») d'autre part. Un second round d'amplification a été ensuite réalisé grâce aux amorces Q_I et 3'GSP2 qui se trouvent plus à l'intérieur du gène, pour éviter l'amplification de produits aspécifiques. Pour générer l'extrémité 5' des gènes, l'ARNm a été rétro-transcrit grâce une amorce spécifique du gène qui nous intéresse (5'GSP-RT). Ensuite, une queue poly(A) a été ajoutée en utilisant la terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) (GIBCO) et la base dATP (PEQLAB). Le second brin d'ADNc a été généré grâce à l'amorce Q_T qui va se lier à la queue poly(A) et aux amorces Q_O et 5'GSP1, cette dernière se trouvant plus en avant que l'amorce 5'GSP-RT (figure 2). Finalement, un second tour d'amplification a été réalisé en utilisant les amorces Q_I et 5'GSP2 qui se trouvent plus à l'intérieur du gène pour augmenter la spécificité. Les PCR ont été réalisées en fonction des caractéristiques des amorces et le nombre de cycles a été augmenté par rapport à celui décrit par Frohman (1994) :

RACE 3' et 5' :

- 1^{er} « round » d'amplification : [1 min 94°C 1 min 60°C 3 min 72°C] 45 X 75°C 15min
- 2^{ème} « round » d'amplification : [1 min 94°C 1 min 60°C 3 min 72°C] 30 X 75°C 15min

Les amorces GSP ont été choisies pour qu'elles contiennent toutes à peu près le même nombre de bases G/C (environ 60 %) que les autres amorces (Q_O et Q_I) dont Frohman (1994) donne les séquences. Le nombre de base a aussi été choisi en fonction des amorces Q_O et Q_I (environ 18).

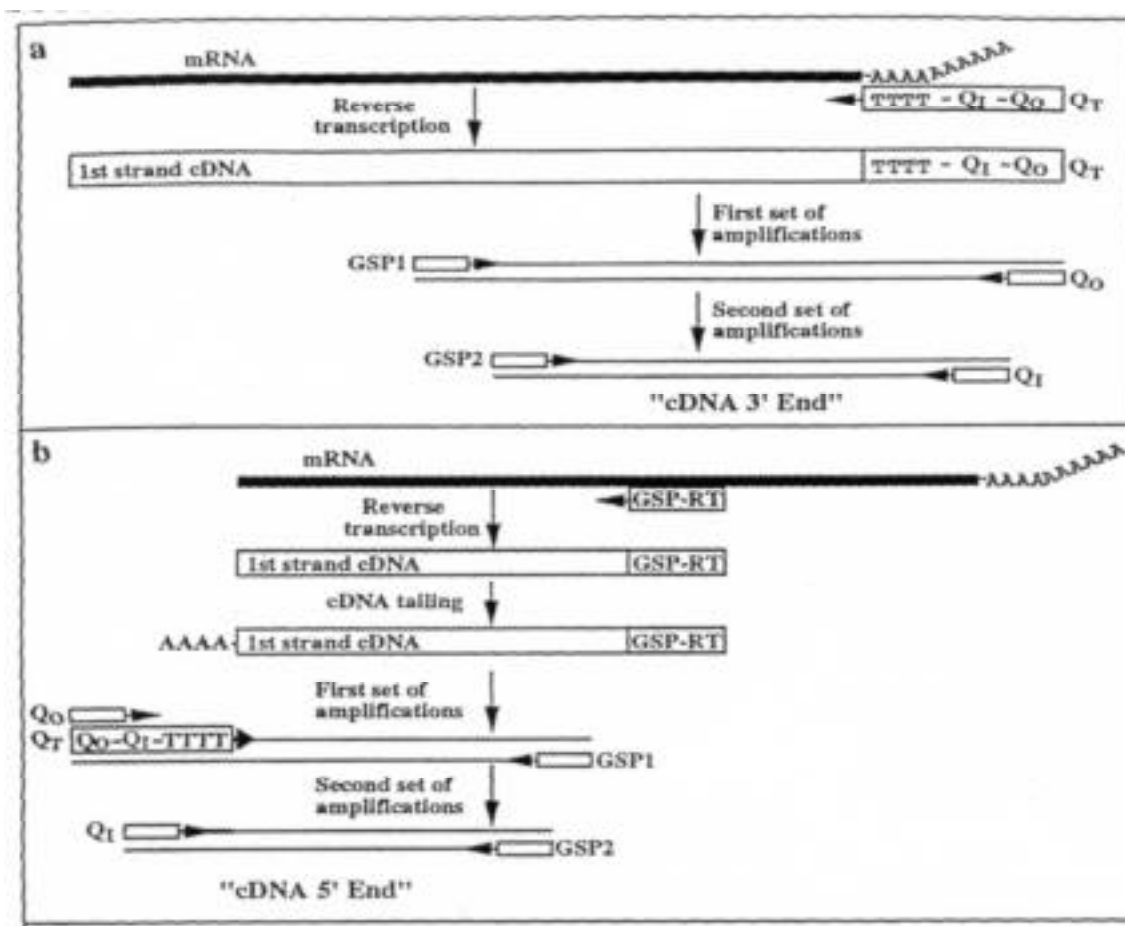


Figure 3 : Représentation schématique de la RACE (d'après Frohman, 1994). a : 3'Race. b : 5'Race

Tableau 2 : Amorces (MWG-BIOTECH) utilisées pour la RACE

Q_T	5'- CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTT - 3'
Q_0	5'- CCAGTGAGCAGAGTGACG - 3'
Q_I	5'- GAGGACTCGAGCTCAAGC - 3'
3' GSP1 _A	5'- CGGGAAGGACTGGTACAG - 3'
3' GSP2 _A	5'- AACACGCTGCCACCCCAA - 3'
5' GSP1 _A	5'- GTGGGCCCACTCCTTGTA - 3'
5' GSP2 _A	5'- TGGTGCCTCCTCCAGATC - 3'
5' GSP-RT _A	5'- TGGTCCTGCCCTCGACTT - 3'
3' GSP1 _B	5'- CCCACCAACGACTTTGCC - 3'
3' GSP2 _B	5'- CAGGAACCCTGGGCCGAA - 3'
5' GSP1 _B	5'- GTAGTGTTCTGCGTCAG - 3'
5' GSP2 _B	5'- GCACTTGCAGGCCACAT - 3'
5' GSP-RT _B	5'- GTGGTAGAGCGCACTCAG - 3'
3' GSP1 _C	5'- TTCGGCTTCCAGATGCCG - 3'
3' GSP2 _C	5'- TGTGCAAAGGCACCGTCG - 3'
5' GSP1 _C	5'- CCTGGTCAGCAACCATAG - 3'
5' GSP2 _C	5'- TCTTGGCATCTGTCCCC - 3'
5' GSP-RT _C	5'- AGTGTCGCCGTGTCGCT - 3'

Les autres amorces proviennent aussi de MWG-BIOTECH. Pour les PCR, la *Taq* DNA polymérase (QIAGEN) a été utilisée. Les réactions de transcriptase inverse ont été réalisées avec la Superscript II RNase H⁻ reverse transcriptase (GIBCO, Life Technologies). Toutes les autres solutions suivent exactement les indications de Frohman (1994).

A la fin, la recherche d'homologie avec les gènes entiers A, B, C a été réalisée en utilisant le programme BLAST (BLASTN pour les séquences nucléotidiques, BLASTX et BLASTP pour les séquences protéiniques (NCBI) parmi les séquences publiées dans GenBank, EMBL).

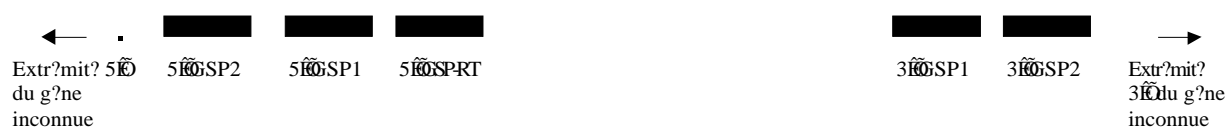


Figure 4 : Localisation des amorces GSP sur le fragment d'ADNc DP3 issu de la RDA

II.8. Isolement de la partie codante des gènes

La partie codante des 3 gènes avec leurs domaines hydrophobes et hydrophiles a été localisée grâce au serveur ExPasy. Des amorces (MWG-BIOTECH) correspondant à ces parties codantes ont ensuite été réalisées pour les séquences A et C. Un site de restriction *Sma* I a été ajouté aux amorces correspondantes au début de la partie codante tandis qu'un site *Eco*R I a été ajouté aux amorces correspondantes à la fin de la partie codante (tableau 3). A noter encore que les segments hydrophobes des parties codantes n'ont pas été pris en compte car ils n'apparaissent pas dans les formules des protéines exportées. De plus, ces parties hydrophobes sont très immunogènes. Les amorces ont donc été choisies pour se lier au début de chaque triplet de base codant pour le premier acide aminé faisant suite au peptide signal.

Tableau 3 : Liste des amorces utilisés pour l'amplification des parties codantes des séquences A et C

Amorces	Séquences nucléotidiques	Positions sur le gène
A start	5' - CCCGGGAATCTGGAGGAGGCACCAC - 3'	428-445 (sens)
A stop	5' - GGATTCCTAGGAGTTGTTGACAGGTTTC - 3'	742-763 (antisens)
C start	5' - CCCGGGACGAAGAAAAGCCGTGTATAAA - 3'	110-130 (sens)
C stop	5' - GAATTCTCATGAGAGAGGGCACAGGGA - 3'	391-413 (antisens)

Les bases (**en gras**) sont les deux sites de restriction *Sma* I et *Eco*R I ajoutés aux amorces. Les bases (soulignées) représentent le codon STOP.

Les parties codantes des séquences A et C ont été amplifiées par PCR sur un appareil MWG-BIOTECH primus, en utilisant les réactifs suivants : 2 µl d'ADNc de tiges gorgées, 3 µl dNTP 10 mM, 5 µl tampon 10 X, 4 µl amorce (sens), 4 µl amorce (antisens), 31 µl H₂O, 0.8 µl *Taq* DNA

polymérase (QIAGEN). Le programme appliqué a été le suivant : 1 min à 94°C [1 min à 94°C 1 min à 59°C 1 min à 72°C] 10 X puis une deuxième boucle [1 min à 94°C 1 min à 65°C 1 min à 72°C] 20 X puis une étape finale d'élongation de 5 min à 72°C.

Les produits de la réaction ont été chargés sur gel d'agarose, visualisés, puis les bandes correspondantes aux fragments codants amplifiés ont été extraites et purifiées grâce au kit Nucleotrap (MACHEREY-NAGEL). A la fin, l'ADN a été élué 2 fois dans 50 µl de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7.5. Le volume a été ensuite ramené à 20 µl grâce à l'utilisation d'un Speedvac SVC-100H (SAVANT, NY).

II.9. Clonage de la partie codante des gènes

Le plasmide PGEM -T-easy (PROMEGA) a été utilisé pour cloner la partie codante amplifiée des gènes. Dans le détail, les parties codantes des séquences A et C ont été liguées au plasmide en utilisant les réactifs suivants : 1 µl d'ADN, 5 µl tampon rapide de ligation (PROMEGA), 1 µl T₄ DNA ligase (PROMEGA), 2 µl H₂O, 1 µl PGEM -T-easy (PROMEGA). Après une incubation d'une heure à T°C ambiante, 2.5 µl de la réaction de ligation ont été ajoutées aux cellules One Shot TOP10 (INVITROGEN). Les étapes de transformations ont été réalisées en suivant exactement le protocole fourni par le distributeur. A la fin, les cellules ont été étalées sur boîtes de Petri contenant du milieu LB-agarose avec de l'ampicilline (50 µg/ml) et incubées toute la nuit à 37°C. Plusieurs colonies ont été repiquées avec un cure-dent stérile dans 3 ml de milieu LB liquide contenant de l'ampicilline et incubées une nuit à 37°C. Des « minipreps » (voir chapitre II.5) ont ensuite été réalisées avec ces colonies. A la fin, les culots d'ADN plasmidique ont été resuspendus dans 30 µl Tris-HCl 10 mM pH 7.5 contenant de l'ARNase bouillie.

II.10. Séquençage

Les fragments insérés dans les vecteurs pCR 4-TOPO (INVITROGEN) et PGEM -T-easy (PROMEGA) ont été séquencés dans les deux sens avec l'utilisation de deux amorces M 13 universel et M 13 reverse (tableau 4), qui se trouvent sur les plasmides des deux côtés des inserts. Ces amorces sont marquées à l'IRD 800 (MWG-BIOTECH Europe). La réaction du séquençage par PCR a été effectuée avec le kit ThermoSequenase Amorce Cycle Sequencing kit (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). Le programme de la PCR utilisé a été le suivant : 2 min à 95°C, [15 sec à 95°C 15 sec à 57°C 30 sec à 70°C] 31 X puis une dernière boucle [15 sec à 95°C 30 sec à 70°C] 10 X. Les produits ont ensuite été chargés sur les gels de séquençage. L'appareil LI-COR DNA Sequencer 4000 (MWG-BIOTECH Europe) a été utilisé pour la migration des échantillons et la lecture des séquences d'ADN. Les différents fragments séquencés ont été comparés par alignement en utilisant les programmes Clustal X1.64 et AssemblyLIGN 1.0.9c.

Tableau 4 : Amorces marquées à l'IRD 800 (extrémité 5') utilisées pour le séquençage

M 13 universel	5' – IRD 800 -GTAAAACGACGGCCAGT
M13 reverse	5' – IRD 800 -AACAGCTATGACCATG

II.11. Expression et purification des protéines de fusion

Clonage dans le plasmide d'expression :

L'expression des parties codantes des gènes A et C a été possible grâce au protocole modifié de Ausubel et al. (1994) et à l'utilisation du plasmide d'expression pGEX 2T (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). Dans le détail, ce plasmide ainsi que le pGEM -T-easy (PROMEGA) contenant les inserts (= parties codantes des gènes A et C) ont tout d'abord été digérés doublement par Sma I- EcoR I. Les réactifs suivants ont été utilisés : 4 µl plasmide pGEX 2T, 4 µl Tampon Multicore 10 X (PROMEGA), 28.5 µl H₂O, 3.5 µl Sma I (PROMEGA). Deux autres tubes ont été préparés avec : 25 µl plasmide pGEM-T contenant les inserts (A et C), 8 µl Tampon Multicore 10 X (PROMEGA), 37 µl H₂O, 10 µl Sma I (PROMEGA). Tous les tubes ont été incubés 5 heures à 25°C, puis 3 µl (tube avec plasmide pGEX 2T) et 8 µl (tubes avec plasmide pGEM-T) d'EcoR I ont été ajoutés et l'incubation a été poursuivie pendant 2 heures supplémentaires à 37°C cette fois-ci.

Les produits de cette double digestion ont été chargés sur gel d'agarose et visualisés. Les inserts ainsi que le plasmide pGEX 2T digéré ont été aspirés du gel grâce à un embout de pipette, puis transvasés dans un tube. Une centrifugation à 5000 rpm (30 sec) a été ensuite nécessaire pour enlever les restes d'agarose.

Les inserts ont été ensuite ligués au plasmide pGEX 2T digéré au niveau des sites de restriction SmaI et EcoR I en utilisant les réactifs suivants : 8 µl d'inserts, 1.5 µl tampon de ligation 10 X (PROMEGA), 3 µl pGEX 2T digéré, 1.5 µl H₂O, 1 µl ligase (PROMEGA). Le plasmide sans insert a aussi été reliqué sur lui-même dans les mêmes conditions. Après une incubation de 27 heures à 14°C, 7.5 µl de la ligation ont été ajoutés dans des bactéries (1 ml) *E.coli* XL 1 Blue BL/21 préalablement décongelées sur glace. Après plusieurs étapes (30 min dans la glace, puis heat shock de 2 min à 42°C dans bain-marie, puis immédiatement transférées 5 min dans la glace), les bactéries en entier ont été étalées sur boîte de petris contenant du milieu LB-agarose avec de l'ampicilline (50 µg/ml) et incubées toute la nuit à 37°C. La présence des inserts a été vérifiée par PCR aux conditions suivantes : un mélange a été préparé contenant les réactifs suivants : 3 µl tampon PCR 10 X (QIAGEN), 3 µl amorce A/C start, 3 µl de amorce A/D stop, 1.5 µl dNTP 10 mM, 0.5 µl Taq DNA polymérase (QIAGEN), 19 µl H₂O. Plusieurs colonies bactériennes ont été grattées avec une pointe de cure-dent stérile, puis celle-ci a été trempée dans le mélange, et les tubes ont été mis dans un appareil MWG-BIOTECH primus avec le programme suivant : 1 min à 94°C, puis une boucle [30 sec à 94°C 30 sec à 56°C 1 min à 72°C] 30 X, puis 10 min d'élongation finale à 72°C. Les produits de cette PCR ont été chargés sur gel d'agarose et visualisés.

Expression des protéines :

L'expression des 2 inserts ainsi que du plasmide sans inserts a été effectuée à partir d'une culture fraîche. Vingt millilitres de milieu LB-ampicilline (50 µg/ml) ont été inoculés avec une colonie transformée, prélevée avec une anse de platine stérile. Cette culture a été incubée à 37°C pendant une nuit sous agitation. Deux cents millilitres de milieu LB/ampicilline ont été inoculés avec les 20 ml de la culture incubée toute la nuit, et incubés à 37°C jusqu'à ce que la DO_{600 nm} atteigne 0.6 (Spectrophotomètre Ultraspec 4000 (PHARMACIA)), ce qui représente environ 1 heure 15. A ce moment-là, 1 mM d'IPTG a été ajouté (conc. finale) pour induire l'expression des protéines. Des aliquots de 1 ml ont été prélevés toutes les heures pendant 4 heures. Ces aliquots ont été centrifugés à 6000 rpm pendant 2 min et resuspendus dans 100 µl de tampon de charge (2.5 ml Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 2.5 ml glycérol 50 %, 4 ml SDS 10 %, 1 ml -mercaptoethanol, 100 µl bleu de bromophénol 1 %, compléter à 10 ml avec de l'H₂O). La vérification de l'expression des protéines de fusion a été effectuée sur un minigel SDS-PAGE de 12 % (8 x 5 cm). Les 200 ml de la culture ont été centrifugés après les 4 heures d'incubation à 6000 rpm pendant 2 min. Le surnageant et le culot ont été récupérés et stockés à -20°C.

Purification des protéines de fusion :

La purification des protéines de fusion a été effectuée d'après Ausubel et al. (1994). Dans un premier temps, le culot de bactéries contenant les protéines induites a été resuspendu dans du tampon PBS 1 X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄.2H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄), puis cette solution a été soniquée grâce à un appareil Vibro Cell (SONICS and MATERIALS INC, USA) à une amplitude de 50 % pendant 2 minutes. Du Triton X-100 10 % a été ajouté pour atteindre une concentration finale de 1 %, et la solution a été agitée quelques secondes. Après une centrifugation à 10 000 rpm pendant 5 min à 4°C, le surnageant a été récupéré, et le culot stocké à -20°C. Pour isoler et purifier les protéines de fusion, le kit Bulk GST purification module (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) contenant la matrice glutathion sepharose 4B a été utilisé. La protéine GST (Glutathion-S-Transférase, couplée à nos protéines A et C) que le plasmide pGEX 2T contient va se fixer à la matrice glutathion sepharose 4B. Après élution, cette protéine de fusion va pouvoir être récupérée. Toutes les étapes ont été réalisées en suivant le protocole du kit. Brièvement, la matrice glutathion sepharose a été ajoutée au surnageant récupéré ci-dessus, et cette solution a été incubée 30 min sous agitation. La matrice a ensuite été lavée 3 fois, puis la protéine de fusion a été éluée et récupérée. Les fractions protéiques ont été analysées sur un gel SDS-PAGE 12 %.

Isolement et purification des corps d'inclusions :

Pour la purification des protéines insolubles, exprimées sous forme de corps d'inclusion, le protocole de Maniatis et al. (1989) modifié a été utilisé. Les culots de bactéries ont été resuspendus dans 2 ml de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.1 mM PMSF) puis 200 µl de lysosyme (10 mg/ml) ont été ajoutés. Cette solution a été incubée pendant 30 min à 25°C, puis congelée toute une nuit à -20°C. Ensuite, la solution a été décongelée dans un bain-marie à 25°C, puis du MgCl₂ a été ajouté pour atteindre une concentration finale de 10 mM. Ensuite, de la benzonase a été ajoutée pour atteindre une concentration finale de 2.5 U/ml, et la solution a été incubée 1 heure 30 à 25°C. Après centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 min à 4°C, le surnageant a été éliminé, le culot lavé 4 fois avec 10 ml de tampon (Tris-HCl 50 mM pH 7.3, Urée 1 M, EDTA 10 mM) et agité pendant 10 min. Après centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 min à 4°C, le culot a été lavé 2 fois avec 10 ml de H₂O froide. Une dernière centrifugation a été effectuée à 12 000 rpm pendant 15 min à 4°C, puis le surnageant a été éliminé et les corps d'inclusions ont été stockés à -20°C.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Deux concentrations de polyacrylamide ont été utilisées dans les gels de séparation : 12 % et 15 %. Les plaques de verre des minigels uniquement ont été utilisées pour préparer ces gels (5 x 8 cm). Le gel de séparation à 12 % a été constitué de 4.2 ml d'H₂O, 4.8 ml de protogel (acrylamide-bisacrylamide, NATIONAL DIAGNOSTICS), 3 ml Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 50 µl d'ammonium persulfate 10 %, 100 µl de SDS 10 %, et 5 µl de TEMED (BIO-RAD). Pour les gels à 15 %, seules les concentrations en H₂O (3 ml) et protogel (6 ml) ont été changées. Un gel de concentration à 4.5 % a été utilisé pour les 2 concentrations de gel de séparation et a été constitué de : 2.4 ml d'H₂O, 600 µl de protogel, 1 ml de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 50 µl d'ammonium persulfate, 50 µl de SDS 10 %, et 5 µl de TEMED. Le marqueur de poids moléculaires (BIO-RAD) utilisé était composé des protéines suivantes : aprotinine (6.5 kDa), lysosyme (14.5 kDa), inhibiteur de la trypsine du germe de soja (21.5 kDa), anhydrase carbonique (31 kDa), ovalbumine (45 kDa), albumine de sérum de bœuf (66 kDa), phosphorylase (97 kDa), -galactosidase (116 kDa) et myosine (200 kDa). Les différents échantillons ont été bouillis pendant 5 min au bain-marie dans le tampon de charge avant d'être ensuite chargés dans le gel. La migration des protéines a été effectuée à l'aide d'un appareil d'électrophorèse (BIO-RAD) à 140 volts fixe (avec ampérage variable) pendant 75 minutes environ.

Après migration, les gels ont été incubés dans une solution de fixation (625 ml d'isopropanol, 250 ml d'acide acétique, complétés à 2.5 litres avec de l'H₂O) pendant 15 min à T°C ambiante. Puis les gels ont été transférés dans une solution de coloration (500 ml de méthanol, 100 ml d'acide acétique, 400 ml d'H₂O, 2.5 g de bleu de Coomassie) et incubés pendant 1 heure. A la fin, les gels ont été mis dans une solution de décoloration lente (88 % H₂O, 7 % d'acide acétique, 5 % de méthanol) pendant toute une nuit sous faible agitation.

Purification des protéines de fusion par électro-élution :

Une bande de gel 12 % contenant la protéine recherchée a été coupée avec une lame de scalpel et déposée dans la gouttière de l'appareil S & S BIOTRAP BT 1000 (BIO-RAD) contenant deux membranes BT 1 (imperméable) et BT 2 (0.8 µm) (SCHLEICHER et SCHUELL). Le montage et l'électro-élution ont été réalisés d'après le protocole fourni par le distributeur de l'appareil. Les protéines de fusion ont été récupérées dans le compartiment d'accumulation après migration pendant 16 heures à 100 volts. Celles-ci ont été précipitées avec de l'acétone absolu 5 X le volume. Après centrifugation pendant 15 min à 4°C, le culot de protéine a été redissout dans du PBS 1 X. Ces protéines ont été digérées à la thrombine (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) pendant 20 heures à 22°C d'après les indications du protocole fourni par le distributeur. La GST, toujours liée à nos protéines A et C, a été ainsi détachée. Ces protéines ont ensuite été chargées sur un gel d'électrophorèse à 15 %. Après une migration à 140 volts (75 min), les bandes de protéines isolées ont été récupérées du gel à l'aide d'une lame de scalpel et purifiées une nouvelle fois grâce à l'appareil S & S BIOTRAP BT 1000 (BIO-RAD) selon le protocole décrit ci-dessus. A la fin, le culot de protéines A et C a été resuspendu dans du PBS 1 X et stocké à -20°C.

Dosage des protéines :

La méthode de BRADFORD (BIO-RAD) basée sur le changement de coloration du bleu de Coomassie G 250 lors de sa fixation sur les protéines a été utilisée. Les échantillons de protéines ont été repris à raison de 10 µl d'échantillon pour 200 µl du réactif de BRADFORD non-dilué (Procédure Microassays). Une courbe étalon a été réalisée avec de l'albumine de sérum de bœuf (BSA) à une concentration de 2 mg /ml. L'absorption a été lue à une longueur d'onde de 595 nm sur un spectrophotomètre Ultraspec 4000 (PHARMACIA).

II.12. Production des Anticorps (AC)

Pour l'obtention des anticorps, deux souris femelles Balb/C (élevage local, Institut de Zoologie) ont été utilisées pour chaque protéine A et C. Environ 300 µl de sang ont été prélevés par ponction rétro-orbitale à des souris avant la première injection intra-péritonéale des protéines A et C (jour 0). Chacune des 4 souris a été immunisée 3 fois avec 150 µl (contenant 40 µg de protéine purifiée) dans 50 % V/V de PBS 1 X / adjuvant de Freund incomplet. Un délai de 2 semaines a été observé entre chaque injection. Environ 350 µl de sang ont été prélevés avant la troisième injection (ce qui correspond au 28^{ème} jour), et un dernier prélèvement sanguin (saignement de la souris) a été effectué 14 jours après la 3^{ème} et dernière injection de protéines (42^{ème} jour). Tout le sang prélevé a été incubé quelques heures à T°C ambiante avant d'être centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. Les sérums contenant les anticorps A et C (sérums A et C) ont été récupérés, aliquotés et stockés à -80°C.

II.13. Western Blots

Les Western blots effectués dans ce travail ont été réalisés sur la base des protocoles modifiés d'après Towbin et al. (1979) et des documents de BIO-RAD. Les protéines ont été séparées par migration sur gels d'électrophorèse (SDS-PAGE) 12 % selon le protocole décrit plus haut (chapitre II.11). Les gels, après une incubation de 5 min dans du tampon de transfert (5.81 g de Tris, 2.93 g de glycine, 0.375 g de SDS, 200 ml de méthanol, compléter à 1 litre avec H₂O), ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose (SCHLEICHER ET SCHUELL), préalablement incubée 15 min dans le tampon de transfert. Cette membrane a été séparée par 2 couches de 6 filtres buvard imbibés dans le tampon de transfert. Ce « sandwich » a été constitué sur l'anode de platine de l'appareil de transfert TRANS.BLOT.SD (BIO-RAD). Après avoir mis la cathode, l'électro-transfert a été effectué pendant 45 min (voltage maximum, courant 5.5 mA / cm² de gel). La présence des bandes protéiques a été vérifiée après coloration de la membrane de nitrocellulose au rouge ponceau pendant 5 min. Après décoloration dans du PBS, les sites non-spécifiques de la nitrocellulose ont été saturés pendant 45 min (3 incubations de 15 min) dans un bain de PBS-lait 5 % (Rapilait, MIGROS). La nitrocellulose a été ensuite incubée pendant une nuit avec le sérum (contenant les anticorps primaire) des souris dilué à 1 : 100 dans du tampon PBS-lait 1 %. Trois rinçages au PBS-lait 5 % ont été effectués (5 min chacun), suivis d'une incubation pendant 1 heure 45 de la nitrocellulose avec l'anticorps secondaire de lapin dirigé contre les IgG de souris, marqué à la peroxydase (NORDIC IMMUNOLOGICAL LABORATORY) et dilué à 1 : 1000 dans du tampon PBS-lait 1 %. Après 3 rinçages dans du PBS-lait 5 % (5 min chacun), la révélation a été réalisée par une solution composée de 4 ml de Tris-HCl pH 6.8 10 mM, 1 ml de 4-chloro-1-naphtol (60 mg / 20 ml de méthanol, protégé de la lumière), et 1.65 µl de H₂O₂ 30 % froid. Après 5-10 min, la nitrocellulose a été rincée à l'eau, séchée et conservée à T°C ambiante à l'abri de la lumière.

II.14. Microscopie électronique et immunocytochimie (d'après le laboratoire de microscopie électronique de l'Institut de Zoologie, exécution par M. Vlimant)

Pour la confection de coupes destinées à la microscopie électronique, les intestins des tiques adultes aux stades suivants ont été prélevés : à jeun, partiellement gorgées pendant 1, 3, 5 et 6 jours. Des intestins provenant de nymphes infectées par des spirochètes (*B. burgdorferi ss*) et partiellement gorgées pendant 2 et 3 jours ont également été utilisés pour la confection de coupes.

Après dissection, les intestins ont été fixés au paraformaldéhyde 4 % avec également 0.5 % de glutaraldéhyde dilué dans du cacodylate 0.1 M. Cette solution de fixation contenait en outre 0.6 % de sucrose. Le paraformaldéhyde est un fixateur très rapide mais qui a le désavantage de ne pas bien fixer les structures. Le glutaraldéhyde est un fixateur plus lent, mais il va beaucoup mieux fixer les protéines. Néanmoins, il ne faut pas en mettre trop car celui-ci peut abîmer les épitopes des antigènes. Il faut donc trouver la juste balance entre paraformaldéhyde et glutaraldéhyde. Après une fixation de 4 heures à 4°C, les intestins ont été lavés 3 x 10 min dans une solution contenant 0.1 M de cacodylate et 4 % de saccharose. Les intestins fixés et lavés ont été ensuite déshydratés dans l'alcool à des concentrations croissantes (de 30 à 100 %) avant d'être inclus dans des capsules contenant de la résine LRWhite (PLANO, Allemagne) qui a été polymérisée ensuite pendant 48 heures à 50°C. Des coupes transversales fines et semi-fines de ces capsules ont été réalisées à l'aide d'un Ultracut (REICHERT-JUNG) équipé d'un couteau de diamant. Les coupes semi-fines ont été posées sur des lames albuminées, colorées au bleu de toluidine et fixées entre lame et lamelle puis observées avec un microscope Olympus aux grossissements 400 x et 1000 x (immersion). Les coupes fines de couleurs grises ou argentées d'environ 50 nm d'épaisseur ont été prélevées et déposées sur des grilles de nickel recouvertes d'une pellicule de Formvar. Les aldéhydes ont été bloqués grâce à une incubation des grilles pendant 1 heure avec du chlorure d'ammonium NH₄Cl

0.5 M. Les grilles de nickel contenant les coupes ont été lavées 3 x 5min dans un tampon contenant 0.24 g de Tris, 0.9 g de NaCl, 0.13 g de NaN₃, 0.1 g de BSA (Bovine Serum Albumine) dans 100 ml d'H₂O distillée. Le pH de ce tampon a été ajusté à 8.5, puis 100 µl de Tween 20 ont été ajoutés avant que le tampon ne soit filtré. Du sérum normal de chèvre a été ensuite ajouté pour atteindre une concentration finale de 1 %. Les sites non-spécifiques ont été bloqués en incubant les grilles pendant 30 min dans du tampon Tris/BSA 0.1 % contenant 0.1 % de Tween 20 et 10 % de sérum normal de chèvre. Les grilles ont été incubées ensuite pendant une nuit dans la solution (Tris/BSA 0.1 % Tween 0.1 % sérum de chèvre 1 %) contenant l'anticorps primaire A ou C dilué à 1 : 100, 1 : 250 ou 1 : 500. Les grilles ont été ensuite lavées 5 x 10 min avec la même solution (Tris/BSA 0.1 % Tween 0.1 % sérum de chèvre 1 %). L'incubation des grilles pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire a été fait dans la solution (Tris/BSA 0.1 % Tween 0.1 % sérum de chèvre 1 %) contenant l'anticorps anti-IgG de souris produit chez la chèvre et marqué à l'or (SIGMA) dilué à 1 : 30.

Les coupes ont été contrastées avec l'acide tannique 1 % pendant 7 min, puis 15 min dans une solution d'uranyle acétate saturée, et enfin pendant 5 min avec une solution de Reynolds contenant du citrate de plomb et du NaOH, préparée selon Reynolds (1963). Les coupes ont été observées au microscope électronique à transmission (TEM) Philips CM 100, à une tension d'accélération de 60 kV. Les photographies ont été prises avec un film Kodak de 35 mm.

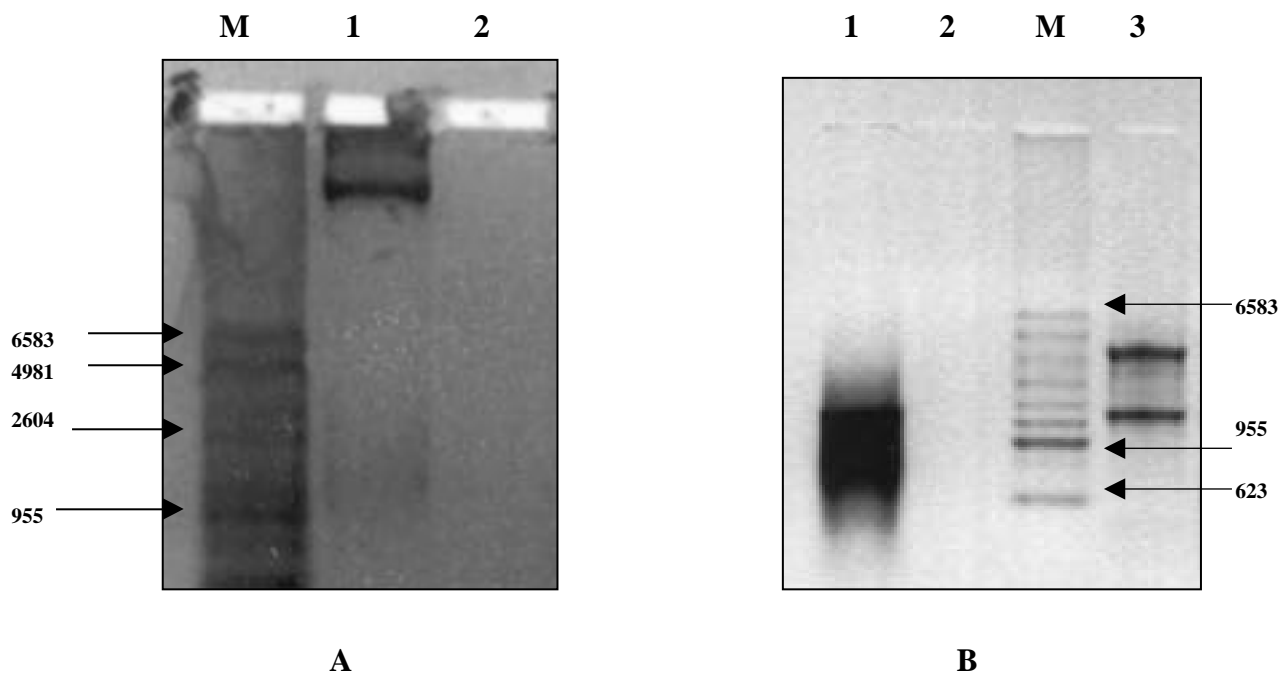
II. 15. Cultures de Borrélies *in vitro*

Les cultures de Borrélies (2 souches utilisées : *B. burgdorferi ss* et *Borrelia afzeli*) ont été repiquées dans 1 ml de milieu de culture BSKII (Barbour Stoenner Kelly) (Barbour, 1984) préparé dans notre laboratoire. Après une période de croissance de 24 heures à 34°C, 30 µg de protéine C dilués dans 100 µl de PBS 1X ont été ajoutés à ces cultures d'un millilitre. Une goutte des cultures a été prélevée chaque jour pendant 4 jours et mise entre lame et lamelle pour être étudiée sous un microscope à fond noir Wild à 500x. Comme témoin négatif, 100 µl de tampon PBS 1X seul ont été ajoutés aux bactéries.

III. Résultats

III.1. Caractéristiques des banques d'ADNc de l'intestin des tiques

La dissection de 450 intestins de tiques femelles à jeun a permis de récupérer 2.4 µg d'ARNm et la dissection de 70 intestins de femelles gorgées 5 jours a permis d'obtenir 16 µg d'ARNm. Le profil d'ARNm obtenu avec les tiques non-gorgées est assez faible et 2 bandes sont présentes dans les très hauts poids moléculaires (figure 5 A). Le profil d'ARNm des tiques gorgées est plus net (figure 5 B).



Figures 5 : Extractions d'ARNm d'intestins de tiques. **A** : à jeun. **B** : gorgées 5 jours. Lignes M : marqueurs de poids moléculaires en paires de bases. Lignes 1 : ARNm. Lignes 2 : contrôles négatifs. Ligne 3 : contrôle ARN total de placenta de rat.

Les profils d'ADNc obtenus après RT-PCR s'étendent de 200 paires de bases (pb) à plus de 2000 pb (figure 6). Leurs formes sont assez différentes : le profil d'ADNc des tiques gorgées contient 3 bandes (à environ 500, 650 et 800 pb) alors que celui des tiques à jeun est homogène.

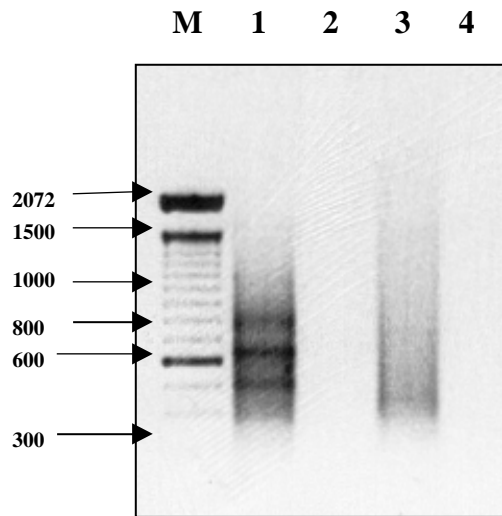
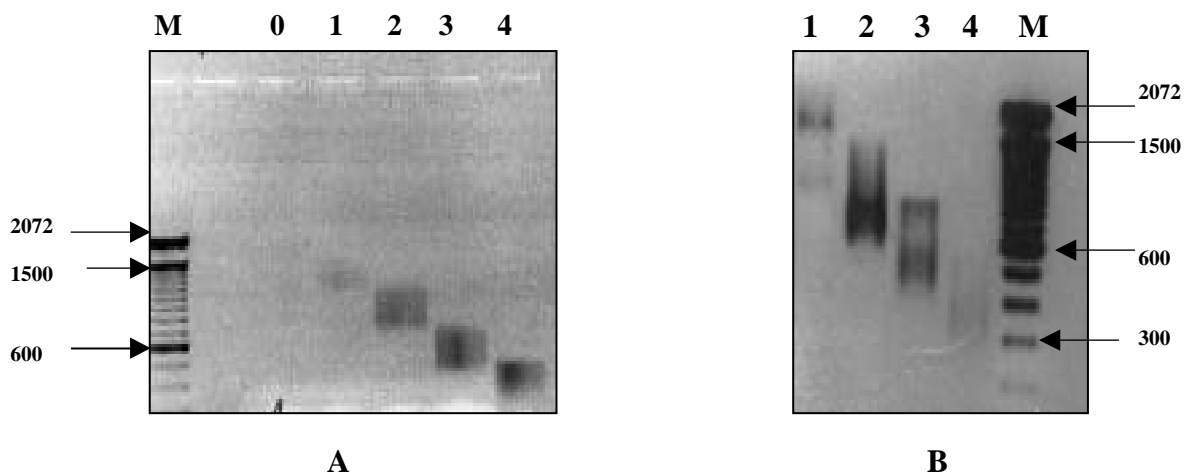


Figure 6 : RT-PCR à partir d'ARNm de tiques à jeun et gorgées 5 jours. Ligne M : marqueurs de poids moléculaires en paires de bases. Ligne 1 : ADNc de tiques gorgées 5 j. Ligne 3 : ADNc de tiques à jeun. Lignes 2 et 4 : contrôles négatifs.

Les profils d'ADNc ont été coupés en 4 fragments (représentant 4 sous-populations d'ADNc, Figures 7 A et B) avant d'être clonés.



Figures 7 : Extractions des profils d'ADNc de tiques. **A** : gorgées 5 jours. **B** : à jeun. Lignes M : marqueurs de poids moléculaires en paires de bases. Ligne 0 : contrôle négatif. Lignes 1-4 : 4 sous-populations d'ADNc de tiques.

Pour les tiques gorgées, ces 4 sous-populations d'ADNc (figure 7 A) sont : 1) : >1500-1100 pb
 2) : 1100 –750pb
 3) 750-500 pb
 4) 500-200 pb

Pour les tiques à jeun, ces 4 sous-populations d'ADNc (figure 7 B) sont : 1) : <2000-1200 pb
 2) : 1500-700 pb
 3) : 900-450 pb
 4) : 500-200 pb

Seule la banque d'ADNc de tiques gorgées a été examinée pour trouver des gènes homologues à des séquences connues. Sur 17 inserts différents provenant des sous-populations 1 et 2, un seul a révélé une homologie significative (d'une longueur supérieure à 30 pb). Cette séquence, d'une longueur totale de 872 pb (figure 8) montre plusieurs homologies avec des séquences codant pour des cathepsines L. Ces similitudes portent sur des longueurs comprises entre 75 et 300 pb (figures 9 A, B, C et D) et montrent :

- 90 % d'homologie avec une cathepsine L décrite chez *H. longicornis* (Mulenga et al., 1999b) (Accession Number (AN) : AB020492)
- 88 % d'homologie avec une cathepsine L décrite chez *B. microplus* (Renard et al., 2000) (AN : AF227957)
- 88 % d'homologie avec une cathepsine L décrite chez *Panaeus vannamei*, Crustacés, Décapodes, (Le Boulay et al., 1998) (AN : X85127)
- 84 % d'homologie avec une cathepsine L décrite chez *Nephrops norvegicus*, Crustacés, Décapodes, (Le Boulay et al., 1998) (AN : X80989)

	3'	
1	AGCGGCCGCGAATTCGCCCTTACGGCTGCGAGAAGACGACAGAGGGGGGT	50
51	AGTTCGCTTCGGGAGTTCGGTTCGGAGTCTTTTGTGGAGTGTACCAATC	100
101	GTGCAAGTGATGCTGCGGTGCCTCGTGTGTGTCTCCTTGTTGCTGCCGC	150
151	CGCTGCGTCAGCTACCAGGAAGTCTTGCGCTGAATGGTCGGCTTTCAA	200
201	GGCAAAGCATGGGAAGTCTTATGTGTCTGAAACTGAGGAAGTGTTCAGGC	250
251	TGAAGATCTACATGGAGAACAGACACAAGATTGCCAAGCACAACGAGAAG	300
301	TACGCCAGGGGGGAGGTGCCCTACAGCATGGCCATGAACGAGTTTGGAGA	350
351	CATGCTTACCACGAATTCGTGAGCCCCGCAATGGCTTCAAGCGAAACT	400
401	ACAAGGATCAGCCCAGGGAGGGATCTACATACCTGGACCCAGAAAACATT	450
451	GAGGACTTCAGCCTTCCCAAGACCGTGGACTGGAGGACCAAGGGCGCGGT	500
501	CACGCCGTCAAGAACCAGGGACAGTGCGGATCCTGCTGGGCCTTCAGTGC	550
551	TACCGGATCCCTGGGAAGGACAGCACTTCCGCAAGAGTGGCTCCATGGTC	600
601	TCCCTGAGCGAACAGAACCTGGTTCGACTGCACCACTGACTTTTGAAACAA	650
651	CGGTTGTGAGGGTGGTCTCATGGACAATGCCTTCAAATACATCAGGGCCA	700
701	ACAAGGGCATTGACACCGAAAAGAGCTACCTTCACAATCGCGCGCACGCA	750
751	ACCTTCGAGCTGGAGAACAASGCGGCTTTGTTTCGAGCGASAASGGSCTTT	800
801	TTKAARAVAAATAAATTAAGTGGARAGATTCAAGAAGGARGCTAAGAAGG	850
851	TTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	872
	5'	

Figure 8 : Séquence nucléotidique d'un gène codant pour une cathepsine (872 pb) isolé chez *I. ricinus* partiellement gorgée pendant 5 jours.

<i>I. ricinus</i>	255			307	331		361
<i>H. longicornis</i>	GATCTACATGGAGAACAGACACAAGATTGCCAAGCACAACGAGAAGTACGCCA						GCCATGAACGAGTTTGGAGACATGCTTCACCA
	187			239	261		291
<i>I. ricinus</i>	362		402	466			506
<i>H. longicornis</i>	CGAATTCGTGAGCCCCGCAATGGCTTCAAGCGAACTAC						CCCAAGACCGTGGACTGGAGGACCAAGGGCGCGGTACAGCC
	292		332	395			435
<i>I. ricinus</i>	509			556	559		586
<i>H. longicornis</i>	TCAAGAACCAGGGACAGTGC GGATCCTGCTGGGCCTTCAGTGCTACCGGA						CCTGGGAAGGACAGCACTTCCGCAAGA
	438			504	507		534
<i>I. ricinus</i>	608	630	646				704
<i>H. longicornis</i>	GCGAACAGAACCTGGTCGACTGC						AACAACGGTTGTGAGGGTGGTCTCATGGACAATGCCTTCAAATACATCAGGGCCAACAA
	553	575	586				644
<i>I. ricinus</i>	705	719					
<i>H. longicornis</i>	GGGCATTGACACCGA						
	645	659					

A

<i>I. ricinus</i>	280		307	507			559
<i>B. microplus</i>	ATTGCCAAGCACAACGAGAAGTACGCCA						GTCAAGAACCAGGGACAGTGC GGATCCTGCTGGGCCTTCAGTGCTACCGGATC
	203		230	422			574
<i>I. ricinus</i>	560	646					738
<i>B. microplus</i>	CCTGG AACAACGGTTGTGAGGTGGTCTCATGGACAATGCCTTCAAATACATCAGGCCAACAAGGGCATTGACACCGAAAAG						
	575	560					642

B

<i>I. ricinus</i>	475						545
<i>P. vannamei</i>	GTGGACTGGAGGACCAAGGGCGCGGTACGCC-GTCAAGAACCAGGGACAGTGC GGATCCTGCTGGGCCTTC						
	337						408
<i>I. ricinus</i>	667			719			
<i>P. vannamei</i>	CTCATGGACAATGCCTTCAAATACATCAGGGCCAACAAGGGCATTGACACCGA						
	529			581			

C

<i>I. ricinus</i>	507						585
<i>N. norvegicus</i>	GTCAAGAACCAGGGACAGTGC GGATCCTGCTGGGCCTTCAGTGCTACCGGATCCCTGGGAAGGACAGCACTTCCGCAAG						
	377						489

D

Figures 9 : Alignements multiples des séquences des cathepsines L chez *H. longicornis* (A), *B. microplus* (B), *P. vannamei* (C) et *N. norvegicus* (D). Les bases en gras sont homologues. La référence est la séquence d'*I. ricinus*.

III.2. Gènes spécifiques aux tiques gorgées

III.2.1. Constitution d'une banque soustractive d'ADNc provenant de l'intestin au cours du repas sanguin par la méthode RDA

L'ADNc digéré et amplifié est différent chez les tiques gorgées (cible, plusieurs bandes) par rapport aux non-gorgées (témoin, pas de bandes claires). Les 3 produits soustractifs DP1, DP2 et DP3 obtenus sont d'allure générale assez semblable (figure 10) : tous contiennent 2 bandes clairement définies : juste en dessous de 298 pb (bande 1) et vers 220 pb (bande 2). Néanmoins, de plus près, les différences sont présentes d'une étape d'hybridation à l'autre. En effet, avec DP1, la bande 1 est moins nette que sur les 2 produits suivants, et du matériel amplifié est encore présent au-dessus de cette bande. Entre DP2 et DP3, il n'y a pas de grandes différences ; une petite bande (bande 3) apparaît néanmoins en dessous de la bande 2 dans DP2 et est encore plus présente dans DP3.

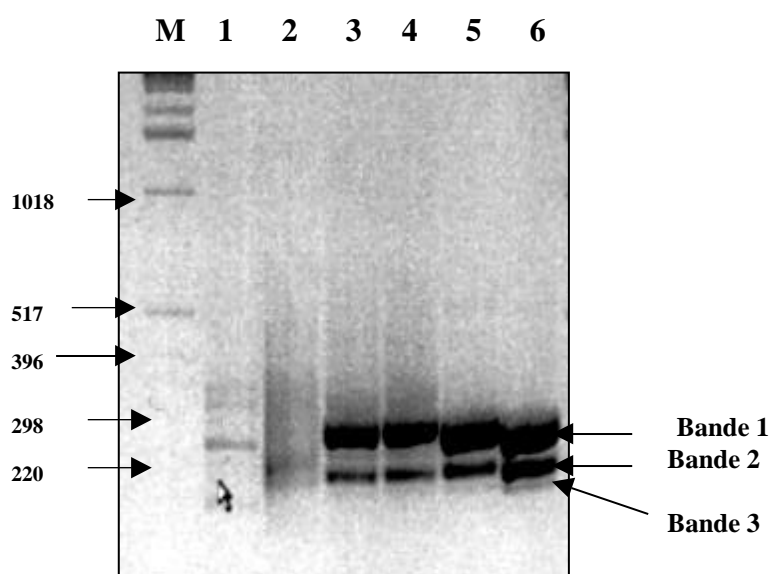


Figure 10 : Isolement de fragments de gènes par RDA. Ligne M : marqueur de poids moléculaires en paires de bases. Ligne 1 : cible (tiques gorgées). Ligne 2 : Témoin (tiques non-gorgées). Lignes 3-4 : DP1. Ligne 5 : DP2. Ligne 6 : DP3.

Les 3 bandes des produits DP2 et DP3 ont été séquencées. Avec DP2, six fragments de tailles et de séquences différentes ont été obtenus (tableau 5) :

Tableau 5 : Fragments obtenus après séquençage des bandes DP2

Tailles sur gel d'agarose	Tailles après séquençage	Tailles sans les adaptateurs utilisés dans la RDA
Bande 1 (~ 298 pb)	Fragment de 298 pb	250 pb (fragment A)
	Fragment de 297 pb	249 pb
	Fragment de 255 pb	207 pb
Bande 2 (~220 pb)	Fragment de 205 pb	157 pb (fragment B)
	Fragment de 222 pb	174 pb (fragment C)
Bande 3 (~200 pb)	Fragment de 180 pb	132 pb (fragment D)

Pour les bandes 1 et 2, les fragments les plus souvent recensés parmi tous les clones (sur un total de 40 séquencés) étaient ceux de 297 pb et 205 pb respectivement. Les fragments de 222 pb et 255 pb ont été obtenus assez rarement (moins de 10 %). Des amorces spécifiques à ces six fragments ont été réalisés pour vérifier si ces derniers étaient bien absents chez les tiques non-gorgées ; une amplification nette a été obtenue avec uniquement les fragments de 255 pb et 297 pb (photo non-montrée ici) à partir d'ADNc de tiques à jeun ; l'amplification avec les autres fragments étant négative.

Avec **DP3**, les fragments de 297 pb et 255 pb n'ont plus réapparu au séquençage. Les séquences de la banque soustractive spécifiques aux tiques gorgées sont (figure 11) :

Fragment A : 250 pb

Fragment B : 157 pb

Fragment C : 174 pb

Fragment D : 132 pb

En utilisant les programmes BLASTX et BLASTN, des homologues avec une cystatine (fragment A), une glutathion peroxydase (fragment B) et un allergène d'acarien (fragment C) ont été trouvés (figure 11). Ces homologues ont été obtenus en comparant les séquences en acides aminés uniquement. Elles ne sont pas montrées ici ; elles sont détaillées au chapitre suivant (III.3), avec les séquences complètes des gènes. Aucune similarité n'a été obtenue avec le fragment D.

Fragment A :

5' ^{5'GSP1_A ←} GATCTGGAGGAGGCACCACCCGGACGTGGACCCCCGCTACAAGGAGTGGGCCCACCTTCGCCATCTCTTCCCAAGT
^{5'GSP-RT_A ←} CGAGGGCAGGACCAACTACGACACGCTCCTCAAGCTCATGAGCGTCGAGTCTCAGGTGGTTGCGGGTGTGCGACTAC
AAGCTCAAGATGATGGTAGCAATCCACCTGCGTGGT**CGGGAAGGACTGGTACAGCAGCGAACACGCTGCCACCC**
^{→ 3' GSP1_A} ^{→ 3' GSP2_A}
CAAGGTGGACGCTCCCCACATGATC 3'

Homologie avec une cystatine.

Fragment B :

5' GATCGTTAATGTGGCCTGCAAGTGCCTCCTGACGCAGGAACACTACAAGAACTGAGTGCGCTCTACCACAA
^{5'GSP-RT_B ←} ^{5'GSP2_B ←} ^{5'GSP1_B ←} ^{→ 3'GSP1_B} ^{→ 3'GSP2_B}
GTACTCGGAATCCAAGGGGTTGCGCATCATGGCTTCCCCACCAACGACTTTGCCAAGCAGGAACCCCTGGGCC
GAACCCGAGATC 3'

Homologie avec une glutathion peroxydase.

Fragment C :

5' GATCCGTGTGTCTTCAAGATGGGGACAGATGCCAAGATTCACGTCACTATGGTTGCTGACCAGGACAGCGAC
^{5'GSP-RT_C ←} ^{5'GSP2_C ←} ^{5'GSP1_C ←} ^{→ 3'GSP1_C} ^{→ 3'GSP2_C}
ACGGCGCACTGGACGCCAGGGTGAATGTGTTCGGCTTCCAGATGCCGGTGCCTGGCATCGAGACGGACCTGT
GCAAAGGCACCGTCGAGTGCCCCGTGATC 3'

Homologie avec un allergène d'acarien.

Fragment D :

5'
GATCCCAATTGGTTCGAAACAGACGGCAGCCTTTGAGACCTCTAGGAGTTGTTGACAGGTTCCGCCGAGCTGTAGTAC
TTGATACTTTTTGTGTGCTCCAGGGAATGTAGTTGACGACGGCGGTGGCAGATC 3'

Aucune homologie.

Figure 11 : Séquences des 4 fragments DP3 obtenus par RDA (les bases en gras représentent les amorces utilisés dans la RACE pour obtenir les gènes entiers (sauf fragment D, voir chapitre III.2.2).

Les homologies obtenues avec le programme BLASTX sont indiquées.

Une PCR a confirmé la présence exclusive de ces 4 séquences dans les tiques partiellement gorgées pendant 5 jours (figure 12) : l'amplification est positive avec l'ADNc de tiques partiellement gorgées pendant 5 jours comme matériel de départ, mais par contre rien n'est amplifié à partir d'ADNc de tiques à jeun (l'amplification avec le fragment D n'a pas réussi et ne fait donc pas partie de la figure 12).

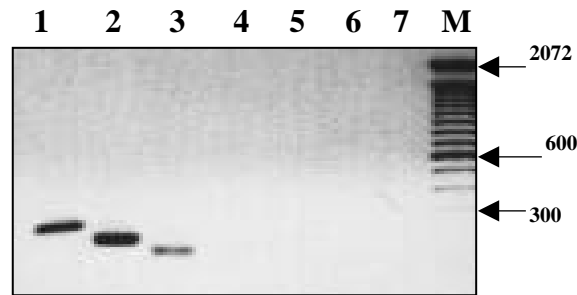


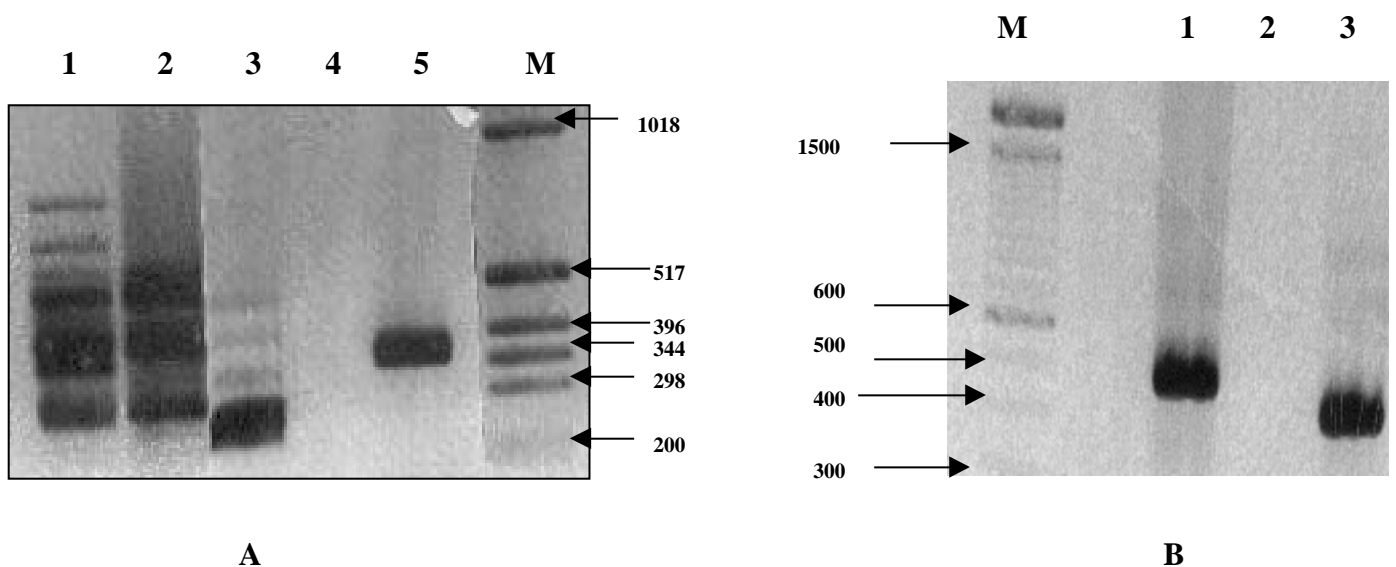
Figure 12 : PCR avec amorces spécifiques aux fragments A à D en prenant comme matériel de départ l'ADNc de tiques gorgées 5 jours (lignes 1-3) et de tiques à jeun (lignes 4-6). Lignes 1 et 4 : fragment de 250 pb. Lignes 2 et 5 : fragment de 174pb. Lignes 3 et 6 : Fragment de 157 pb. Ligne 7 : contrôle négatif. Ligne M : marqueur de poids moléculaire en paires de bases.

III.2.2. Isolement des gènes complets par RACE

Pour l'isolement des séquences complètes, seuls les fragments A, B et C montrant des homologies avec des gènes connus ont été pris en compte.

3'RACE

Plusieurs bandes assez bien définies ont été obtenues suite à la 1^{ère} amplification du **fragment A** avec les amorces 3'GSP1_A et Q_O (figure 13 A). Avec la 2^{ème} amplification, une bande entre 200 et 298 pb a été obtenue ainsi que 3 bandes aspécifiques. Avec le **fragment B**, le profil obtenu après la 1^{ère} amplification a disparu au profit d'une bande unique vers 370 pb, suite à la 2^{ème} amplification avec les amorces 3'GSP2_B et Q_I. Pour le **fragment C**, une bande unique a été obtenue lors des 1^{ère} et 2^{ème} amplifications (figure 13 B).



Figures 13 A : RACE 3' avec les fragments A et B du DP3. Ligne 1 : 1^{ère} amplification avec 3'GSP1_A (fragment A). Ligne 2 : 1^{ère} amplification avec 3'GSP1_B (fragment B). Ligne 3 : 2^{ème} amplification avec 3'GSP2_A (fragment A). Ligne 5 : 2^{ème} amplification avec 3'GSP2_B (fragment B). Ligne 4 : contrôle négatif. Ligne M : marqueur de poids moléculaires en paires de bases.

B : RACE 3' avec fragment C de DP3. Ligne M : marqueur de poids moléculaires en paires de bases. Ligne 1 : 1^{ère} amplification avec 3'GSP1_C. Ligne 3 : 2^{ème} amplification avec 3'GSP2_C. Ligne 2 : contrôle négatif.

5'RACE

Un profil avec quelques bandes discrètes a été obtenu suite à la première amplification du **fragment A** avec les amorces 5'GSP1_A et Q₀ (figure 14). Suite au 2^{ème} tour d'amplification avec 5'GSP2_A et Q_I, une bande unique apparaît vers 450 pb environ.

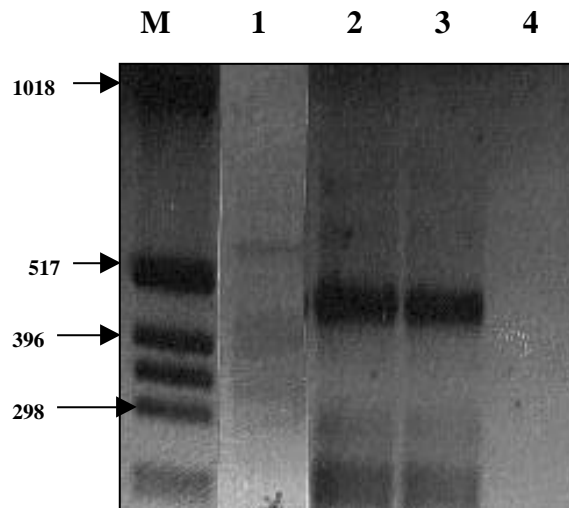
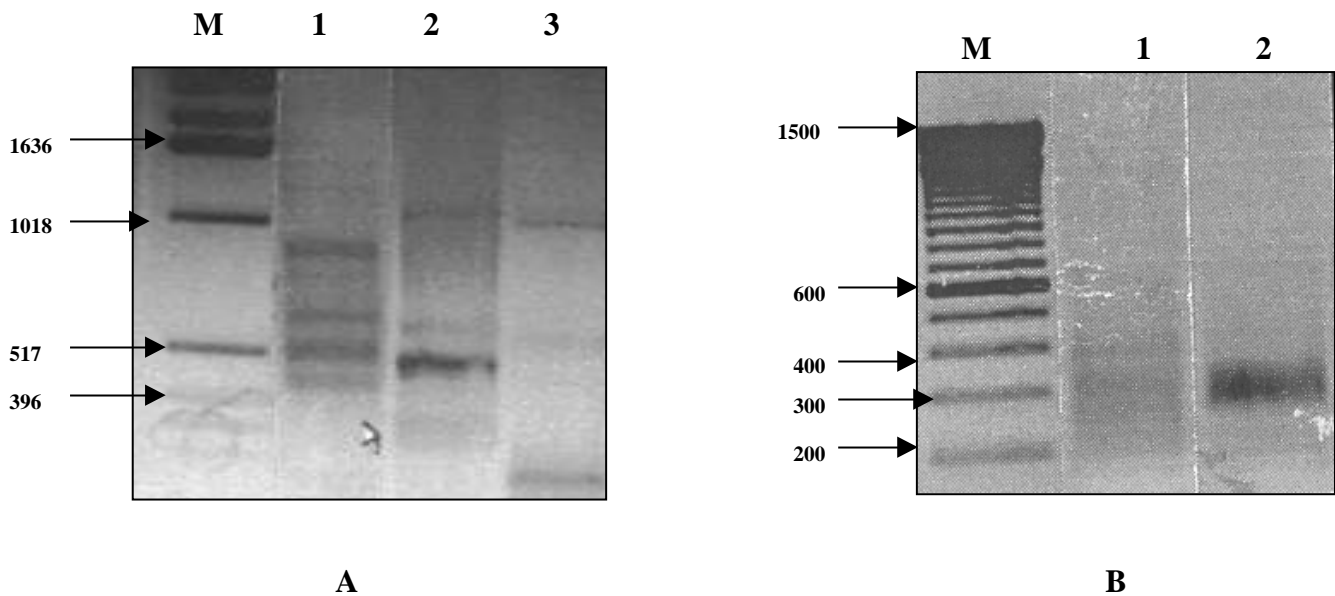


Figure 14 : RACE 5' avec fragment A de DP3. Ligne M : marqueur de poids moléculaires en paires de bases. Ligne 1 : 1^{ère} amplification avec 5' GSP1_A. Lignes 2-3 : 2^e amplification avec 5'GSP2_A. Ligne 4 : contrôle négatif.

Un profil contenant quelques bandes a été obtenu suite à la 1^{ère} amplification avec le **fragment B** (figure 15 A). Après la 2^{ème} amplification avec 5'GSP2_B et Q_I, trois bandes apparaissent dont une plus marquée en dessous de 500 pb. Trois bandes apparaissent sur le profil du contrôle négatif. Celles-ci ne correspondent pas à la bande au-dessous de 500 pb obtenue après la 2^{ème} amplification, qui semble être la partie 5' correcte. Un profil sans aucune bande a été obtenu après la 1^{ère} amplification du **fragment C** (figure 15 B). Suite à la 2^{ème} amplification avec 5'GSP2_C et Q_I, un profil contenant une bande vers 300 pb a été obtenu.



Figures 15 : **A :** RACE 5' avec fragment B de DP3. Ligne M : marqueur de poids moléculaires en paires de bases. Ligne 1 : 1^{ère} amplification avec 5'GSP1_B. Lignes 2 : 2^{ème} amplification avec 5'GSP2_B. Ligne 3 : contrôle négatif.

B : RACE 5' avec fragment C du DP3. Ligne M : marqueur de poids moléculaire en paires de bases. Ligne 1 : 1^{ère} amplification avec 5'GSP1_C. Ligne 2 : 2^{ème} amplification avec 5'GSP2_C.

Les bandes d'ADNc obtenues suite aux 2^{èmes} amplifications (des côtés 3' et 5') ont été isolées puis séquencées (tableau 6).

Tableau 6 : Tailles des bandes d'ADNc obtenues après les 2^{èmes} amplifications de la RACE

fragments	Tailles sur gel	Taille après séquençage
3' A	~200 pb	200 pb
3' B	~360 pb	344 pb
3' C	~350 pb	357 pb
5' A	~450 pb	425 pb
5' B	~480 pb	413 pb
5' C	~300 pb	186 pb

III.2.3. Caractérisation des gènes complets

Les séquences complètes des fragments partiels ont été obtenues grâce aux parties des séquences 3' et 5' obtenues par la RACE.

L'**insert A** est composé de 875 pb (figure 16 A) avec une partie codante constituée de 399 pb (bases 361 à 759) et de 133 acides aminés (correspondant à un poids moléculaire de 15 kDa). Celle-ci englobe une partie des extrémités 3' et 5' obtenues par la RACE (figure 16 A). L'insert A contient à son extrémité 5' la séquence du fragment D de 132 pb obtenu par RDA ; celui-ci se trouve des bases 43 à 174 (figure 16A). Un peptide signal de 20 acides aminés (aa) formant un domaine hydrophobe (figure 16 B) a été localisé dans la région N-terminale. Cinq résidus cystéines en position 15, 83, 95, 106 et 126 ont été trouvés. Certaines de ces cystéines forment probablement des ponts disulfures. Les acides aminés les plus représentés sont la valine (12.6 %) et la sérine (8.1 %). Le pourcentage des autres acides aminés est compris entre 1.5 et 6.7 %. La partie codante de l'insert A présente des similitudes au niveau protéique avec de nombreux gènes codant pour des **cystatines** (figure 17). Les homologies sont faibles, entre 25 et 38 % (41 et 52 % si on prend en compte les aa qui ne diffèrent que d'une base au niveau de leurs séquences nucléotidiques). Les 50 premiers aa ne montrent presque aucune homologie, à part un polypeptide de 4 aa (⁴¹FAIS⁴⁴) qui se retrouve dans les séquences des cystatines D, S et C (en partie). La suite de la partie codante montre trois domaines très conservés dans beaucoup des cystatines : le polypeptide ⁶⁵QVVAGVxY⁷², le tripeptide ¹¹⁶PWE¹¹⁸ ainsi que les quatre résidus cystéines en position 83, 95, 106 et 126. Les tailles des parties codantes des autres séquences comparées sont similaires à celle d'*I. ricinus* à quelques acides aminés près. L'exception vient de la séquence du kininogène, qui, pour la même région, contient 200 aa de plus que les autres.

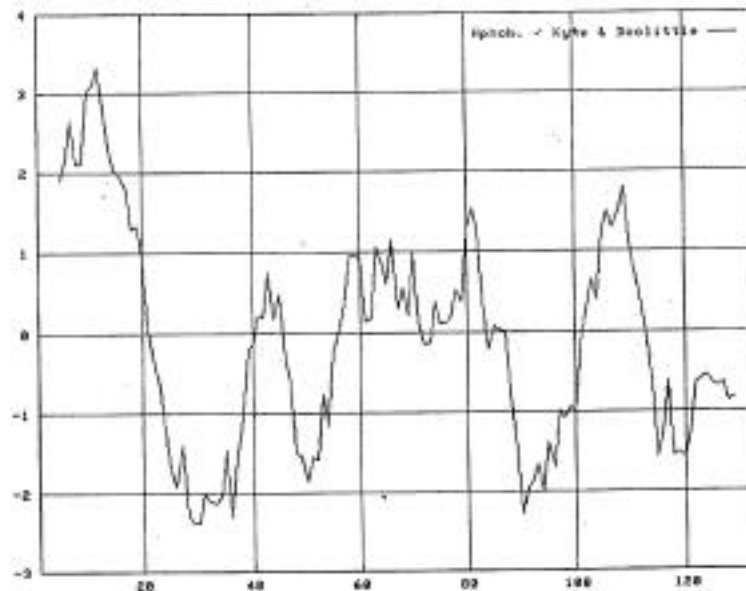
L'**insert B** est composé de 914 pb (figure 18 A) avec une partie codante constituée de 615 pb (bases 202 à 816 pb) et de 205 acides aminés (correspondant à un poids moléculaire de 23.8 kDa). Celle-ci englobe une grande partie des extrémités 3' et 5' obtenues par la RACE (figure 18 A). La partie codante se termine par un codon stop TGA, mais il est possible que celui-ci soit aussi une sélénocystéine, ce qui repousserait le codon stop au triplet ⁸⁶⁰TAA. Aucun peptide signal commençant avec le codon START n'a été localisé dans la région N-terminale (figure 18 B). Néanmoins, un domaine hydrophobe est présent dès le 23^{ème} acide aminé environ. Deux acides aminés dominent : la leucine (10.2 %) et l'acide glutamique (9.6 %). Deux autres acides aminés sont supérieurs à la moyenne des autres (entre 1 % et 6.4 %) : l'alanine (8.5 %) et l'arginine (8.5 %). La partie codante de l'insert B présente des similitudes au niveau protéique avec de nombreux gènes codant pour des **glutathion peroxydases** (figure 19). Les homologies sont assez grandes (entre 47 et 54 % ; entre 66 et 70 % si on prend en compte les aa qui ne diffèrent que d'une base au niveau de leurs séquences nucléotidiques) avec de nombreux domaines conservés : ⁴⁹EF⁵⁰, ⁵⁴DixG⁵⁷, ⁶⁴KYRGxV⁶⁹, ⁷²IxNVxxC⁷⁸, ¹⁰¹GLRIxAFPxNx^{F112} et ¹²²EIKEF¹²⁶. La 2^{ème} moitié de la séquence (environ 90 aa) n'est reconnue par aucun gène décrit dans les bases de données (GenBank). A noter que les homologies pour beaucoup d'autres glutathion peroxydases (parmi un total de 445) décrites chez d'autres espèces animales et végétales (comme *Sus scrofa*, *Bos taurus*, *Drosophila melanogaster*, *Gallus gallus*, *Arabidopsis thaliana* entre autres) n'ont pas été indiquées sur la figure 19. En effet, celles-ci sont sensiblement identiques (différences de 2 ou 3 aa pas plus) aux homologies décrites chez l'homme et le rat.

```

5'
1  GAATTATTTATTCGCTGTTCTTCCAATAAAAGATAAATCAGAGATCCCAATTGGTTCGAT 60
61  TCAGACGGCAGCCTATGAGACCTCTAGGAGTTGTTGACAGGTTGCGCCGAGCTGTAGTAC 120
121 TTGATACTTTTTGTGTGCTCCCAGGAATGTAGTTGACGACGGCGGTGCAGATCTTGTGG 180
181 GGAGCGTCCACCTTGGGGTGGCAGCGTGTCTGCTGTACCAGTCCTTCCCGACCACGCAG 240
241 GTGGATTTCGGCTACCATCATCTTGAGCTTGTAGTCGACACCCGCAACCACCTGAGACTCG 300
301 ACGCTCATTAGCTTGAGGAGCGTGTGCTAGTTGATCGCTCGACATCGGACAGAACCCGAG 360
361 ATGAGTATCGTGAAGGCAGCGCTCCTTGTCTCGGGCGTGTGTTGTCTCTCGACGGCCTTT 420
1  M S I V K A A L L V L G V V C L S T A F 20
421 CCCGGGATCTGGAGGAGGCACCACCCGGACGTGGACCCCGCTACAAGGAGTGGGCCAC 480
21  P G I W R R H H P D V D P R Y K E W A H 40
481 TTCGCCATCTCTTCCCAAGTCGAGGGCAGGACCAACTACGACACGCTCCTCAAGCTCATG 540
41  F A I S S Q V E G R T N Y D T L L K L M 60
541 AGCGTCGAGTCTCAGGTGGTTGCGGGTGTGCGACTACAAGCTCAAGATGATGGTAGCCGAA 600
61  S V E S Q V V A G V D Y K L K M M V A E 80
601 TCCACCTGCGTGGTTCGGGAAGGACTGGTACAGCAGAACACGCTGCCACCCCAAGGTGGAC 660
81  S T C V V G K D W Y S R T R C H P K V D 100
661 GCTCCCCACATGATCTGCACCGCGTCGTCAACTACATTCCCTGGGAGCACACAAAAAGT 720
101 A P H M I C T A V V N Y I P W E H T K S 120
721 ATCAAGTACTACAGCTGCGGCGAACCTGTCAACAACCTCCTAGAGGTCTCAAAGGTGCCG 780
121 I K Y Y S C G E P V N N S -
781 TCTGTTTCGAACCTCGAACCAATTGGGATCTCTGATTTATATTTTACGGGAAGAACAGCG 840
841 AATAAATAATTCAATAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3' 875

```

B

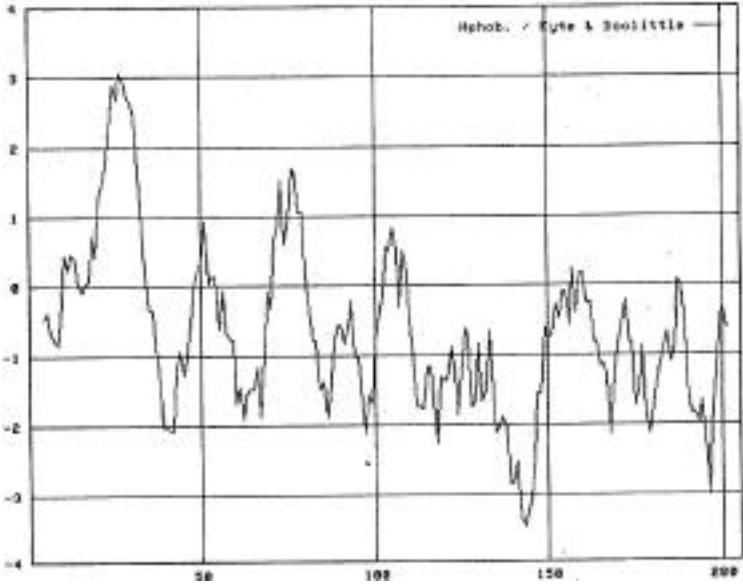


Figures 16 : A : Séquence nucléotidique totale de l'insert A composée de 875 pb. Les bases en gras représentent la partie obtenue par RDA (fragment A). La partie codante est indiquée par la présence des acides aminés (ceux correspondant aux codons Start et Stop sont en gras soulignés).

B : profil de l'hydrophobicité des acides aminés de la partie codante de l'insert A. La partie N-terminale de cette séquence (N-t) est hydrophobe. Les valeurs négatives représentent les aa hydrophiles, et les valeurs positives représentent les aa hydrophobes. (axe X : nb d'aa / axe Y : score, selon Kyte et Doolittle, 1982).

5'
1 GATCGTGCAGCCTTACAATTTATTAACATTTAATGGTGTATTATCCGAAGATGTCTTGCT 60
61 TTGGCAGTTGAGGCTGCTTCTTCATTCTTCTAAAAGTACTTGAGAAGGTCTGCTTCGATT 120
121 GTTTCGAACGAGTCGGTGGGTCCATAACGCTTCACGGGCTGTCCGTTCTTGTGCGCCAGA 180
181 AACTTGGTGAAGTTCATTTG**ATG**CGGTGAAGAGGAAGCCCGGCTGCTTCTCCTTCAGG 240
M A L K R K P G C F S F R 13
241 TACATCCAAGCCATGTGGCCCTTGAAGATTGCGGTGCTGCTTCTGGTTGCGGGTTTGACC 300
14 Y I Q A M W P L K I A V L L L V A G L T 33
301 CTGGCCAACCTCTGATGAGGGCTGGAAGAACGCCAAGTCAATCTACGAGTTCTCAGCCCTC 360
34 L A N S D E G W K N A K S I Y E F S A L 53
361 GACATCGACGGCAACAAGGTTGACTTCAACAAGTACAGGGGTACGTGACGCAG**ATCGTT** 420
54 **D I D G N K V D F N K Y R G H V T Q I V** 73
421 **AATGTGGCCTGCAAGTGCCTCCTGACGCAGGAACACTACAAGAACTGAGTGCCTCTAC** 480
74 **N V A C K C L L T Q E H Y K K L S A L Y** 93
481 **CACAAGTACTCGGAATCCAAGGGCTTGCGCATCATGGCTTTCCCCACCAACGACTTTGCC** 540
94 **H K Y S E S K G L R I M A F P T N D F A** 113
541 **AAGCAGGAACCCTGGGCCGAACCCGAGATCA**AGGAGTTTCGTGAAGCAGTTCGACGTCAC 600
114 K Q E P W A E P E I K E F R E A V R R H 133
601 CTTGACATGTTTCAAGATCAGCGTGAACGGGACAACGCCACCCGCTCTGGAGTA 660
134 L R H V Q Q D Q R E R G Q R P P A L E V 153
661 CCTGAAGGAGAAGCAGCCGGGCTTCTCTTCAACGCCATCAAATGGAACCTCACCAAGTT 720
154 P E G E A A G L P L Q R H Q M E L H Q V 173
721 TCTGGTGGACAAGAACGGACAGCCGTGAAGCGTTATGGACCCACCGACTCGTTCGAAAC 780
174 S G G Q E R T A R E A L W T H R L V R N 176
781 AATCGAAGCAGACCTTCTCAAGTACTTTTAGAAGAAT**GA**AGAAGCAGCCTCAACTGCCAA 840
194 N R S R P S Q V L L E E -
841 AGCAAGACATCTTCGGAATAAACACCATTAATGTTAATAAATTGTAAGGCTGCACGAAA 900
901 AAAAAAAAAAAAAA 3' 914

B



Figures 18 : A : Séquence nucléotidique totale de l'insert B composée de 914 pb. Les bases en gras représentent la partie obtenue par RDA (fragment B). La partie codante est indiquée par la présence des acides aminés (ceux correspondant aux codons Start et Stop sont en gras soulignés).

B : profil de l'hydrophobicité des acides aminés de la partie codante de l'insert B. La partie N-terminale de cette séquence (N-t) est hydrophobe. Les valeurs négatives représentent les aa hydrophiles, et les valeurs positives représentent les aa hydrophobes. (axe X : nb d'aa / axe Y : score, selon Kyte et Doolittle, 1982).

<i>I. ricinus</i>	<u>M</u> ALKRKP GCF SFRYIQAMWPLKIAVLLLLVAGLTLAN	36
<i>I. ricinus</i>	SDEGWKNAKSIY EF SALD ID GNKVD FN KYRGHV TQ IVNVACKCLLTQE	84
GPX (<i>S. mansoni</i>) ¹	----KSWNSIY EF TVK DING VVDVSL E KYRGHV CL IVNVACKCGATDK	47
PHGPX (homme) ²	SRDDWRCARSM HE FA KD IDGHMVNLD KY RGF VC IVTN VAS QC GK TEV	77
PHGPX (rat) ³	SRDDWRCARSM HE FA KD IDGHMVCLD KY RG CV CVITNV AS QC GK TDV	50
<i>I. ricinus</i>	HYKKLSALYHKYSESK GLR IM AF PT ND FA KQ EPWAE PE IK EF REAVRR	132
GPX (<i>S. mansoni</i>)	NYRQLQEM-HTRLVGK GLR IL AF PC NQ FG Q EPWAE AE IK EF	88
PHGPX (homme)	NYTQLVDLHARYAEC- GLR IL AF PC NQ FG KQ EPGS NE IK EF	119
PHGPX (rat)	NYTQLVDLHARYAEC- GLR IL AF PC NQ FG RQ EPGS NQ IK EF	92
<i>I. ricinus</i>	HLRHVQQDQREGRQRP PA LEV PE GEA AG L PL QRH Q MELH Q VSG Q ERT	180
<i>I. ricinus</i>	AREALWTHRLVRRNNRSRPSQVLL EE -	205

Figure 19 : Alignements multiples des glutathion peroxydases (GHX) et des phospholipides glutathion peroxydases (PHGX) de *Schistosoma mansoni*, du rat et de l'homme en prenant comme référence la partie codante de l'insert B isolé chez *I. ricinus*. Les sites les plus conservés sont indiqués en gras.

¹ : Williams et al. (1991) (AN : Q00277)

² : Esworthy et al. (1994) (AN : CAA50793)

³ : Pushpa-Rekha et al. (1995) (AN : AAC52503)

L'insert C est composé de 717 pb (figure 20 A), avec une partie codante constituée de 348 pb (bases 61 à 408 pb) et de 116 acides aminés (correspondant à un poids moléculaire de 12.3 kDa). Celle-ci englobe une partie des extrémités 3' et 5' obtenues par la RACE (figure 20 A). Un peptide signal de 16 aa formant un domaine hydrophobe été localisé dans la région N-terminale (figure 20 B). Sept résidus cystéines en position 16, 26, 40, 91, 97 et 103 ont été trouvés. Certains de ces résidus forment probablement des ponts disulfures. Les deux acides aminés valine (12.9%) et sérine (9.5 %) sont plus présents que les autres. Les acides aminés restants sont compris entre 1.7 % et 7.8 %. La partie codante de l'insert C présente des similitudes au niveau protéique avec de nombreux gènes codant pour des **allergènes d'acariens** (figure 21). Les homologies sont faibles, entre 26 et 30 % (entre 44 et 54 % si on prend en compte les aa qui ne diffèrent que d'une base au niveau de leurs séquences nucléotidiques). Un grand domaine est assez conservé en fin de séquence en prenant comme base la séquence d' *I. ricinus* : ⁸³VPGIETD**x**CK⁹². Cinq résidus cystéines sont conservés en positions 26, 40, 45, 91 et 97. Les séquences des protéines de l'épididyme et du lait de vache partagent avec les autres séquences les cystéines conservées mais n'ont pas de domaines de plus de 2 aa communs aux autres séquences. Les tailles des parties codantes des autres séquences comparées sont similaires à celle d'*I. ricinus* à quelques acides aminés près.

```

5'
1  AAACACTTTTGCCTTCTTGGATGCGCCTGAAGTCAGCCCAGACTGCAGTCGCCCACAGCC 60

61  ATGTTCCGTTACGTTGTGTTTCCTGCTGATTGTTCAGCGCTGTGTCCTGCCAGCGAAGAAAA 120
1  M F R Y V V F L L I V S A V S C Q R R K 20
121  GCCGTGTATAAACCTTGTGGCGGATCCGGCAAGCTCATCAGCGTTGAGGTCGGGCCCTGC 180
21  A V Y K P C G G S G K L I S V E V G P C 40
181  GATTCCGATCCGTGTGTCTTCAAGATGGGGACAGATGCCAAGATTCACGTCACTATGGTT 240
41  D S D P C V F K M G T D A K I H V T M V 60
241  GCTGACCAGGACAGCGACACGGCGACTGGACGCCAGGGTCAAGGTGTTCCGGCTTCCAG 300
61  A D Q D S D T A T L D A R V K V F G F Q 80
301  ATGCCGGTGCCTGGCATCGAGACGGACCTGTGCAAAGGCACCGTCGACTGCCCCGTGATC 360
81  M P V P G I E T D L C K G T V D C P V I 100
361  AGGGACGGAAGTACAGCGTCACCGCCGTCTTCCCTGTGCCCTCTCTCATGAGTCTGAAGA 420
101  R D G S T A S P P S S L C P L S -
421  CTGAAGTCACTTTCAAGGTGATTAGGCGACAAGGGACTCAGCGTCTGCGGCCAATCGGAC 480

481  ATCGTCATCGAGTGAACATCGCACCCGGGCACCTCGCCGAGTCTTCCGCCATCATCCGC 540

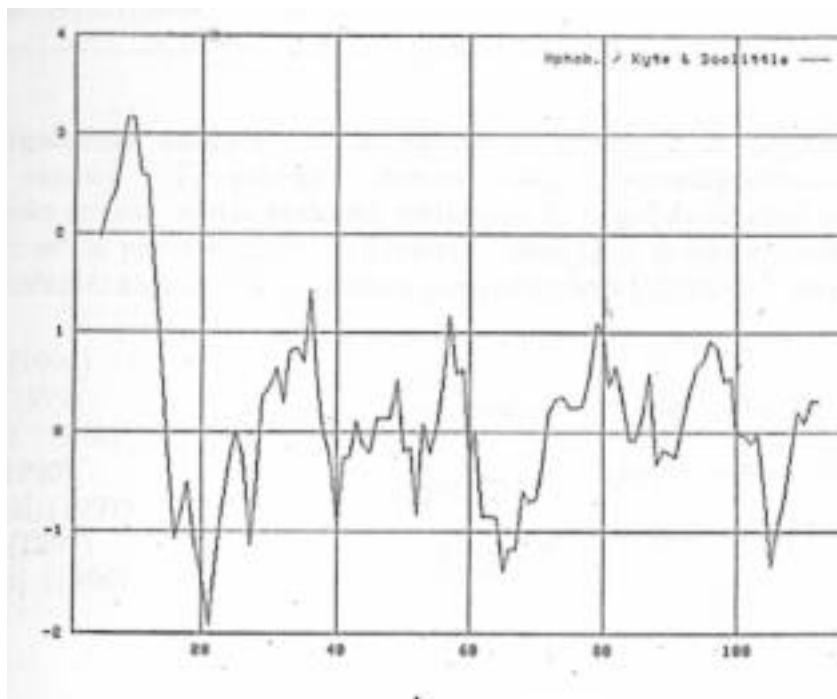
541  AGCTCTTAAACGAATCCACAACGTTCCGTGACGTCATGTTACAGCGGTGGGGATGTCAAC 601

601  AGCGTGCAGGGTCGCCACTGAAAGTGCTTCACGCCGAGACACCGACTCGCACGATCAGGG 661

661  ATGCTAGGTCGTACTTCATTTTGTTCGTAAACAATAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3' 717

```

B



Figures 20 : A : Séquence nucléotidique totale de l'insert C composée de 719 pb. Les bases en gras représentent la partie obtenue par RDA (fragment C). La partie codante est indiquée par la présence des acides aminés (ceux correspondant aux codons Start et Stop sont en gras soulignés).

B : profil de l'hydrophobicité des acides aminés de la partie codante de l'insert C. La partie N-terminale de cette séquence (N-t) est hydrophobe. Les valeurs négatives représentent les aa hydrophiles, et les valeurs positives représentent les aa hydrophobes. (axe X : nb d'aa / axe Y : score, selon Kyte et Doolittle, 1982).

		26	40	45	
<i>I. ricinus</i>		MFRYVVFLLIVSAVSCQRRKAVYKPCGGS-GKLIISVEVGP	CD-SDPCVFK		48
Allergène gr. 2 (<i>L. destructor</i>) ¹		MMKFIALFALVAVASAG--KMTFKDCG-H-GEVTELDITGCS-GDTCV	VIH		45
Allergène gr. 2 (<i>E. maynei</i>) ²		MYKILCLSLLVAAVAADQ--VDIKDCANH--EIKKVMVPGCKGSEPC	VIH		45
Allergène gr. 2 (<i>T. putrescent.</i>) ³		----ILFALVAVAAAGQVK---FTDCGKK--EIASVAVDGCE-GDLC	VIH		44
Allergène gr. 2 (<i>D. pteronyss.</i>) ⁴		MYKILCLSLLVAAVA--RDQVDVKDCANH--EIKKVLVPGCHGSEPC	IIH		47
Allergène gr. 2 (<i>D. farinae.</i>) ⁵		-----LLVAAVVADQVDV--KDCANN--EIKKVMVDGCHGSDPC	IIH		47
Prot. du lait EPV20 (bovin) ⁶		-FLTVAFLFLALSASALAEPVKFKDCGSWVGVIKEVNVSPCPTQLP	CKLH		49
Prot. Epididyme HE1 (homme) ⁷		-FLAATFLLLALSTAAQAEPVQFKDCGSVDGVIKEVNVSPCP-TQPC	QLS		49
				91	97
<i>I. ricinus</i>		MGTDAKIHVTMVADQSDTATLDRVVKVFGFQMPVPGIETDLCKGT	VECPV		99
Allergène gr. 2 (<i>L. destructor</i>)		RGEKMTLEAKFAANQDTAKVTIKVLAKVAGTTIQVPLETDGCK-F	IKCPV		95
Allergène gr. 2 (<i>E. maynei</i>)		RGTAFOLEAVFDANQNSNAKIEIKATIDGVEIDVPGIDNNLCH-F	MKCPV		96
Allergène gr. 2 (<i>T. putrescent.</i>)		KSKPVHVIAEFTANQDTCKIEVKVTGQLNGLEVPIPGIETDCK-V	LKCPV		94
Allergène gr. 2 (<i>D. pteronyss.</i>)		RGKPFQLEAVFEANQNTKTAKIEIKASIDGLEVDVPGIDTNACH-	YMKCPV		97
Allergène gr. 2 (<i>D. farinae.</i>)		RGKPFQLEAVFEANQNTKTAKIEIKASLDGLEVDVPGIDTNACH-	FMKCPV		97
Prot. du lait EPV20 (bovin)		RGQSYSVNVFTTSNTQSSKAVVHGIVMGIPVVPFPIPESDGCKSG	IRCPV		101
Prot. Epididyme HE1 (homme)		KGQSYSVNVFTTSNIQSSKAVVHGILMGVVPVFPPIPEPDGCKSG	INCPV		101
<i>I. ricinus</i>		RDGSTASPPSSLCPLS-			117
Allergène gr. 2 (<i>E. maynei</i>)		VK			98
Allergène gr. 2 (<i>D. pteronyss.</i>)		VK			99
Allergène gr. 2 (<i>D. farinae.</i>)		VK			99
Prot. du lait EPV20 (bovin)		EKD			104
Prot. Epididyme HE1 (homme)		QKD			104

Figure 21 : Alignements multiples des allergènes du groupe 2 de *Lepidoglyphus destructor*, *Euroglyphus maynei*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Dermatophagoides pteronyssimus*, *Dermatophagoides farinae*, et des protéines sécrétrices de l'épididyme chez le bovin et l'homme. La référence ici est la partie codante de l'insert C isolé chez *Ixodes ricinus*. Les sites les plus conservés sont indiqués en gras et les cystéines conservées sont indiquées d'un nombre.

¹ : Varela et al. (1994) (AN : CAA57160)

² : Smith et al. (1999) (AN : P25780)

³ : Eriksson et al. (1998) (AN : CAA73221)

⁴ : Chua et al. (1990) (AN : A60381)

⁵ : Trudinger et al. (1991) (AN : A61501)

⁶ : Larsen et al. (1997) (AN : P79345)

⁷ : Kirchhoff et al. (1996) (AN : Q15668)

III.3. Expression des protéines cystatine et allergène

La glutathion peroxydase n'a pas été exprimée car les études traitant de celui-ci sont très nombreuses et les fonctions ainsi que la localisation très bien définies. Il semblait donc que les gènes cystatine et allergène seraient plus intéressants au niveau des tiques.

III.3.1. Amplification des parties codantes

Les parties codantes ont été amplifiées par PCR à partir d'ADNc de tiques nourries 5 jours grâce aux amorces A start, A stop, C start, C stop décrits au tableau 3 du chapitre II.8. Ces fragments amplifiés (ne contenant pas la partie hydrophobe) ont une longueur de 349 pb (cystatine) et de 316 pb (allergène) (figure 22).

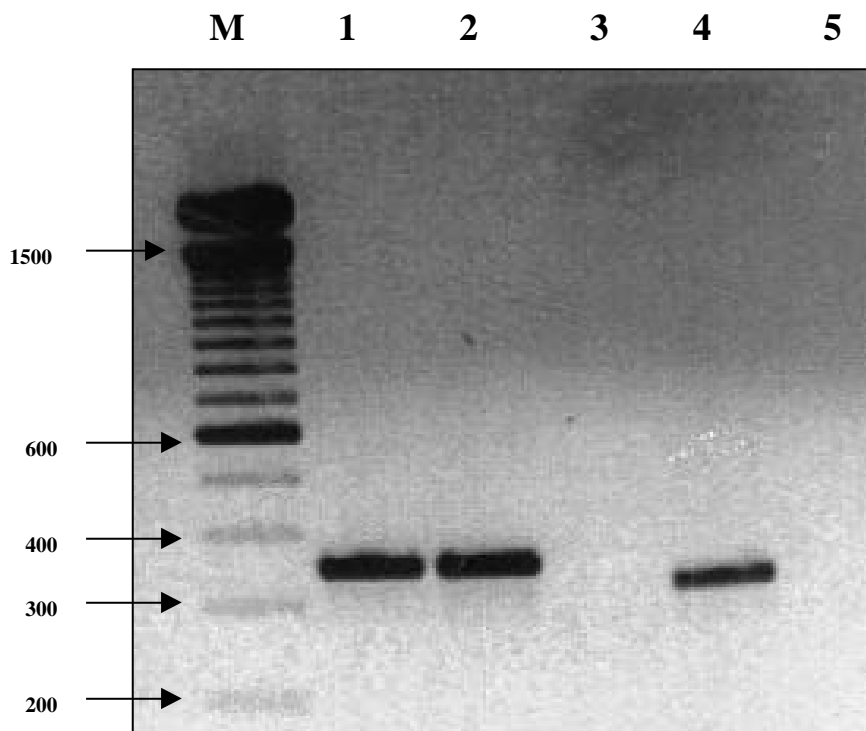


Figure 22 : Amplification par PCR des parties codantes (sans le peptide signal) des gènes cystatine et allergène. Ligne M : marqueur de poids moléculaire en paires de bases. Lignes 1 et 2 : partie codante du gène cystatine. Ligne 4 : partie codante du gène allergène. Lignes 3 et 5 : contrôles négatifs.

La vérification de l'insertion correcte de ces parties codantes a été réalisée grâce à l'isolement des plasmides pGEM-T et pGEX-2T par minipreps puis digestion enzymatique (photo non-montrée ici). Les tailles des inserts sur gel d'agarose correspondaient aux tailles des parties codantes. Le séquençage des plasmides a confirmé la ligation des inserts dans le sens juste.

III.3.2. Purification des protéines recombinantes

L'expression des gènes cystatine et allergène a été effectuée avec le plasmide pGEX-2T. L'induction à l'IPTG des cellules bactériennes transformées avec ce plasmide contenant la partie codante du gène cystatine a révélé un profil protéique (figure 23) avec une bande d'environ 42 kDa qui représente la protéine de fusion GST-cystatine (1). Cette bande est de plus en plus grosse au fur et à mesure que le temps d'induction augmente pour atteindre une taille maximale après 4 heures d'induction (dernière étape étudiée). Cette bande de 42 kDa est absente sur le profil protéique des cellules transformées non-induites (figure 23).

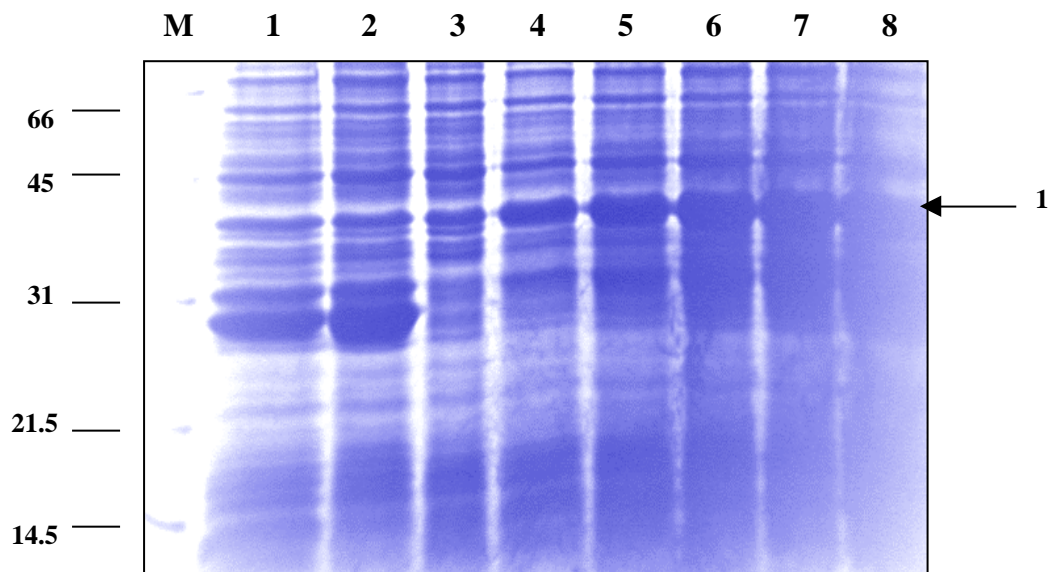


Figure 23 : Profil protéinique des bactéries transformées avec le plasmide pGEX-2T avec (cystatine) et sans insert sur un gel (SDS-PAGE) de 12 % d'acrylamide (5 x 8 cm). Ligne M : marqueur de poids moléculaires en kDa. Lignes 1 et 2 : protéines produites par des cellules bactériennes transformées (avec pGEX-2T sans insert) après induction à 1 'IPTG. Ligne 3 : protéines produites par des cellules bactériennes transformées (avec pGEX-2T contenant la partie codante de la cystatine) sans induction. Lignes 4 à 8 : après 30 min, 1, 2, 3, et 4 heures d'induction.

Une bande protéique d'environ 40 kDa représentant probablement la protéine de fusion GST-allergène (1) a été révélée sur le profil protéique (figure 24) des cellules bactériennes transformées avec le plasmide pGEX-2T (contenant la partie codante du gène allergène) après induction à l'IPTG. Là aussi, cette bande est maximale après 4 heures d'induction (dernière étape étudiée).

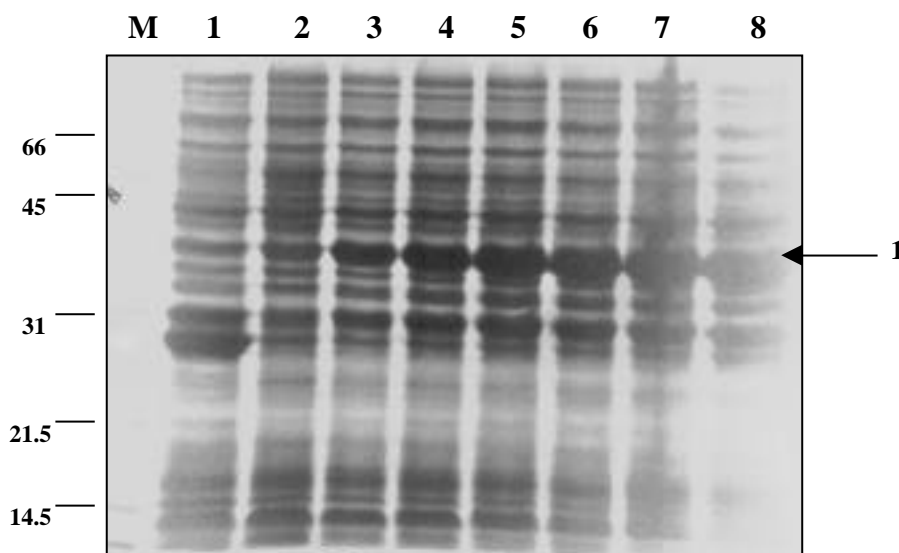


Figure 24 : Profil protéinique des bactéries transformées avec le plasmide pGEX-2T avec (allergène) et sans insert sur un gel (SDS-PAGE) de 12 % d'acrylamide (5 x 8 cm). Ligne M : marqueur de poids moléculaires en kDa. Ligne 1 : protéines produites par des cellules bactériennes transformées (avec pGEX-2T sans insert) après induction à l'IPTG. Ligne 2 : protéines produites par des cellules bactériennes transformées (avec pGEX-2T contenant la partie codante de l'allergène) sans induction. Lignes 3 à 8 : après 30 min, 1, 2, 3, et 4 heures d'induction.

La purification des deux protéines à l'aide des billes de glutathion agarose n'a pas réussi de même que la purification des corps d'inclusions (protéines insolubles). Les deux protéines de fusion ont donc été purifiées par une électro-élution, suivie par une digestion avec la thrombine dans le but d'éliminer la GST et d'obtenir les deux protéines cystatine et allergène pures.

Trois bandes ont été obtenues suite à la digestion de la GST-cystatine (figure 25 A) : une de forte intensité à 28 kDa représentant la GST seule, une de forte intensité aussi vers 14.5 kDa représentant la cystatine seule (poids moléculaire exact de 15 kDa, cf chapitre III.2.3) et une de plus faible intensité entre 37 et 42 kDa correspondant à un reste de protéine de fusion GST-cystatine non digérée ou/et à la thrombine, la bande étant trop floue pour exprimer un jugement précis.

Cent cinquante μ g de cystatine pure ont été récupérés par une dernière électro-élution (figure 25 B).

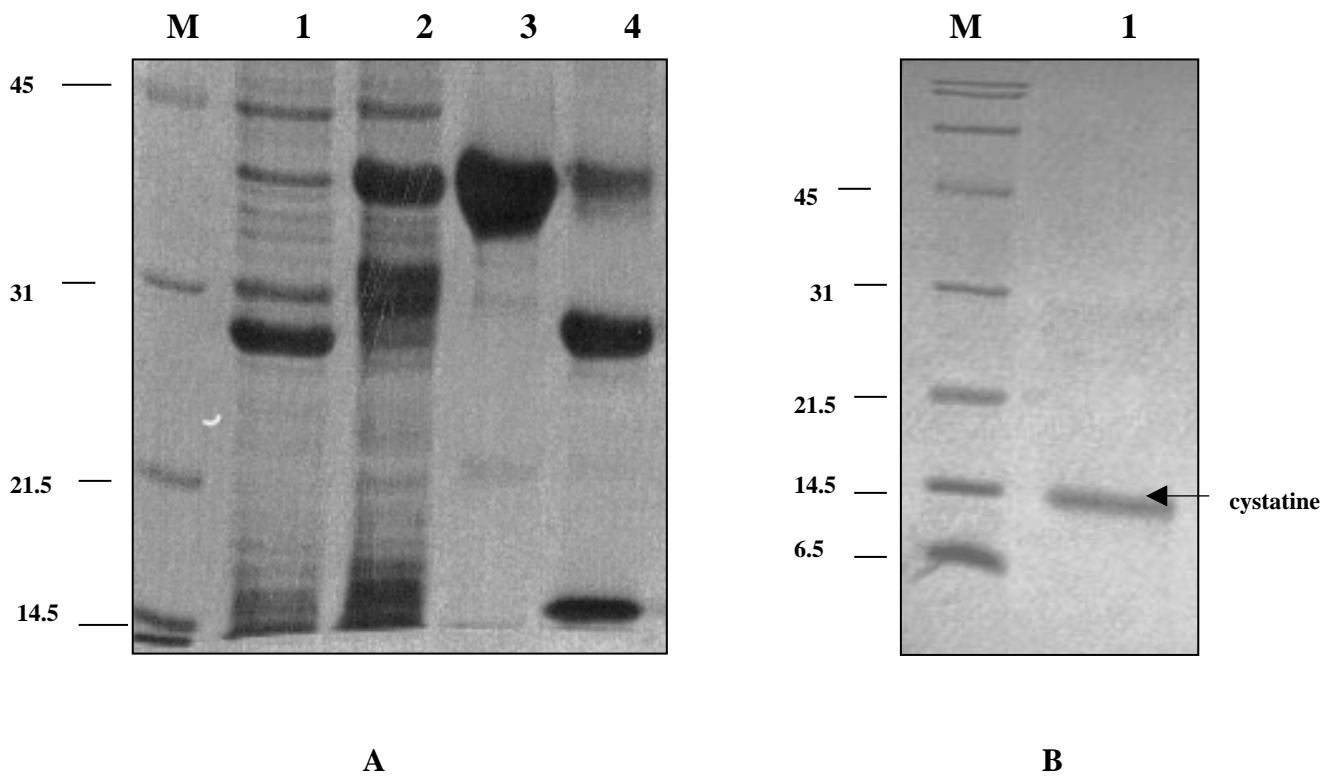
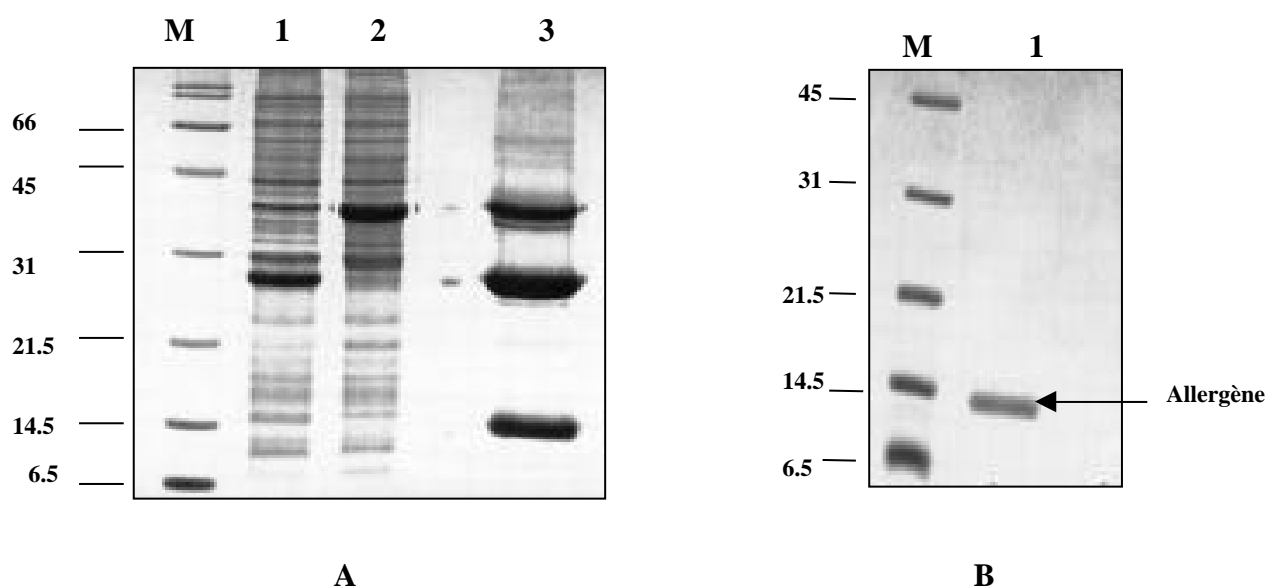


Figure 25 : **A :** Profil protéique de l'expression, la purification et la digestion de la protéine de fusion GST-cystatine sur un gel (SDS-PAGE) de 12 % d'acrylamide (5x8 cm). Ligne M : marqueur de poids moléculaires en kDa. Ligne 1 : protéines produites par des cellules bactériennes transformées avec pGEX 2T sans insert, après induction à l'IPTG. Ligne 2 : protéines produites par des cellules bactériennes transformées avec pGEX-2T contenant la partie exprimée du gène cystatine après induction à l'IPTG. Ligne 3 : protéine de fusion (GST-cystatine) purifiée non digérée. Ligne 4 : protéine de fusion (GST-cystatine) digérée partiellement avec la thrombine protéase : thrombine (37 kDa), GST (28 kDa), et cystatine : 14 kDa.

B : Profil protéique de la cystatine purifiée sur un gel (SDS-PAGE) de 15 % (5x8 cm). Ligne M : marqueur de poids moléculaires en kDa. Ligne 1 : cystatine purifiée.

Quatre bandes ont été obtenues suite à la digestion de la GST-allergène (figure 26 A) : une de forte intensité à 28 kDa représentant la GST seule, une de forte intensité aussi vers 14.5 kDa représentant l'allergène seul (poids moléculaire exact de 12.3 kDa, cf chapitre III.2.3.) et une de plus faible intensité vers 40 kDa correspondant à une partie de protéine de fusion GST-allergène non digérée, la dernière bande étant de faible intensité et correspondant à la thrombine (37 kDa). Deux cents µg d'allergène pur ont été récupérés par une dernière électro-élution (figure 26 B).



Figures 26 : A : Profil protéique de l'expression, la purification et la digestion de la protéine de fusion GST-allergène sur un gel (SDS-PAGE) de 15 % d'acrylamide (5x8 cm). Ligne M : marqueur de poids moléculaire en kDa. Ligne 1 : protéines produites par des cellules bactériennes transformées avec pGEX 2T sans insert, après induction à l'IPTG. Ligne 2 : protéines produites par des cellules bactériennes transformées avec pGEX 2T contenant la partie exprimée du gène allergène, après induction à l'IPTG. Ligne 3 : protéine de fusion (GST-allergène) digérée partiellement avec la thrombine protéase : thrombine (37 kDa), GST (28 kDa), et allergène: 14 kDa.

B : Profil protéique de l'allergène digéré purifié sur un gel (SDS-PAGE) de 15 % (5x8 cm). Ligne M : marqueur de poids moléculaires en kDa. Ligne 1 : allergène digéré purifié.

III.4. Caractérisation de la spécificité des anticorps produits contre la cystatine et l'allergène

L'immunisation des souris Balb/C avec 3 x 40 µg d'antigène (cystatine et allergène) a permis d'obtenir des anticorps à partir du 28^{ème} jour après la première injection. Il n'y a pas de différence d'intensité sur immunoblots entre les sérums (contenant les anticorps) récoltés lors du saignement de la souris au 42^{ème} jour, et au 28^{ème} jour (résultat non-montré ici).

Sur Western-blots (figure 27), le serum C réagit très fortement avec une bande vers 40 kDa correspondant à la protéine de fusion GST-allergène. Avec les bactéries (utilisées comme antigène) contenant la protéine de fusion GST-allergène digérée à la thrombine, une bande vers 14.5 kDa apparaît en plus, correspondant à l'allergène seul. Lorsque cette même protéine est isolée, il apparaît encore plus clairement cette bande de forte intensité vers 14.5 kDa. Une faible bande vers 28 kDa est également présente.

le sérum A réagit très fortement avec une bande vers 40 kDa correspondant à la protéine de fusion GST-cystatine. Avec la cystatine purifiée, les anticorps du sérum A réagissent avec cette dernière protéine formant une bande de forte intensité vers 14.5 kDa. Une faible bande vers 28 kDa est également présente.

Les sérums A et C reconnaissent également d'autres bandes sur les profils protéiques des bactéries induites (figure 27) mais aucune bande n'apparaît avec les bactéries non-induites. Les contrôles négatifs avec les sérums de souris avant injection des antigènes cystatine et allergène ne montrent également aucune bandes (figure 27).

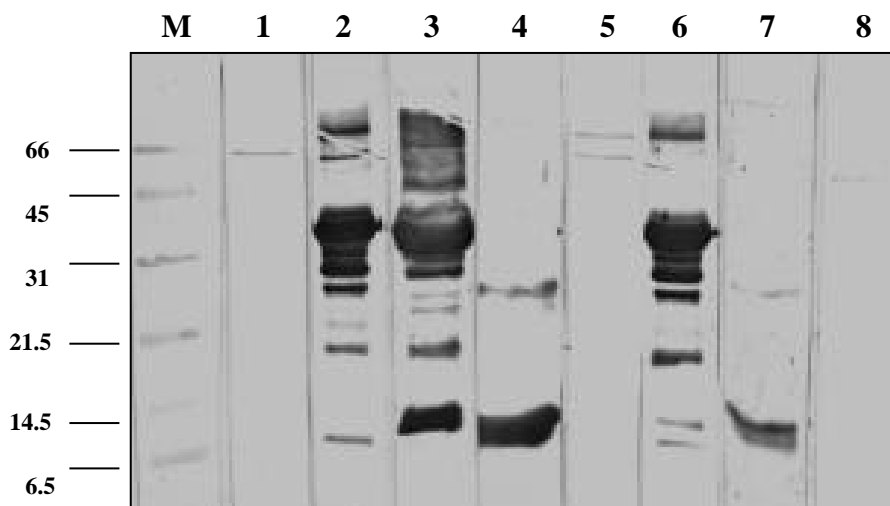


Figure 27 : Immunoblot sur un gel de 15 % d'acrylamide en utilisant les sérums de souris Balb/C immunisées avec la cystatine et l'allergène. Lignes 1 et 5 : contrôles avec les sérums de souris non immunisées. Lignes 2-4 : sérum C (récolté le 42^{ème} jour). Lignes 6-7 : sérum A (récolté le 42^{ème} jour). Ligne 8 : sérums A et C ensemble.

Ligne M : Marqueur de poids moléculaires en kDa. Lignes 1 et 2 : bactéries induites contenant la protéine de fusion GST-allergène. Ligne 3 : bactéries induites contenant la protéine de fusion GST-allergène digérée à la thrombine. Ligne 4 : allergène purifié. Ligne 5 et 6 : bactéries induites contenant la protéine de fusion GST-cystatine. Ligne 7 : cystatine purifiée. Ligne 8 : bactéries non-induites contenant les inserts GST-cystatine et GST-allergène (mélange des deux souches).

III.5. Cinétique de l'expression de la cystatine et de l'allergène durant le repas sanguin de la tique

Cystatine

Les anticorps anti-cystatine ont reconnu plusieurs bandes dans les hauts poids moléculaires (autour de 60 kDa et au dessus de 66 kDa) sur les profils protéiques des intestins des tiques partiellement gorgées entre 1 et 5 jours (utilisés comme antigènes) (figure 28). Une bande apparaît vers 14.5 kDa correspondant au poids de la cystatine (15 kDa) sur le profil protéique de l'intestin d'une tique partiellement gorgée pendant à 6 jours.

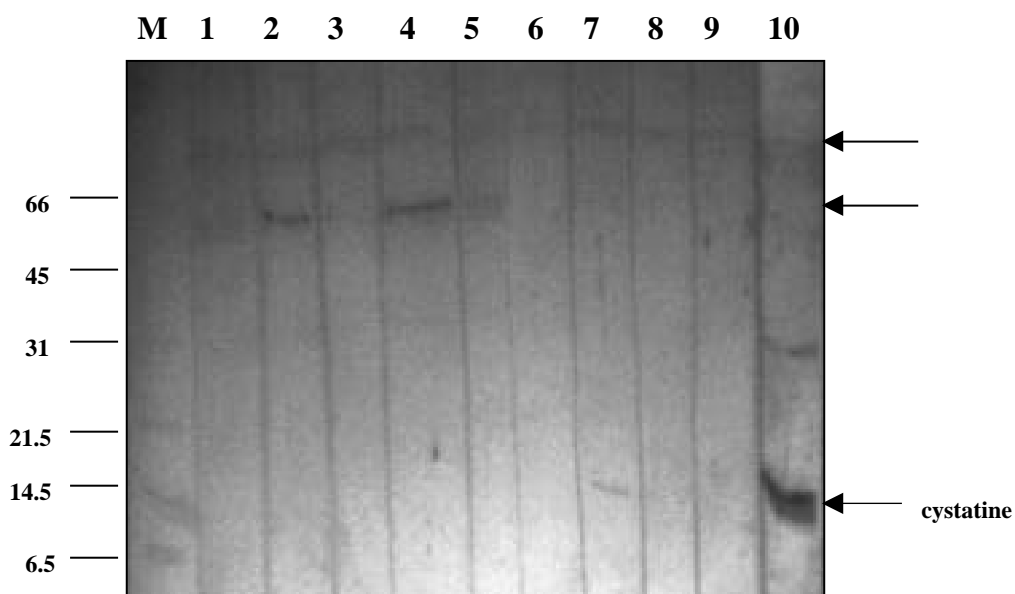


Figure 28 : Immunoblot sur un gel de 15 % en utilisant les sérums de souris Balb/C immunisées avec la cystatine. Ligne M : marqueur de poids moléculaires en kDa. Ligne 1 : intestins de tiques à jeun. Lignes 2-7 : intestins de tiques partiellement gorgées pendant 1, 2, 3, 4, 5 et 6 jours. Ligne 8 : intestin de tique gorgée pendant 7 jours (8 heures avant le drop off). Ligne 9 : sang de lapin. Ligne 10 : contrôle positif avec la cystatine purifiée.

Allergène

Les anticorps anti-allergènes ont reconnu des bandes de taille identique vers 14.5 kDa correspondant à l'allergène (de taille de 12.3 kDa, cf chapitre III.2.3.) avec comme antigènes des intestins de tiques partiellement gorgées aux cinq stades de 2 à 6 jours (figure 29). Ces bandes sont de plus faible intensité à 2 et 6 jours. Quelques bandes apparaissent dans les très hauts poids moléculaires.

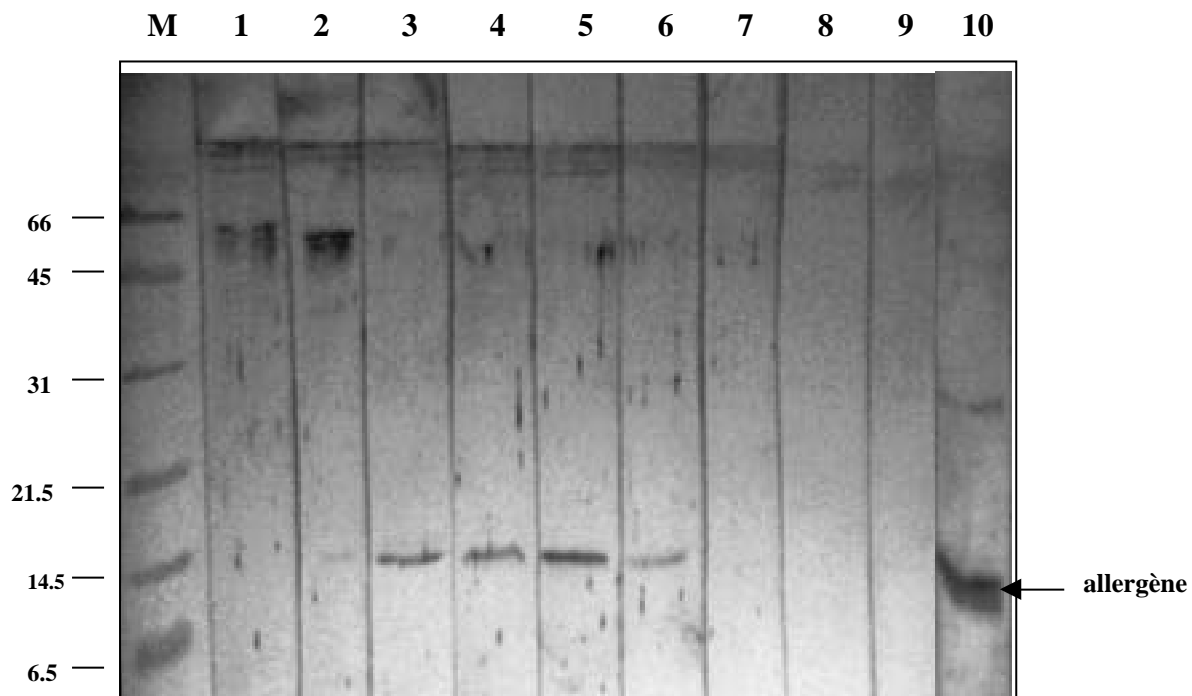
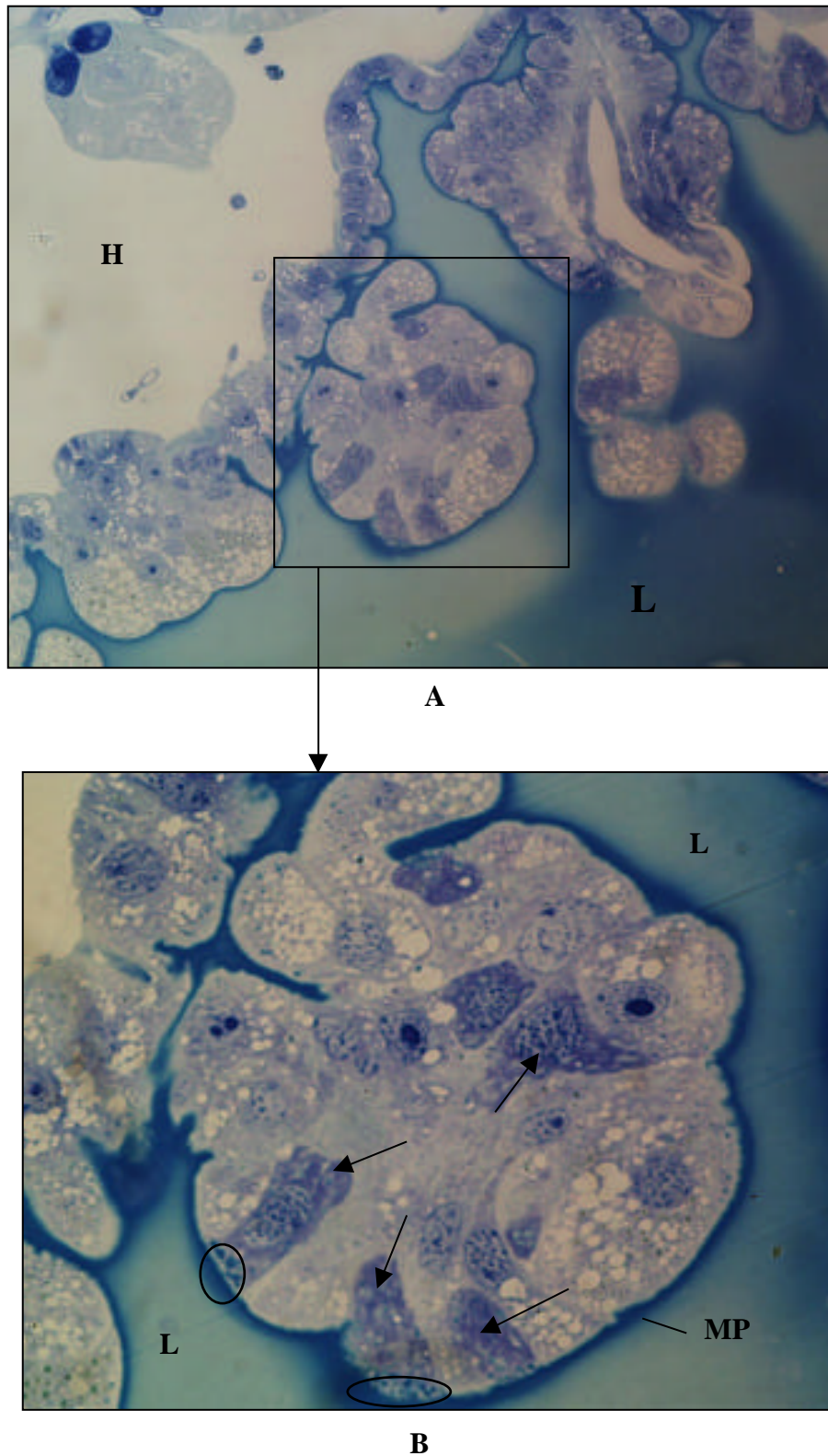


Figure 29 : Immunoblot sur un gel de 15 % en utilisant les sérums de souris Balb/C immunisées avec l'allergène. Ligne M : marqueur de poids moléculaire en kDa. Ligne 1-6 : intestins de tiques partiellement gorgées pendant 1, 2, 3, 4, 5 et 6 jours. Ligne 7 : intestin de tique gorgée pendant 7 jours (8 heures avant le drop off). Ligne 8 : sang de lapin. Ligne 9 : intestins de tiques à jeun. Ligne 10 : contrôle positif.

III.6. Localisation de la cystatine et de l'allergène dans l'intestin des tiques par immunocytochimie

Des coupes transversales d'intestins de femelles à jeun et gorgées après 1, 3, 5 et 6 jours ont été utilisées. Les intestins à jeun ont été employés comme contrôles. Des coupes d'intestins provenant de nymphes du laboratoire gorgées à 2 et 3 jours infectées par des borrelies ont également été réalisées. Sur une coupe transversale semi-fine colorée au bleu de toluidine (figures 30 A et B), la structure générale d'un intestin gorgé au jour 5 avec le microscope photonique sous deux agrandissements différents est présenté. Les différentes teintes rendent compte des différents types cellulaires ; ainsi, les cellules avec un cytoplasme plus violet sont les cellules sécrétrices, les autres étant en majorité les cellules digestives. Les cellules sécrétrices sont remplies de vésicules de sécrétion, qui sont d'une teinte bleue foncée et localisées à l'apex de la cellule (figure 30 B). La membrane péritrophique, tout proche de la surface de l'intestin, est d'une couleur bleu foncé par rapport au bleu plus clair de la lumière intestinale (figures 30 A et B). Un petit nombre de cellules, difficilement reconnaissable sur cette coupe (figure 30 B), représentent des cellules indifférenciées.

Sur une coupe fine provenant d'un autre intestin de tique partiellement gorgée (pendant 1 jour cette fois-ci), les différences entre les deux types de cellules sécrétrices et digestives sont visibles au microscope électronique (figure 31) . Les cellules digestives contiennent beaucoup de petites vésicules contenant de l'hémoglobine près de la surface au-dessous des microvillis. De l'autre côté de la lumière intestinale (au centre) se trouve une cellule sécrétrice avec de nombreuses vésicules destinées à être excrétées dans la lumière. Cette cellule est également très riche en réticulum endoplasmique granuleux et en appareils de Golgi. A noter encore que les sécrétions dans la lumière intestinale sont bien visibles sur cette coupe (figure 31).



Figures 30 : Coupe transversale d'un intestin d'*I. ricinus* femelle partiellement gorgée pendant 5 jours. (A) : 400 x
 (B) : 1000 x . L : lumière intestinale. MP : Membrane péritrophique. H : Hémolymphe.
 Les flèches noires indiquent les cellules sécrétrices. Les cercles noirs entourent les vésicules de sécrétion des cellules sécrétrices.

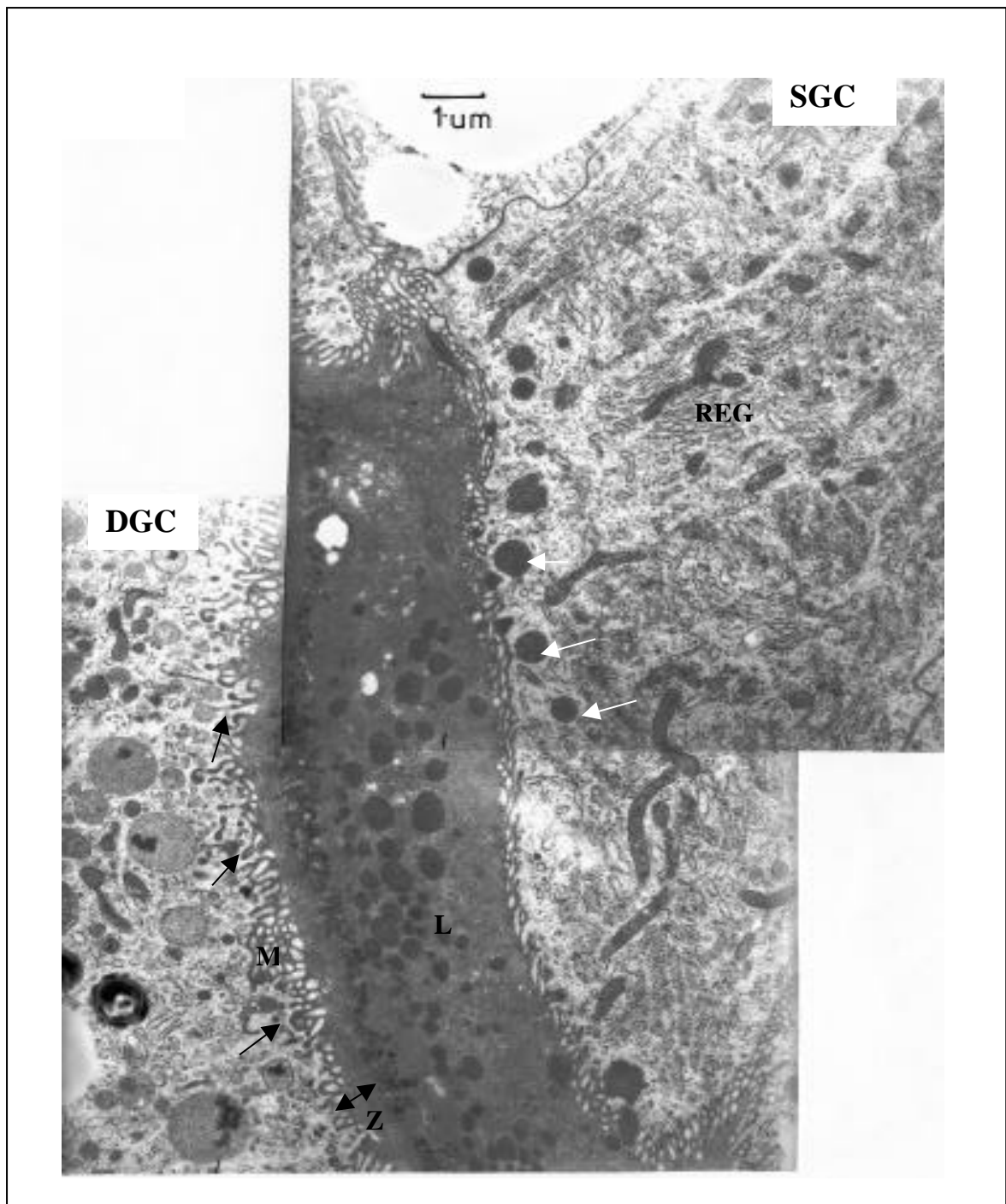


Figure 31 : Coupe transversale d'un intestin d'*I. ricinus* femelle partiellement gorgée pendant 1 jour. Les flèches montrent les vésicules d'endocytose et d'exocytose des cellules digestive et sécrétrice respectivement. DGC : cellule digestive. SGC : cellule sécrétrice. L : lumière intestinale contenant le repas sanguin. M : microvillis. REG : réticulum endoplasmique granuleux. Z : zone de formation de la membrane péritrophique, encore très mince à ce stade (difficilement observable à ce grossissement).

Cystatine

L'incubation de coupes transversales avec l'anticorps anti-cystatine a démontré la présence d'un marquage à tous les niveaux des cellules intestinales. La lumière intestinale, le cytoplasme des cellules aussi bien que des structures non différenciées sont recouvertes de grains d'or au stade 5 jours de gorgement (figure 32). Les grains d'or ont été également retrouvés sur une coupe d'intestin à jeun dans laquelle les noyaux des cellules réagissent fortement à l'anticorps anti-cystatine (figure 33).

Des coupes provenant d'intestins de nymphes du laboratoire partiellement gorgées pendant 2 à 3 jours et infectées par des spirochètes ont été incubées avec l'anticorps anti-cystatine pour observer si celui-ci se fixait à la surface des borrelies. Aucun résultat positif n'a été obtenu, les bactéries n'étant pas identifiables, voir absentes des coupes. Les contrôles négatifs des coupes incubées sans anticorps primaire anti-cystatine (mais avec l'AC secondaire marqué à l'or) ne contiennent aucun grain d'or.

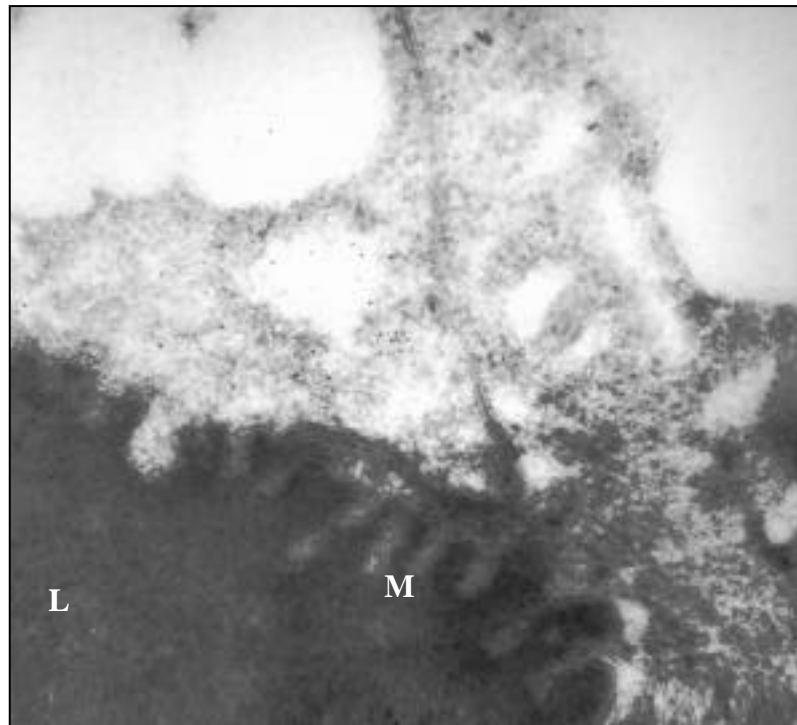


Figure 32 : Coupe transversale d'un intestin d'*I. ricinus* femelle partiellement gorgée pendant 5 jours. Agrandissement x 37800. Dilution de l'anticorps primaire anti-cystatine : 1/100. L : lumière contenant le repas sanguin. M : Microvillis. Les grains d'or ne sont distribués sur aucune surface précise.

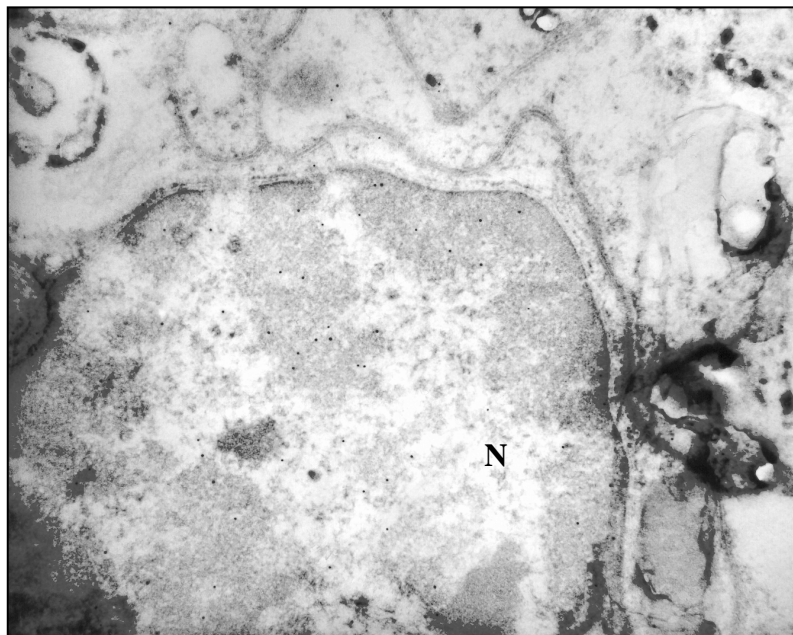


Figure 33 : Coupe transversale d'un intestin d'*I. ricinus* femelle à jeun. Photo au niveau d'une cellule intestinale. Agrandissement x 28350. Dilution de l'anticorps primaire anti-cystatine : 1/100. N : noyau contenant les grains d'or.

Allergène

L'incubation de coupes transversales avec l'anticorps anti-allergène a démontré la présence d'un marquage exclusif au niveau de certaines vésicules de sécrétions des cellules sécrétrices, depuis le jour 1 de gorgement jusqu'au jour 6. Les grains d'or sont en quantité plus faible aux stades 1 et 6 jours. Le contrôle négatif sans anticorps primaire anti-allergène ne contient aucun grain d'or (figure 34).

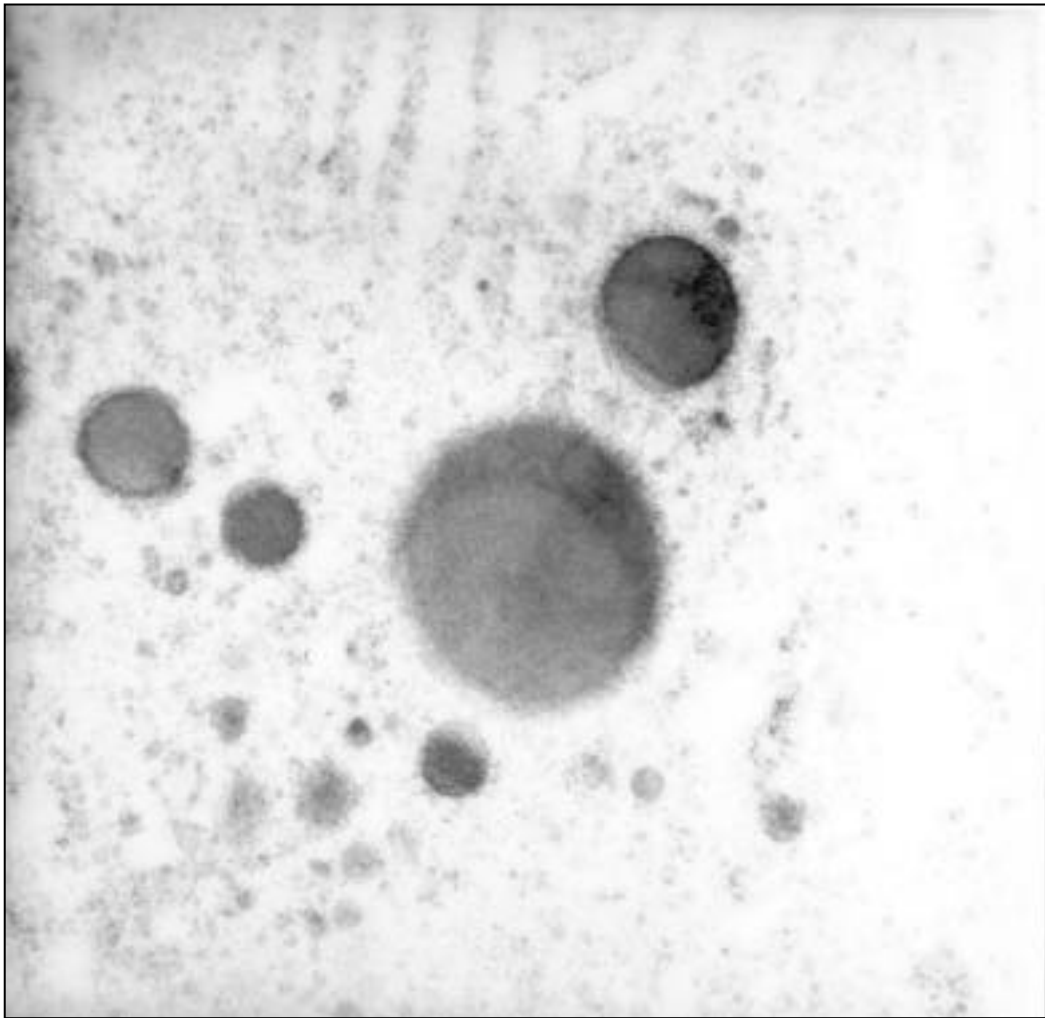


Figure 34 : Coupe transversale d'un intestin d'*I. ricinus* femelle partiellement gorgée pendant 3 jours au niveau d'une cellule sécrétrice. Agrandissement x 28350. Contrôle négatif sans anticorps primaire anti-allergène.

Jour 1 : seules les vésicules de sécrétions sont marquées à l'or, le cytoplasme de la cellule sécrétrice ainsi que la lumière intestinale ne contenant pas de grains d'or (figure 35).

Jour 3 : certaines petites vésicules de sécrétion ne sont pas marquées à l'or (figure 36) ; les grains d'or sont en assez grand nombre malgré la dilution assez grande de l'AC primaire (1/500). Les vésicules de sécrétion, lorsqu'elles fusionnent avec la membrane de la cellule avant d'être relâchées dans la lumière intestinale par exocytose, perdent leur marquage, seul 2 grains d'or étant encore présents dans celles-ci (figures 37 et 38). En outre, ces vésicules en exocytose montrent une teinte plus claire que les autres (figures 37 et 38). Le reste des cellules sécrétrices et les cellules digestives (figure 37) ne contiennent aucun marquage. La lumière intestinale, quant à elle, ne contient que quelques grains d'or isolés, à peine plus nombreux au voisinage des cellules en exocytose (figures 37 et 38).

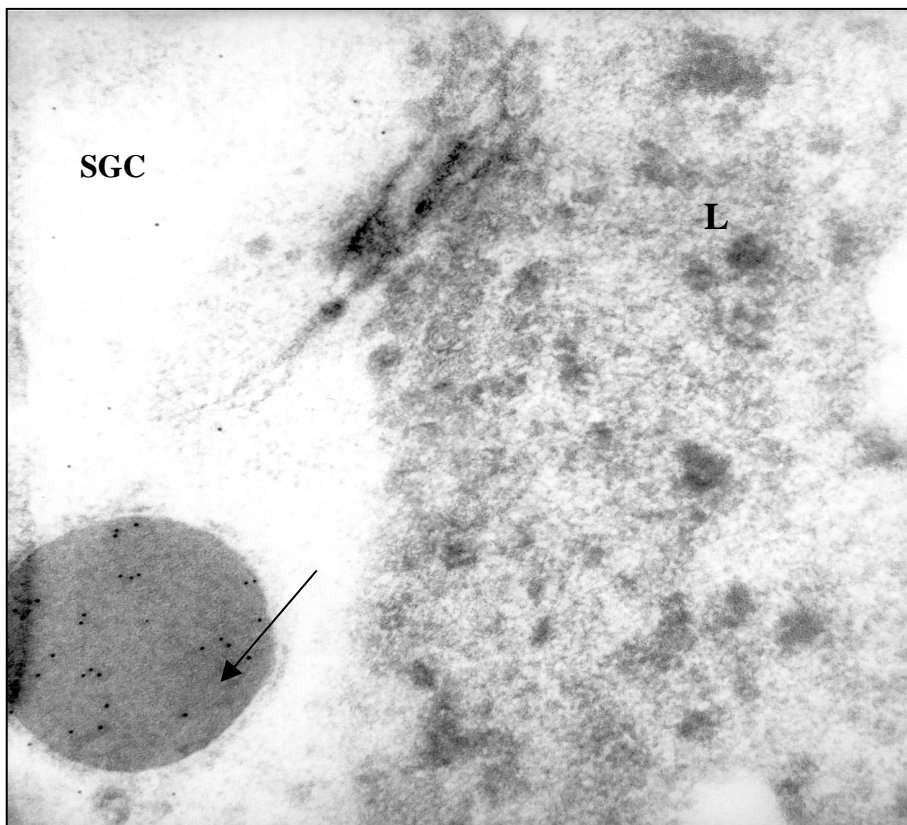


Figure 35 : Coupe transversale d'un intestin d'*I. ricinus* femelle partiellement gorgée pendant 1 jour au niveau d'une cellule sécrétrice. Agrandissement x 51750. Dilution de l'anticorps primaire anti-allergène : 1/100. La flèche indique les vésicules de sécrétion contenant les grains d'or. SGC : cellule sécrétrice. L : lumière.

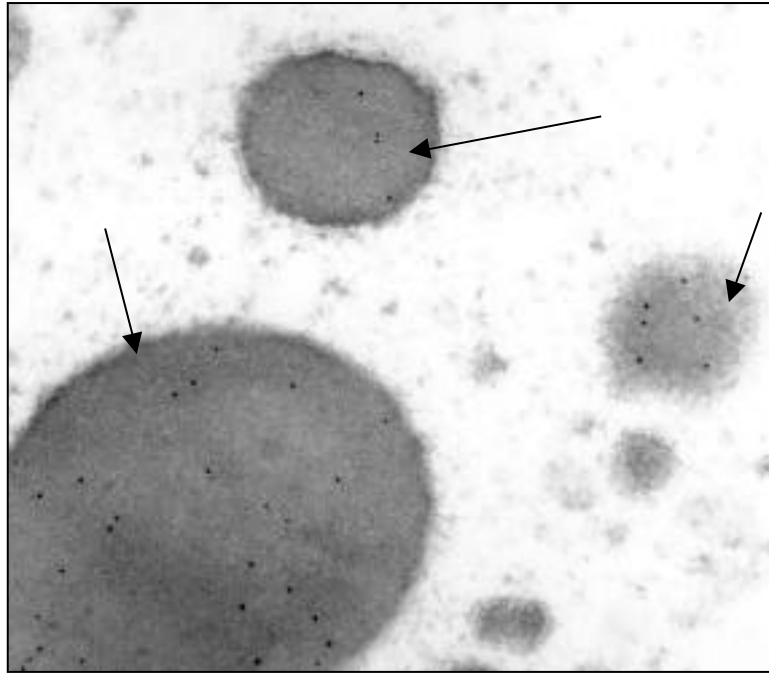


Figure 36 : Coupe transversale d'un intestin d'*I. ricinus* femelle partiellement gorgée pendant 3 jours au niveau d'une cellule sécrétrice. Agrandissement x 51750. Dilution de l'anticorps primaire anti-allergène : 1/500. Les flèches indiquent les vésicules de sécrétion contenant les grains d'or.

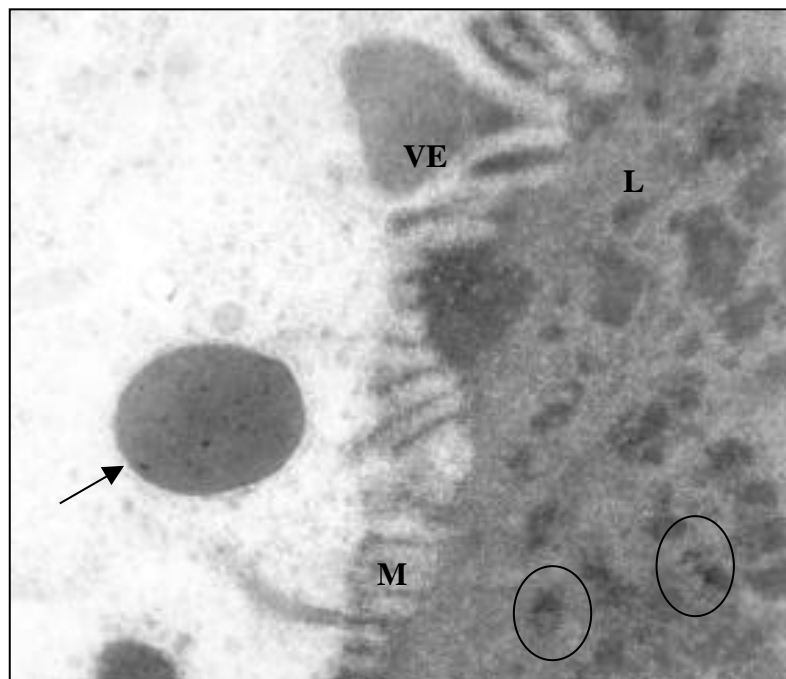


Figure 37 : Coupe transversale d'un intestin d'*I. ricinus* femelle partiellement gorgée pendant 3 jours au niveau d'une cellule sécrétrice. Agrandissement x 37800. Dilution de l'anticorps anti-allergène : 1/250. La flèche indique la vésicule de sécrétion contenant les grains d'or. Les cercles noirs entourent quelques grains d'or contenus dans la lumière intestinale. L : lumière. M : microvillus. VE : vésicules en fin d'exocytose.

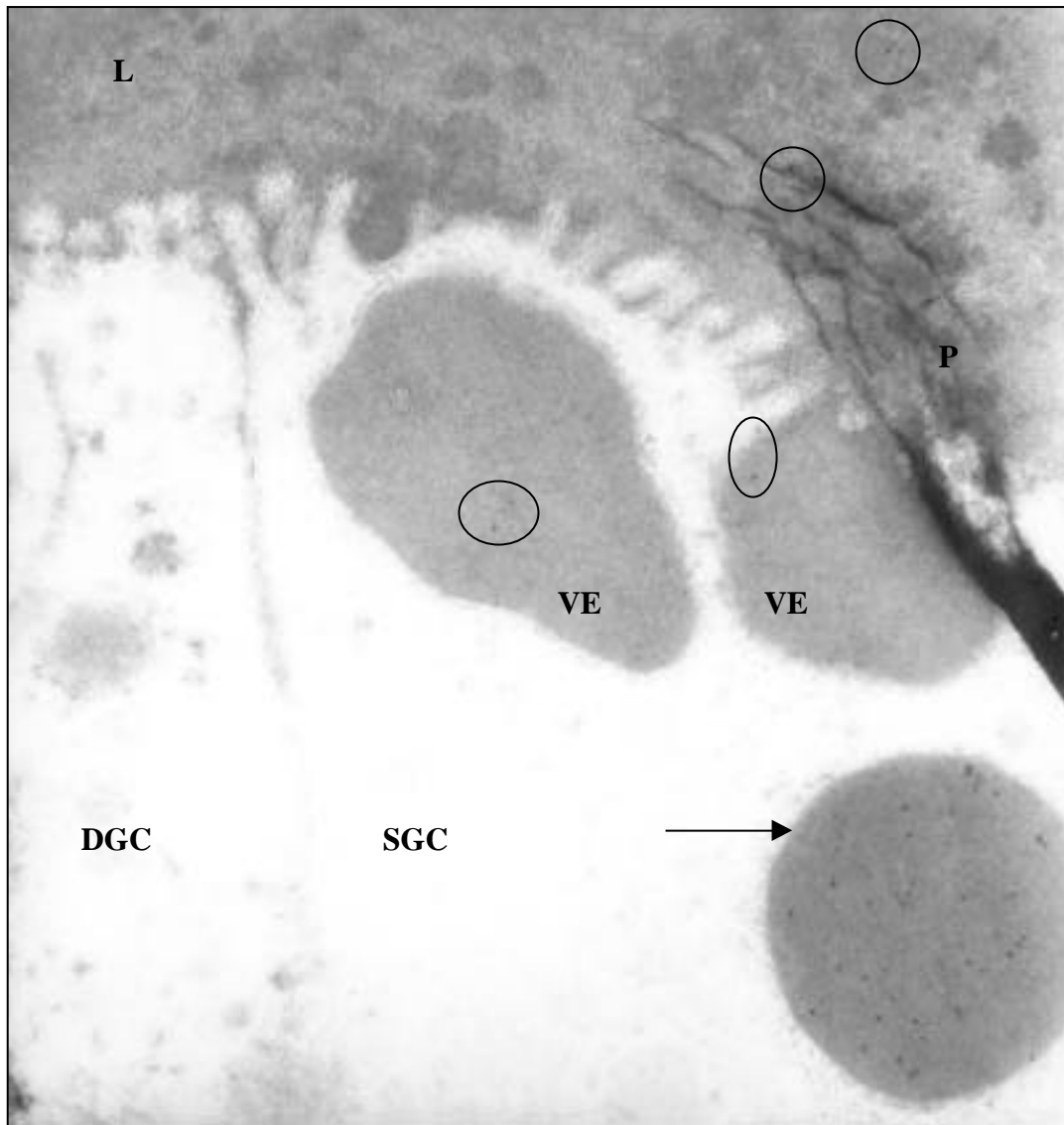
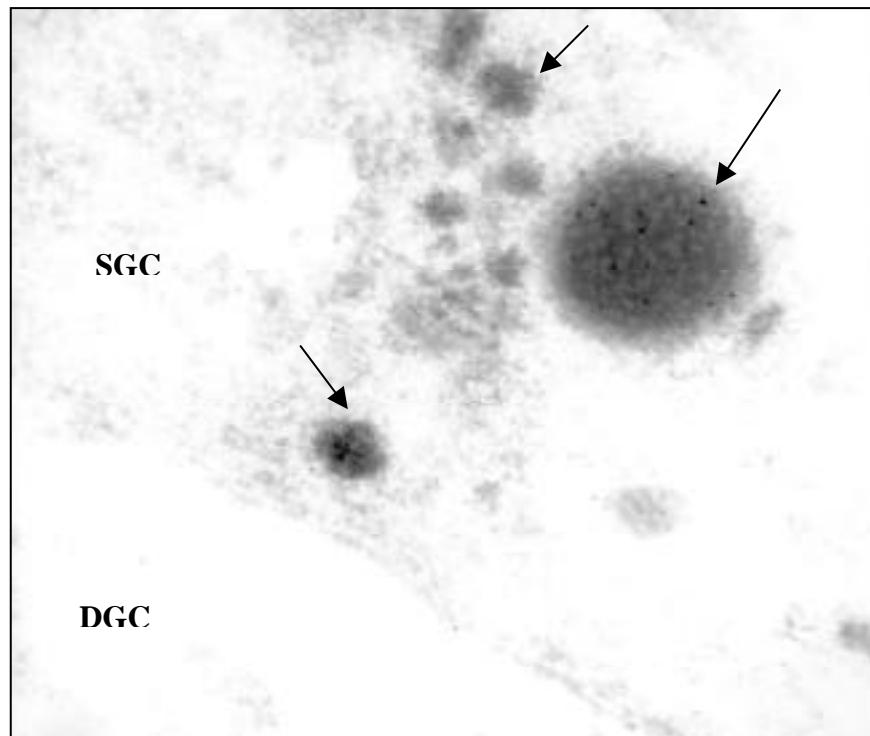
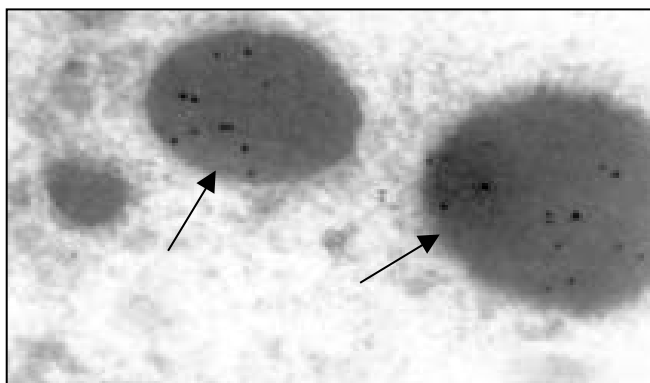


Figure 38 : Coupe transversale d'un intestin d'*I. ricinus* femelle partiellement gorgée pendant 3 jours. Agrandissement x 37800. Dilution de l'anticorps primaire anti-allergène : 1/100. La flèche indique la vésicule contenant les grains d'or. Les cercles noirs entourent quelques grains d'or contenus dans les vésicules d'exocytose et dans la lumière intestinale. DGC : cellule digestive. SGC : cellule sécrétrice. P : pli de la coupe. L : lumière de l'intestin contenant le repas sanguin. VE : vésicules en train d'être exocytosées.

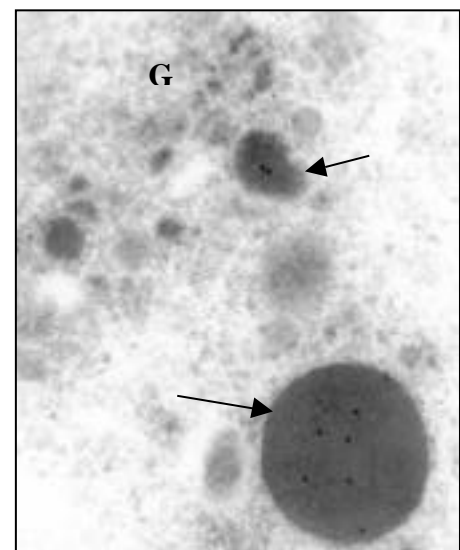
Jour 5 : Les vésicules de sécrétion montrent toujours un fort marquage (figures 39 A, B, et C), certaines n'étant pas marquées du tout. Les cellules digestives n'ont toujours aucun marquage (figure 39 A). L'appareil de Golgi est aussi marqué à l'or (figure 39 C).



A



B



C

Figures 39 A, B, C : Coupes transversales d'un intestin d'*I. ricinus* partiellement gorgée pendant 5 jours au niveau de cellules sécrétrices. Agrandissement x 51750 (A, B, C). Dilutions de l'anticorps primaire anti-allergène : 1/500 (A, B) 1/250 (C). Les flèches noires indiquent les vésicules de sécrétion marquées avec les grains d'or. SGC : cellule sécrétrice. DGC : cellule digestive. G : appareil de Golgi.

Jour 6 : Les vésicules de sécrétion contiennent moins de grains d'or qu'aux stades précédents, malgré la concentration de l'anticorps primaire plus grande (1/100). Le reste de la cellule, les microvillus, la membrane péritrophique et la lumière ne contiennent aucun marquage (figure 40).

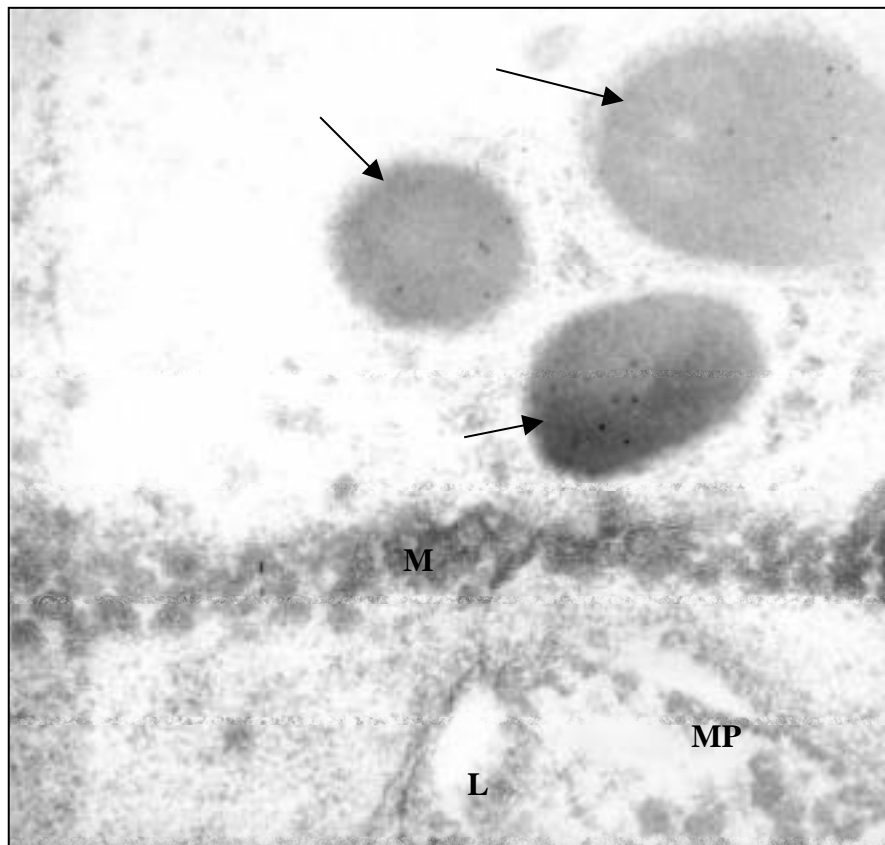


Figure 40 : Coupe transversale d'un intestin d'*I. ricinus* femelle partiellement gorgée pendant 6 jours au niveau d'une cellule sécrétrice. Agrandissement x 51750. dilution de l'anticorps anti-allergène : 1/100. Les flèches indiquent les vésicules de sécrétion contenant les grains d'or. M : microvillus. L : lumière intestinale. MP : membrane péritrophique.

Des coupes d'intestins gorgés à 2 et 3 jours provenant de nymphes du laboratoire infectées par des spirochètes ont été incubées avec l'anticorps anti-allergène pour observer si celui-ci se fixait à la surface des borrelies. Aucun résultat positif n'a été obtenu, les bactéries n'étant pas identifiables, voir absentes des coupes. Les contrôles négatifs des coupes incubées sans AC primaire anti-allergène (mais avec l'AC secondaire marqué à l'or) sont négatifs, sans aucuns grains d'or (photo non-montrée ici).

IV. Discussion

IV. 1. Préparation des tiques pour l'isolement de l'ARNm

Les tiques partiellement gorgées ont été récoltées 5 jours exactement après la mise sur oreilles de lapins. Ce stade a été utilisé pour l'isolement de gènes spécifiques car les tiques sont assez grosses à ce moment-là sans pour autant être en phase rapide de croissance, où l'intestin ne devient alors plus qu'un énorme « sac » rempli sang. De plus, toutes les différentes cellules intestinales sont présentes à ce stade-là et en activité (Diehl, comm. personnelle). Enfin, Baertschi (1998) avait obtenu de l'ARNm en quantité suffisante avec ce stade-là. Néanmoins, cette dénomination « gorgées 5 jours » doit être prise avec précaution. En effet, les oreilles des lapins n'ont pas été surveillées chaque jour pour tous les lots des tiques pour savoir si ces dernières s'étaient fixées dès le premier jour. Ceci peut donc un peu modifier les résultats. Lors des récoltes après 5 jours d'engorgement, certaines tiques étaient peut-être à 3 jours de gorgement seulement, en phase lente de croissance, alors que d'autres avaient peut-être déjà commencé leur phase rapide de croissance. Lors de la dissection de glandes salivaires provenant de femelles d'*I. scapularis* gorgées, Valenzuela et al. (2002) écrivent qu'ils ont probablement obtenu des gènes exprimés représentant un large spectre d'états physiologiques. En moyenne cependant, les tiques récoltées dans notre travail étaient de taille à peu près semblable, même si leurs poids n'ont pas été notés. Vers la fin de cette étude, un seul lot de tiques destiné à la microscopie électronique a été surveillé au cours du repas sanguin sur oreilles de lapin : après avoir mis les tiques le matin à 9 heures, l'après-midi à 14 heures tous les individus s'étaient fixés. Le stade récolté était donc bien 5 jours. Les tiques de ce lot correspondaient en moyenne au stade 5 jours utilisé au début de ce travail pour la constitution des banques et pour l'hybridation soustractive. Ces tiques avaient un poids moyen à ce stade 5 jours de 25-30 mg. Elles n'étaient probablement pas encore en phase rapide d'engorgement (Diehl, comm. personnelle) donc l'activité digestive était encore vraisemblablement bien présente, puisque celle-ci chute lors de la phase rapide d'engorgement (Akov, 1982 ; Coons et Alberti, 1999).

IV.2. Caractéristiques des banques d'ADNc

Des contaminations avec probablement de l'ADN génomique sont présentes après l'isolement direct d'ARNm provenant des tiques non-gorgées (2 bandes dans les très hauts poids moléculaires sur gel d'agarose). En raison du nombre très grand de tiques à jeun nécessaires à ce travail, nous avons néanmoins décidé de travailler avec ce matériel. Avec les tiques partiellement gorgées pendant 5 jours (dont le nombre nécessaire à la dissection est moins important), une étape intermédiaire comprenant l'isolement de l'ARN total avant l'ARNm a été ajoutée au protocole. Non seulement la pureté finale de l'ARNm obtenu a été augmentée, mais également la quantité. Ainsi, lors de la RDA, où seuls les gènes spécifiques aux tiques partiellement gorgées pendant 5 jours sont amplifiés, les contaminations contenues dans la population de tiques à jeun ne se retrouvent pas.

L'ARNm des deux populations de tiques est différent car il constitue des gènes exprimés spécifiques pour deux stades de vie de la tique. Ces 2 états physiologiques différents se reflètent au niveau de l'ADNc, le profil des tiques partiellement gorgées présentant 3 bandes de plus forte intensité, alors que celui des tiques à jeun est uniforme. Ces divergences se retrouveront ensuite dans la configuration du témoin et de la cible lors de la RDA.

Ces banques d'ADNc sont importantes car elles contiennent tous les gènes intestinaux exprimés chez les tiques à jeun et partiellement gorgées pendant 5 jours. Ces banques permettraient la recherche d'un gène spécifique en prenant des amorces dégénérées ou des sondes homologues à des parties conservées de gènes connus chez d'autres organismes que les tiques. Il suffit d'isoler le clone contenu dans l'une ou l'autre des banques sur lequel la sonde se lie. Plusieurs auteurs ont travaillé de cette manière en passant au crible une banque d'ADNc de tique (complète ou provenant

des glandes salivaires) avec des amorces ou sondes homologues. Ainsi, des gènes codant pour des substances comme une cathepsine L (Renard et al., 2000), sérine protéase (Mulenga et al., 2001), peroxyredoxine (Tsuji et al., 2001), nucléotidase (Liyou et al. ; 1999; 2000), protéine anticoagulante (Joubert, 1998), lipocaline (Sangamnatdej, 2002) et défensine antibactérienne (Nakajima et al., 2001) notamment, ont été découverts. Mais avec cette technique, des gènes exprimés se trouvant également chez les tiques à jeun pouvaient être obtenus. C'est ce qui est arrivé avec les enzymes peroxyredoxine (Tsuji et al., 2001), nucléotidase (Liyou et al., 1999 ; 2000), lipocaline (Sangamnatdej et al., 2002) et défensine (Nakajima et al., 2001) notamment, qui se retrouvent chez les tiques à jeun. Cette technique de criblage de banque par une sonde ou amorces homologues n'a pas été réalisée dans cette étude, car nous voulions obtenir plusieurs gènes impliqués dans la physiologie de la digestion (et pas uniquement un gène comme c'est le cas avec le criblage d'une banque à l'aide d'une sonde). De plus, concernant la membrane péritrophique par exemple, des amorces homologues n'ont pas pu être fabriquées pour analyser les banques car les séquences des péritrophines formant la membrane péritrophique sont très peu conservées ; même entre espèces proches, de grandes différences sont présentes (Tellam et al., 1999). La méthode utilisée ici a été donc l'analyse aléatoire de plusieurs clones contenus dans la banque des tiques partiellement gorgées pendant 5 jours. Ainsi, 17 clones sélectionnés au hasard (nous avons mis fin au séquençage aléatoire après le 17^{ème} clone) parmi la banque d'ADNc de tiques gorgées des sous-populations 1 (1100-2000 pb) et 2 (750-1110 pb) ont été analysés. Très peu d'homologies significatives ont été obtenues, la majorité étant des séquences inconnues, dont l'implication dans la digestion n'était pas même certaine. Seul une séquence isolée a montré une très grande homologie avec une cathepsine L décrite chez les tiques *H. longicornis* (Mulenga et al., 1999b) et *B. microplus* (Renard et al., 2000) ainsi que chez divers crustacés. Presque 90 % des séquences nucléotidiques sont identiques ! Cette enzyme est donc une cystéine protéase, enzyme lysosomale protéolytique par excellence (Sajid et McKerrow, 2002). Ce résultat n'est pas un hasard, car l'enzyme digestive la plus décrite chez les tiques est une autre cathepsine, la cathepsine D (Akov, 1982). Cette dernière est tout de même différente, car elle fait partie du groupe des aspartique protéases. Les fonctions physiologiques des cathepsines L sont multiples chez les parasites : dégradation de matrice extracellulaire des structures de l'hôte pour la pénétration des parasites (Rhoads et Fetterer, 1996 ; Keene et al., 1986 ; Luaces et Barrett, 1988), implication dans les processus de mue (Lustigman et al., 1996), hydrolyse des immunoglobulines et du système complément de l'hôte (Renard et al., 2000), hydrolyse de l'hémoglobine via une cascade de protéases (Renard et al., 2002 ; Sajid et McKerrow, 2002). Mulenga et al. (1999b) sur *H. longicornis*, et Renard et al. (2000a) sur *B. microplus* ont isolé et cloné des gènes codant pour une cathepsine L. Les fonctions de cette enzyme chez ces espèces de tiques restent cependant assez floues ; Renard et al. (2000) ont néanmoins démontré *in vitro* une hydrolyse de l'hémoglobine de bovin par cette cathepsine L à pH 3.5 seulement, ce qui impliquerait une action intralysosomale, car le pH de la lumière intestinale est de 6.5 (Bogin et Hadani, 1973; cf chapitre I.3.3). Pourtant, ces auteurs ont démontré la présence d'un peptide signal au niveau de la partie codante du gène, ce qui prouverait que cette enzyme est sécrétée. De plus, Renard et al. (2002) ont observé la présence de cette cathepsine au niveau des cellules sécrétrices de l'intestin des femelles gorgées ; ces auteurs en concluent que cette enzyme interviendrait dans la digestion de l'hémoglobine dans la lumière intestinale.

Il est donc difficile de discerner le rôle exact de cette cathepsine L chez *I. ricinus*. Une cathepsine L a aussi été isolée chez la punaise hématophage *Rhodnius prolixus* (Lopez-Ordóñez et al., 2001), chez les stades partiellement gorgés et à jeun. Celle-ci se trouve uniquement dans l'intestin, ce qui fait proposer aux auteurs une fonction dans la digestion de sang. La fonction de cette enzyme pourrait être la même chez les tiques. Néanmoins, l'ARNm codant pour cette cathepsine chez *B. microplus* a été localisé dans les larves à jeun déjà (Renard et al., 2000 ; 2002), ce qui prouverait que cette enzyme n'est pas spécifique aux tiques gorgées.

IV.3. Gènes spécifiques aux tiques gorgées

Pour obtenir les gènes spécifiques aux tiques gorgées, une technique d'hybridation soustractive a été utilisée pour éliminer tous les gènes communs aux 2 états physiologiques des tiques. En consultant la littérature, la majorité des auteurs ayant travaillé sur les gènes codant pour des molécules impliquées dans la physiologie des tiques n'ont pas appliqué une telle technique. Les auteurs ayant travaillé de manière soustractive pour isoler des gènes spécifiques aux tiques gorgées sont Bior et al. (2002), Weiss et al. (2002), et Leboulle et al. (2002a).

IV.3.1. Fragments obtenus par RDA

La RDA est une technique avec de nombreuses étapes, mais qui a donné de bons résultats avec les travaux de Hubank et Schatz (1994) sur deux populations de lymphocytes B, Bowler et al. (1999) sur deux populations de bactéries, Groot et van Oost (1998) sur deux populations de nématodes parasites, ou encore Soubes et al. (1999) sur deux clones de *Plasmodium falciparum*. Seuls Leboulle et al. (2002a) ont appliqué cette technique à une étude sur les tiques (glandes salivaires d'*Ixodes ricinus*) pour identifier les gènes exprimés durant le repas sanguin. Cette technique de RDA, au contraire de la DD (differential Display) RT-PCR - une autre méthode moléculaire pour identifier des gènes différentiellement exprimés dans deux populations - évite le problème de la récupération de « faux positifs » et évite une longue et difficile analyse de tous les produits obtenus sur gel d'agarose dont la plupart sont inintéressants (Hubank et Schatz, 1994)

Dans notre travail sur *I. ricinus*, la RDA a permis d'isoler plusieurs fragments de gènes spécifiques impliqués dans la physiologie de la digestion de sang chez les tiques partiellement gorgées pendant 5 jours. L'ADNc digéré et amplifié est différent chez les tiques gorgées (cible, plusieurs bandes) par rapport aux tiques non-gorgées (témoin, pas de bandes claires), reflet des différences sur les profils d'ADNc après RT-PCR. Avec le deuxième produit soustractif (DP2), 6 fragments de gènes ont été obtenus ; après le 3^{ème} round d'hybridation (DP3), 2 fragments ont disparu (qui étaient bien aspécifiques car en prenant de l'ADNc de tiques à jeun ces 2 fragments ont été amplifiés par PCR) pour n'obtenir finalement plus que 4 fragments. Ceux-ci sont finalement 3 gènes, le gène A étant formé de deux fragments (fragment A de 250 pb et fragment D de 132 pb) constituant le DP3. La RDA est donc une bonne technique, mais il est nécessaire néanmoins de faire 3 rounds d'hybridation soustractive pour bien écarter les gènes communs aux deux populations de tiques, partiellement gorgées et non-gorgées. Groot et Van Oost (1998) écrivent aussi que le DP2 contient trop de matériels aspécifiques, qu'il faut donc passer par le DP3.

Malgré tout, peu de gènes (3 !) spécifiques aux tiques gorgées ont été obtenus ; pourtant, les deux états physiologiques des tiques sont radicalement différents. D'ailleurs, Leboulle et al. (2002a), qui ont aussi utilisé la RDA, n'ont pas eu ce problème en obtenant 27 séquences différentes provenant des glandes salivaires d'*I. ricinus* partiellement gorgées pendant 5 jours. Beaucoup plus de gènes exprimés dans l'intestin durant le repas sanguin devraient donc être présents, notamment des gènes impliqués dans la constitution de la membrane péritrophique et/ou dans la digestion des protéines sanguines (enzymes protéolytiques). Par exemple, le gène codant pour une cathepsine L isolée en analysant au hasard quelques clones présents dans la banque de tiques gorgées n'a pas été retrouvé, comme déjà mentionné au chapitre précédent. Cette restriction dans le nombre de gènes spécifiques obtenus peut s'expliquer par plusieurs phénomènes :

- 1) De l'ARNm préformé pourrait être présent dans les tiques à jeun. Cet ARNm serait donc éliminé par RDA, puisqu'il serait commun aux 2 populations. Agyei et al. (1992) ont démontré

qu'il y a très peu d'ARNm dans les tiques à jeun, mais même en très petites quantités, celui-ci peut faire disparaître ce même ARNm présent lui en grande quantité chez les tiques gorgées lors des 3 rounds d'hybridation de la RDA.

Oaks et al. (1991) ont montré que dans les glandes salivaires de tiques, la synthèse d'ARNm augmente durant le repas sanguin sans qu'il n'y ait d'activation de nouveaux gènes. De l'ARNm codant pour la protéine lipocaline et l'enzyme peroxyredoxine a également été observé chez les tiques à jeun déjà, la quantité d'ARNm augmentant grandement chez les tiques au cours du repas sanguin (Sangamnatdej et al., 2002 ; Tsuji et al., 2001). Mulenga et al. (1999a) et Akov (1976) ont également trouvé des enzymes protéolytiques identiques chez les tiques gorgées et à jeun, ces enzymes augmentant simplement en concentration chez les tiques gorgées. Les enzymes protéolytiques présentes intracellulairement dans les lysosomes comme les cathepsines L, B ou D sans peptide signal (Sajid et McKerrow, 2002) doivent donc se retrouver aussi dans les tiques à jeun. En effet, les tiques nymphes et adultes non-gorgées ont encore dans leur épithélium intestinal des endosomes contenant des restes de repas sanguin du stade précédent qui servent à la tique de réserve de nourriture (Coons et Alberti, 1999 ; Tarnowski et Coons, 1989). Ces endosomes doivent certainement fusionner avec des lysosomes pour digérer le contenu des endosomes, processus nécessaire à la tique pendant les périodes de jeûne prolongé. Jaworski et al. (1983) ont montré que la quantité de lipides augmente pendant que la quantité d'endosomes diminue chez les tiques à jeun, preuve d'une digestion. Donc des enzymes digestifs plutôt intracellulaires doivent également être présents sous forme d'ARNm chez les tiques à jeun. Diehl et Vlimant (non-publié) ont également observé la présence d'hémoglobine dans des endosomes chez les tiques 12 mois après le repas sanguin, hémoglobine qui serait disponible pour être digérée par des enzymes protéolytiques lysosomales pendant la phase entre deux repas sanguins de la tique.

Les constituants de la membrane péritrophique, sécrétés très rapidement dès le tout début du repas sanguin (Diehl, comm. personnelle), pourraient être déjà présents sous la forme d'ARNm préformé chez les tiques non-gorgées.

Tous les gènes codant pour des enzymes protéolytiques ou des constituants de la membrane péritrophique déjà présents chez les tiques à jeun ont donc été éliminés par hybridation soustractive lors de la RDA et n'ont pas pu être détectés. C'est le cas notamment de la cathepsine L isolée à partir de la banque d'ADNc de tiques partiellement gorgée pendant 5 jours. Cette enzyme (ou du moins l'ARNm codant pour elle) est donc sûrement présente chez les tiques à jeun également, ce qui est en accord avec les résultats de Renard et al. (2000) sur *B. microplus* et Lopez-Ordóñez et al. (2001) sur *R. prolixus*.

- 2) L'enzyme de restriction Dpn II utilisée pour digérer préalablement l'ADNc des tiques gorgées et à jeun ne serait pas très appropriée. En effet, il est possible que certains gènes des tiques gorgées ne contiennent pas de site DpnII ; ces gènes seraient alors perdus lors des amplifications par PCR pour générer la cible et par la suite les produits soustractifs. Soubes et al. (1999) ont d'ailleurs aussi eu ce problème d'un faible nombre de gènes obtenus avec le DP3. Bowler et al. (1999) et Soubes et al. (1999) suggèrent d'ailleurs qu'il faudrait utiliser plusieurs enzymes de restriction qui coupent fréquemment pour obtenir tous les gènes différenciellement exprimés.
- 3) Le stade des tiques étudiées n'était peut-être pas trop approprié. En effet, après 5 jours d'engorgement, même si toutes les différentes cellules intestinales ont l'air d'être en activité après observation au microscope électronique (Diehl, comm. personnelle), certains gènes ne sont peut-être plus exprimés. En effet, d'après Bogin et Hadani (1973), l'activité des enzymes protéolytiques chez *H. excavatum* atteint un pic maximal 60-72 heures après l'attachement des tiques, puis ne cesse ensuite de diminuer. Donc certains gènes codant pour des enzymes ne seraient peut-être exprimés que pendant les 2-3 premiers jours et plus ensuite chez *I. ricinus*.

- 4) La qualité de l'ARNm de départ pourrait influencer les résultats. En effet, vu que les deux populations d'ARNm n'étaient pas de puretés identiques (la cible étant plus pure que le témoin), certains ADNc ont pu être perdus pendant la RDA. Hubank et Schatz (1999) conseillent d'ailleurs de travailler avec deux populations de départ identiques. Cependant, si des gènes provenant des tiques à jeun n'ont pas été récupérés (dû à l'isolement direct de l'ARNm sans passer par l'ARN total), cela n'empêche pas l'amplification et l'obtention des gènes spécifiques aux tiques partiellement gorgées pendant 5 jours.

IV.3.2. Identification des gènes soustractifs isolés par RACE

Grâce à la technique de RACE qui permet d'obtenir les parties manquantes de fragments de gènes après amplification à l'aide d'amorces spécifiques, 3 gènes complets ont pu être caractérisés. Cette technique a très bien fonctionné, avec souvent de belles bandes bien nettes lors du second tour d'amplification avec les amorces GSP2 et Q_I. L'orientation de l'ADN dans le sens juste avant les amplifications est l'étape primordiale pour garantir une séquence correcte. Le fragment D obtenu par RDA a été laissé de côté en raison de son absence d'homologies avec des gènes connus. Trois inserts entiers spécifiques aux tiques partiellement gorgées pendant 5 jours ont donc été obtenus : insert A de 875 pb, insert B de 914 pb, et insert C de 717 pb. Deux de ces inserts (A et C) correspondraient à peu près à deux (650 pb et 800 pb) des trois bandes obtenues par RT-PCR à partir d'ARNm de tiques partiellement gorgées pendant 5 jours. La troisième bande sur gel d'agarose (500pb) représente apparemment un autre gène, présent sûrement aussi chez les tiques à jeun (puisqu'il a été éliminé par RDA) mais en nombre plus faible de copies, puisque cette bande de 500 pb ne se démarque pas sur le profil d'ADNc des tiques à jeun.

L'**insert A** code sans aucun doute pour une protéine inhibitrice de la famille des **cystatines** au sens strict. Cette protéine *d'I. ricinus* fait partie des cystatines du groupe II, car la majorité des cystatines (C, D, S) obtenues suite à la recherche d'homologie par BLASTP appartiennent à ce groupe (Ni et al., 1998). Le pourcentage d'homologie de 30 % en moyenne est bas, mais plusieurs domaines communs aux cystatines se retrouvent. En effet, il y a 4 résidus cystéines bien conservés formant les deux ponts disulfures (localisés du côté C-terminal) typiques des cystatines (Turk et Bode, 1991). Le pont disulfure en position ⁸³cys-cys¹⁰⁶ est probablement important pour maintenir la conformation de la cystatine lors de la liaison à la protéine cible (Bjork et Ylinenjarvi, 1992). De plus, la partie conservée classique des cystatines constituée de plusieurs acides aminés (QxVxGx ; Turk et Bode, 1991) se retrouve également en positions 65 à 70. Le poids moléculaire d'environ 13-14 kDa ainsi que le nombre moyen d'acides aminés des cystatines (120 ; Turk et Bode, 1991), correspondent bien à ce que l'on a obtenu (133 aa pour un poids de 15 kD). Malgré une partie de séquence similaire au kininogène, cette cystatine obtenue ne peut pas faire partie de cette famille car son poids moléculaire est beaucoup trop bas par rapport au poids moyen des autres kininogènes (env. 68 kD pour le LMW et 120 kDa pour le HMW ; Turk et Bode, 1991).

L'**insert B** montre de très grandes homologies avec plusieurs **glutathion peroxydases** (GPx) et hydroperoxyde glutathion peroxydases (PhGPx) de différentes espèces dont les mammifères (homme (Esworthy et al., 1994) ; rat (Pushpa-Rekha et al., 1994)), les vers parasites (*S. mansoni* (Williams et al., 1991)), ainsi que de nombreuses autres espèces animales et végétales non-nommées et non-discutées ici. C'est le gène qui montre les homologies les plus grandes avec des gènes connus (50 % d'acides aminés identiques en moyenne) sur les trois isolés chez *I. ricinus* au cours de ce travail. De plus, même au niveau de la séquence nucléotidique, des homologies (non-montrées ici) avec des glutathion peroxydases se retrouvent déjà. Pour les deux autres gènes cystatine et allergène, aucune homologie au niveau de la séquence nucléotidique n'a été observée. De grands

domaines polypeptidiques typiques des glutathion peroxydases se retrouvent dans la séquence protéique de ce gène d'*I. ricinus*. De plus, avec une taille de 23.8 kDa avec 205 acides aminés, cette enzyme a une taille similaire aux autres glutathion peroxydases décrites dans la littérature (de 20-23 kDa pour 170-200 acides aminés).

L'**insert C** présente surtout des homologies pour des **allergènes** du groupe II de plusieurs espèces d'acariens. Des homologies pour deux autres protéines, présentes dans l'épididyme de l'homme et le lait de vache, ont été obtenues également. Cependant, ces homologies sont moins grandes (groupes de 2-3 acides aminés) que les homologies avec les allergènes d'acariens (une grande homologie de 10 acides aminés et quelques-unes de 3 acides aminés). Cette protéine C est donc plus proche des allergènes d'acariens. Les pourcentages d'homologie sont assez bas, en dessous de 30 %, mais les structures conservées typiques des allergènes sont toutefois présentes. Tout d'abord, cette protéine est de taille similaire (12.3 kDa avec 116 aa) aux valeurs moyennes des allergènes du groupe II : 13-14 kDa avec 120-130 aa (Thomas et Smith, 1998). Les 3 ponts disulphures caractéristiques des allergènes II (Thomas et Smith, 1998) sont également présents avec 7 résidus cystéine (5 sont conservés au niveau des allergènes). Toutes ces protéines homologues sont sécrétées et contiennent un peptide signal, dont certains sont de taille presque identique (peptide signal constitué de 15 aa dans le travail d'Eriksson et al., 1998) à la protéine allergène d'*I. ricinus* (peptide signal composé de 16 aa).

IV.3.3. Cystatine

Les cystatines homologues à celles d'*I. ricinus* peuvent être séparées en deux groupes : les cystatines C, D et S isolées chez les mammifères principalement (souris, rat et homme), et celles décrites chez des nématodes parasites (*Onchocerca volvulus*, *Haemonchus contortus*, *Brugia malayi*). Ces protéines de mammifères se trouvent à des concentrations relativement hautes dans plusieurs fluides biologiques comme le plasma séminal, le liquide céphalo-rachidien (LCR) et en concentration un peu plus basse dans le plasma, la salive et l'urine (Turk et Bode, 1991). Les cystatines des nématodes sont présentes dans la cuticule principalement ou dans l'intestin. Aucune cystatine n'est glycosylée (Turk et Bode, 1991). Les homologies par rapport à la séquence d'*I. ricinus* sont un peu différentes dans les deux groupes : avec les cystatines C, D et S, les 4 résidus cystéines, le domaine ⁶⁵QxVxGVxY⁷² ainsi que les polypeptides ⁴¹FaxS⁴⁴ et ¹¹⁴PWx¹¹⁶ sont conservés. Avec le groupe des cystatines de nématodes, seuls les deux premiers résidus cystéines (en position 83 et 95) sont similaires à la séquence d'*I. ricinus*, le domaine ⁴¹FaxS⁴⁴ ne se retrouve pas, mais par contre le domaine typique des cystatines ⁶⁵QVVxGVxY⁷² est plus proche de celui d'*I. ricinus* que chez les cystatines de mammifères. Il est donc difficile de dire si la cystatine d'*I. ricinus* ressemble plus à l'une ou l'autre des cystatines homologues obtenues, aucune ne sortant significativement de la moyenne. Il est donc important de détailler toutes les fonctions de ces protéines homologues obtenues pour trouver une fonction probable de cette cystatine chez les tiques. Cependant, en regardant dans le détail, la cystatine S de l'homme serait peut-être la plus proche d'*I. ricinus* avec ses deux domaines identiques ⁴⁰HFAIS⁴⁴ et ¹¹⁴PWE¹¹⁶. Concernant les cystatines des nématodes, l'onchocystatine serait la plus proche d'*I. ricinus* avec le plus grand domaine identique ⁶⁴SQVVAGVxYK⁷³. Cette cystatine de tique semble être donc un mélange entre cystatines de mammifères et de nématodes.

La cystatine C a été identifiée dans tous les fluides biologiques extracellulaires humains (Abrahamson et al., 1988). Elle agirait comme un inhibiteur de contrôle des cystéines protéases extracellulaires. Chez la souris, l'ARNm correspondant à la cystatine C a été observé dans tous les tissus examinés dont l'estomac, le cerveau, l'intestin, le foie, les muscles, la rate, le cœur, les poumons, le pancréas, les testicules, l'utérus et l'ovaire, avec la plus grande concentration dans le

cerveau et les testicules et la plus basse dans le pancréas (Huh et al., 1995). Reed (2000) vont plus dans le détail et écrivent que la cystatine C est impliquée dans des processus divers tels que invasion des tumeurs et métastases, processus inflammatoires et quelques maladies neurologiques. Li et al. (1998) décrivent également la présence de cystatine C dans les cellules tumorales. Olsson et al. (2000) observent cette cystatine C dans les cellules sécrétrices du plexus choroïde, dans les cellules du tissu lymphoïde et dans les cellules de Sertoli. Cette protéine est aussi présente dans les neurones et les cellules gliales partout dans le SNC. Il semble que la principale production de cystatine C dans le cerveau soit effectuée par les astrocytes (Olsson et al., 2000). Blankenvoorde et al. (1996 ; 1998) apportent un élément nouveau en écrivant que la cystatine C inhibe la croissance de *Porphyromonas gingivalis*. Cet organisme est une bactérie qui n'affecte en principe que la région buccale, où elle est responsable de maladies comme la périodontite. Des complications comme des maladies artérielles peuvent en outre être dues à cette bactérie si les dents ne sont pas soignées (Beck, 1998).

La cystatine D a une distribution plus restrictive que la cystatine C ; cela en serait de même pour la cystatine S (Freije et al., 1993). Cette cystatine D ne montre aucune activité inhibitrice contre la cathepsine B, suggérant donc un spectre beaucoup plus restrictif que la cystatine C (Freije et al., 1993). En effet, cette cystatine D est présente dans la salive, les larmes, mais pas dans le plasma séminal, le plasma sanguin, le lait maternel ou le liquide céphalo-rachidien (Freije et al., 1993). Son rôle serait de lutter contre les protéases des organismes présents dans la cavité orale (Freije et al., 1993).

La cystatine S se retrouve dans les glandes parotides et submandibulaires surtout chez l'homme (Bobek et al., 1991). Cette protéine a également un effet contre *P. gingivalis*, en inhibant les protéases sécrétées par cette bactérie ainsi que sa croissance (Blankenvoorde et al., 1996 ; 1998).

L'oncocystatine décrite chez *O. volvulus* (filaire parasite de la peau et des yeux chez l'homme), est sécrétée au niveau de la cuticule (Lustigman et al., 1992). Cette protéine a une activité contre les cystéines protéases, notamment la cathepsine L, qui digèrent les protéines cuticulaires (Lustigman et al., 1996). Cette protéine met fin à cette dégradation de cuticule lors de la dernière mue du nématode (Lustigman et al., 1996). La cystatine décrite chez *B. malayi* (filaire parasite du système lymphatique de l'homme, singe et chat) inhibe les multiples activités des cystéines protéases trouvées dans les endosomes/lysosomes des lymphocytes B humains (Manoury et al., 2001). Les parasites filaires pourraient ainsi inactiver le système immunitaire de l'hôte (Manoury et al., 2001). La cystatine 1 décrite chez *H. contortus* (parasite intestinal de ruminants, principalement du mouton) a été localisée dans le cytoplasme des cellules intestinales. Son rôle serait d'inhiber les cystéines protéases intracellulaires des lysosomes pour réguler la digestion (Newlands et al., 2001) au contraire de toutes les cystatines C, D et S décrites, qui sont sécrétées (Newlands et al. 2001). Une protéine similaire à la cystatine C a été décrite récemment dans la cuticule du nématode parasite *Nippostrongylus brasiliensis* (parasite intestinal du rat) (Dainichi et al., 2001), dont la séquence n'est pas apparue dans les homologies obtenues au cours de cette étude sur *I. ricinus*. Cette protéine, contenant toujours un peptide signal pour être sécrétée, inhibe l'activité des cathepsines L et B, empêchant ainsi la dégradation de la cuticule du nématode par ces enzymes protéolytiques contenues dans les leucocytes. En effet, les cystéines protéases et les cathepsines L et B en particulier, participent au système immunitaire de l'hôte infecté (Dainichi et al., 2001) lorsqu'elles sont sécrétées par les leucocytes.

Ces cystatines jouent donc un grand nombre de rôles, bien plus que celui uniquement d'inhiber les cathepsines B, L ou D contenues dans les lysosomes comme on aurait pu le penser au début de ce travail. La cystatine C est très importante dans les processus tumoraux et dans le cerveau, mais celle-ci n'a pas une fonction spécifique dans un tissu particulier ; elle se retrouve en effet un peu partout ! Il est très intéressant de voir que la cystatine D agirait contre des protéases étrangères dans des endroits ouverts sur l'extérieur que sont les larmes et la bouche. De plus, certains auteurs ont aussi trouvé une activité de la cystatine D contre la bactérie *P. gingivalis*. La cystatine S aurait également une activité similaire contre cette bactérie de la cavité buccale. L'activité des cystatines

de *B. malayi* et de *N. brasiliensis* contre les protéases des leucocytes est également intéressante, la cystatine d'*I. ricinus* étant peut-être capable d'inhiber les enzymes des leucocytes contenus dans le sang de l'hôte, et qui, une fois dans l'intestin de la tique, pourraient endommager ce dernier. Cette cystatine serait ainsi particulièrement efficace lors de la phase rapide de gorgement, là où la digestion est lente et où monocytes et autres cellules immunitaires risquent de rester intacts longtemps, ce qui leur laisserait le temps de libérer des enzymes protéolytiques qui pourraient endommager l'intestin. Néanmoins, la majorité des tiques, au vu de leur poids moyen à 5 jours de gorgement (25-30 mg) ne sont vraisemblablement pas encore en phase rapide (Diehl, comm. personnelle).

Cette cystatine isolée dans l'intestin d'*I. ricinus* pourrait, comme deuxième hypothèse, aussi avoir un rôle antibactérien contre certaines souches de pathogènes, puisque des substances antibactériennes ont déjà été décrites dans l'intestin des tiques (Hindle et Duncan, 1925 ; Duncan, 1926 ; Kopacek et al., 1999 ; Fogaça et al., 1999 ; Nakajima et al., 2001 ; Podboronov, 1991). Ce rôle pourrait être similaire aux cystatines D et S contenues dans les glandes salivaires de l'homme (Freije et al., 1993 ; Blankenvoorde et al., 1996). Une autre fonction possible de cette cystatine serait tout simplement d'inhiber les protéases digestives, notamment au cours de la phase rapide de croissance, lorsque la tique ingère énormément de sang pendant que l'activité digestive est faible (Akov, 1982). Cette fonction serait similaire à la cystatine décrite chez *H. contortus*, bien que celle-ci ne soit pas sécrétée. Néanmoins, comme déjà mentionné plus haut, les tiques partiellement gorgées utilisées dans notre étude ne se trouvaient probablement pas encore en phase rapide d'engorgement. Cette cystatine isolée chez *I. ricinus* ne peut en tous les cas pas réguler les cathepsines dans les lysosomes, car cette enzyme est bien sécrétée à l'extérieur de la cellule, comme en témoigne son peptide signal à l'extrémité N-terminale. Une 4^{ème} et dernière (mais pas moins intéressante) fonction de cette cystatine serait d'inhiber une cathepsine L, responsable de la dégradation de tissus et de matrices extracellulaires par certains parasites. Cette enzyme est sécrétée par certains endoparasites comme le nématode *H. contortus* (Rhoads et Fetterer, 1996), l'amibe *E. histolytica* (Keene et al., 1986 ; Luaces et Barrett, 1988) ou encore le trématode *F. hepatica* (Halton, 1997). En effet, ces trois espèces d'endoparasites sont capables de sécréter une enzyme similaire à la cathepsine L qui leur permet de dégrader fibronectine, laminine, collagène de type I et d'autres protéines membranaires ainsi que de détacher les cellules de leur base. Cette enzyme leur permet donc l'invasion des tissus (Luaces et Barrett, 1988) et l'accès au sang de l'hôte (Rhoads et Fetterer, 1996). Cette enzyme est inhibée par une cystéine protéase inhibiteur, la cystatine du poulet (Luaces et Barrett, 1988), qui est similaire à la cystatine C (Turk et Bode, 1991) ! Ainsi, chez la tique *I. ricinus*, cette cystatine isolée empêcherait peut-être certaines bactéries (ou autres endoparasites) que les tiques ingèrent lors du repas sanguin et peuvent transmettre (comme les borrélioses), de franchir la membrane péritrophique pour gagner les autres organes, comme les glandes salivaires. Par exemple, Zung et al. (1989) ont observé que *B. burgdorferi* pouvait traverser la membrane péritrophique et Coleman et al. (1997) ont montré que *B. burgdorferi* pouvait sécréter une enzyme protéolytique (sérine protéase) nécessaire pour lui permettre de traverser l'intestin. Si une cystatine est capable d'inhiber la cathepsine digérant les protéines cuticulaires chez *O. volvulus* (Lustigman et al., 1992), elle pourrait aussi empêcher la dégradation des protéines de la membrane péritrophique ou de l'intestin en inhibant certaines protéases des endoparasites des tiques. Pour résumer cette dernière fonction possible, les cathepsines des pathogènes nécessaires à la destruction de la membrane péritrophique seraient inhibées par les cystatines sécrétées par l'intestin des tiques.

Pour localiser cette cystatine, des anticorps dirigés contre elle ont dû être produits. Une protéine recombinante a pu tout d'abord être fabriquée à partir de la partie codante de ce gène cystatine. Cette protéine étant insoluble, l'isolement des corps d'inclusion (protéines insolubles) a été effectuée, mais d'autres protéines non solubles étaient présentes ensemble avec les protéines de fusion. L'électroéluion a été la seule technique qui a permis de purifier cette cystatine. Cette technique est longue, surtout pour obtenir beaucoup de protéines, mais permet tout de même

l'isolement de protéines relativement pures. Cette technique a d'ailleurs été utilisée avec succès par beaucoup d'auteurs dont Azzouz (2001). Une digestion enzymatique par la thrombine a permis d'éliminer la GST pour obtenir uniquement la cystatine, d'une taille d'environ 14 kDa. Des anticorps dirigés contre cette protéine ont été produits chez les souris Balb/C avec succès. La quantité d'anticorps obtenue était grande, et leur spécificité était dirigée uniquement contre la cystatine injectée aux souris.

Une seule bande intéressante a été reconnue sur le profil protéique des intestins gorgés à 6 jours, au poids moléculaire correspondant à la cystatine (env 14 kDa). Si le rôle de cette cystatine était d'inhiber les enzymes protéolytiques de l'intestin des tiques ou les enzymes de cellules immunitaires de l'hôte, on la trouverait préférentiellement lors de la phase rapide d'engorgement, lorsque la digestion est plus faible (Bogin et Hadani, 1973), plutôt vers la fin du repas sanguin ; 6 jours d'engorgement correspondraient peut-être à ce stade. Malheureusement, par immunocytochimie, ce résultat n'a pu être démontré. En effet, les AC anti-cystatine fabriqués dans la souris n'ont reconnu aucune structure spécifique. Tous les organites dans les cellules intestinales (noyau, cytoplasme, lipides vides, etc.) ainsi que la lumière contenaient des grains d'or. Pire, les cellules intestinales provenant des tiques non-gorgées étaient également couvertes de grains d'or. Ce résultat donc est en contradiction avec cette bande obtenue sur Western blot qui n'était apparemment pas spécifique. Pourtant, les AC reconnaissaient bien la cystatine sur le Western blot de contrôle, et les bandes protéiques provenant des bactéries non-induites n'étaient pas reconnues, ce qui prouverait tout de même une certaine spécificité de l'AC anti-cystatine. De plus, comme le témoin sans anticorps primaire ne contenait pas de grains d'or, ces anticorps anti-cystatine se lient bien à des épitopes de protéines, mais ceux-ci sont certainement très présents dans toutes sortes de structures cellulaires.

Deux hypothèses peuvent être prises en compte pour expliquer cet échec dans l'immunolocalisation :

-Un problème est apparu lors de la fabrication de la cystatine recombinante, qui a acquis une conformation fautive. Newland et al. (2001) ont eu également ce problème lors de la fabrication d'AC anti-cystatine et suggèrent que ce problème pourrait être évité si la protéine recombinante était exprimée dans un système eukaryote et non procaryote comme nous l'avons utilisé (bactéries).

-La 2^{ème} explication serait que les épitopes de cette cystatine sont inatteignables pour les anticorps. Lorsqu'elle est libérée à l'extérieur de la cellule, cette protéine change de conformation et les AC ne la reconnaissent plus.

IV.3.4. Glutathion peroxydase

Le nombre très grand d'homologies obtenues avec la glutathion peroxydase d'*Ixodes ricinus* (445) reflète bien la grande quantité d'études traitant de cette enzyme. Toutes les séquences sont assez semblables, avec un minimum de 45 % d'acides aminés identiques. Parmi le règne animal, les glutathion peroxydases des vertébrés surtout ont été étudiées ; les articles traitant des invertébrés étant moins nombreux. Chez les tiques, une seule enzyme de ce type a été décrite succinctement dans les glandes salivaires (Das et al., 2001).

La partie codante de cette enzyme d'*I. ricinus* ne contient pas de peptide signal. Vu qu'il y a un deuxième acide aminé méthionine en position 18, il se pourrait que celui-ci soit le véritable codon « Start ». Dans ce cas-là, un peptide signal constitué de 17 acides aminés apparaîtrait. Pushpa-Rekha et al. (1995) ont découvert que la deuxième méthionine était le codon « Start » dans la séquence codante pour une phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase, ce qui est en accord avec notre hypothèse. La possibilité de la présence d'un peptide signal impliquerait une fonction extracellulaire chez *I. ricinus*. Ce changement n'augmenterait toutefois pas le pourcentage d'homologie avec les autres gènes, car les 36 premiers acides aminés ne montrent pas de similarité avec les banques de données.

Les glutathion peroxydases sont une famille d'enzymes qui protègent les composants cellulaires essentiels contre les dommages oxydatifs. Deux types de molécules appartiennent à cette famille : les glutathion peroxydases au sens stricte (GPx) qui catalysent la réduction des hydroperoxydes pour maintenir l'intégrité des lipides membranaires et de l'ADN (Meister, 1988), et les phospholipides hydroperoxydes glutathion peroxydases (PhGPx) qui catalysent l'inactivation réductrices des hydroperoxydes lipidiques dans les membranes pour les protéger (Pushpa-Rekha et al., 1995). Ces deux enzymes réduisent également le niveau cellulaire du peroxyde d'hydrogène. Elles ont donc un mode d'action similaire avec plus de 40 % de séquence homologue entre elles (Pushpa-Rekha et al., 1995). De manière générale, la majorité des glutathion peroxydases contiennent un acide aminé spécial, la sélénocystéine, qui comporte dans sa structure un atome de sélénium. Certaines glutathion peroxydases n'en contiennent néanmoins pas, et elles sont nommées « sélénium indépendant » (Tang et al., 1995). Il s'agit par exemple de la glutathion peroxydase isolée chez *Brugia pahangi* (Tang et al., 1995). Cette enzyme, concentrée dans la membrane de l'hypoderme et excrétée à travers la cuticule, protégerait la surface de ce nématode contre les dommages oxydatifs. L'acide aminé sélénocystéine est codé par un codon UGA sur l'ARN (Chambers et al., 1986) qui est normalement le codon « Stop ». Le vrai codon « Stop » à la fin du gène est alors UAA (Etienne, 1998). Chez les glutathion peroxydases « sélénium-indépendantes », le codon UGA est transformé en UGC ou UGU codant pour l'acide aminé cystéine. Toutes les enzymes « sélénium-indépendant » des mammifères contiennent un peptide signal pour être sécrétées; la majorité des glutathion peroxydases « sélénium dépendant » sont quant à elles intracellulaires (Tang et al., 1995). Dans la séquence de la glutathion peroxydase d'*I. ricinus*, il n'y a pas de codon UGA (à part le codon « Stop ») mais uniquement des UGC (comme par exemple en position 9) codant pour des cystéines. Il n'y a donc pas d'atome de sélénium. Vu que cette enzyme est la première glutathion peroxydase isolée à partir d'intestins de tiques, des études supplémentaires sont nécessaires pour vérifier si l'absence d'un atome de sélénium implique une fonction extracellulaire chez les tiques comme c'est le cas avec les glutathion peroxydases des mammifères. L'enzyme antioxydant similaire à une glutathion peroxydase isolée dans les glandes salivaires d'*I. scapularis* (Das et al., 2001) n'entre pas en compte ici car aucune indication n'est fournie par les auteurs sur la présence ou non d'une sélénocystéine dans la séquence protéique de cette enzyme.

Les glutathion peroxydases du règne animal ont été localisées dans les testicules du rat principalement, mais aussi dans l'intestin, le foie, la rate, les reins, les poumons, le cœur, le cerveau (Pushpa-Rekha et al., 1995). Elles se trouvaient dans le cytoplasme, les mitochondries (dans l'espace intermembranaire), les membranes plasmiques et nucléaires. L'isolement d'une glutathion peroxydase chez l'homme dans l'intestin grêle, l'estomac, le foie et le côlon surtout (Chu et al., 1993) est intéressante pour expliquer la fonction de cette enzyme dans l'intestin d'*I. ricinus*. Chu et al. (1993) ont démontré la présence spécifique de cette glutathion peroxydase dans le tractus gastro-intestinal chez la souris. Une glutathion peroxydase a également été localisée dans la muqueuse épithéliale à la base des cryptes gastriques et intestinales chez l'homme (Komatsu et al., 2001). Un rôle majeur de ces enzymes contre la toxicité des hydroperoxydes des lipides ingérés dans le tractus intestinal chez les mammifères a donc été démontré (Komatsu et al., 2001). Une fonction similaire peut être envisagée dans l'intestin des tiques également, mais d'autres études devraient être entreprises pour vérifier cette hypothèse.

L'hème contenu dans l'hémoglobine du repas sanguin peut générer des réactifs oxygènes qui peuvent endommager des molécules biologiques. Il peut aussi détruire la couche lipidique des membranes cellulaires (Oliveira et al., 1999). La présence d'une enzyme ressemblant à une glutathion peroxydase chez la punaise hématophage *R. prolixus* a été décrite (Oliveira et al., 1999). Cette enzyme va détoxifier l'hème et protéger les surfaces cellulaires de l'oxydation (Oliveira et al., 1999). Pascoa et al. (2002) ont démontré que la détoxification de l'hème avait lieu au niveau de la membrane péritrophique chez le moustique *Aedes aegypti*. En se basant sur ces deux articles, il peut être envisagé qu'une glutathion peroxydase soit sécrétée au niveau de la membrane péritrophique chez les insectes hématophages pour détoxifier l'hème. Chez les tiques, la fonction de cette

glutathion peroxydase se rapproche très certainement de celle décrite chez les insectes hématophages, bien que chez les tiques la digestion de l'hémoglobine a surtout lieu à l'intérieur des cellules intestinales. La présence d'une glutathion peroxydase dans l'intestin des tiques n'a été démontrée par aucune étude. Das et al. (2001) ont décrit une enzyme antioxydante ressemblant à une glutathion peroxydase dans les glandes salivaires des nymphes à jeun et gorgées d'*I. scapularis*. Ces auteurs pensent que cette enzyme protège les tissus de la tique contre les radicaux oxygènes sécrétés par les monocytes et macrophages au niveau de la lésion de la peau. Dans l'intestin de la tique, cette glutathion peroxydase protégerait la surface de l'intestin contre l'oxydation déclenchée par l'hème ou par d'autres constituants contenus dans le repas sanguin (comme les radicaux oxygènes des monocytes et macrophages).

Les fonctions probables de cette enzyme chez *I. ricinus* sont donc de deux sortes, suivant si le site d'activité est intracellulaire ou extracellulaire :

-fonction intracellulaire : protection des membranes contre les radicaux oxygènes et peroxydes d'hydrogène contenus dans la cellule.

-fonction extracellulaire : protection de la surface de l'intestin contre l'oxydation et/ou détoxification de l'hème au niveau de la membrane péritrophique.

Une localisation future par immunocytochimie permettra certainement d'élucider la présence ou l'absence de cette enzyme dans le compartiment extracellulaire de l'intestin des tiques. Cette localisation n'a pas été réalisée ici car le travail aurait été trop important en analysant les trois protéines. Deux était le maximum. Nous nous sommes donc centrés sur les protéines dont les homologues de séquences étaient les plus intéressantes et mystérieuses, les glutathion peroxydases étant quant à elles parfaitement connues.

IV.3.5. Allergène

Au moins 13 groupes d'allergènes d'acariens ont été caractérisés et clonés (Thomas et Smith, 1998). Ces protéines proviennent en majorité de 5 espèces d'acariens (Thomas et Smith, 1998) : *D. pteronyssinus* (famille Pyroglyphidae), *D. farinae* (famille Pyroglyphidae), *E. maynei* (famille Pyroglyphidae), *L. destructor* (famille Glycyphagidae) et *T. putrescentiae* (famille Acaricidae). Ces acariens vivent particulièrement dans les poussières et les lits, où ils se nourrissent des squames de la peau (Colloff et Spieksma, 1992). Les allergènes d'acariens proviennent principalement des fèces, particules sphériques de 10-40 µm, qui peuvent facilement être transportées par l'air (Colloff et Spieksma, 1992). De nombreux allergènes ont des activités protéolytiques qui peuvent contribuer à leur pouvoir allergène (Kawamoto et al., 1999). Les allergènes les mieux caractérisés sont les groupes I et II qui sont des protéines de 25 kDa et 14 kDa respectivement. Mais si les fonctions biologiques du groupe I sont bien connues en étant des enzymes protéolytiques de la famille des cystéines protéases (Thomas et al., 1998), celles du groupe II par contre restent beaucoup plus floues (Ichikawa et al., 1998). Le gène d'*I. ricinus* montre des homologues protéiques pour des allergènes du groupe II de ces cinq espèces décrites plus haut. En 1992, Colloff et Spieksma pensaient que ces allergènes II provenaient de sécrétions épithéliales. Stewart et al. (1992) ont écrit que les allergènes II du genre *Dermatophagoides* sont des lysozymes, affirmation reprise plus tard par Schmidt et al. (1995). Hakkaart et al. (1997) au contraire ont clairement démontré dans le détail que les allergènes du groupe II n'ont pas d'activité lysozymatique. Il semble maintenant que cette fonction comme lysosyme soit définitivement abandonnée (Thomas et Smith, 1998). Schmidt et al. (1995) ont localisé l'allergène II de *L. destructor* dans le tractus digestif et les pellets fécales, indiquant que cet allergène est impliqué dans la digestion. Park et al. (2000) ont localisé spécifiquement l'allergène II de *D. pteronyssinus* dans les pellets fécales et l'intestin postérieur. Van Hage-Hamsten et al. (1995) ont isolé l'allergène II de *L. destructor* dans la région buccale et dans l'intestin. Ichikawa et al. (1998) ont démontré que l'allergène II de *D. farinae* se lie à la

surface d'*E. coli*. D'après ces derniers auteurs, cet allergène serait un composant du système de défense antibactérien inné chez les acariens. Aucuns des allergènes du groupe II ne sont des protéines glycosylées (Thomas et Smith, 1998).

Ces allergènes du groupe II ressemblent également à des protéines sécrétées dans l'épididyme des mammifères ou le lait des bovins (Ichikawa et al., 1998), comme les homologies de séquences obtenues dans ce travail sur *I. ricinus* le montrent. Le gène codant pour la protéine EPV20 isolée à partir du lait de bovin est également exprimé, outre les glandes mammaires, dans les reins, la rate, le foie, mais pas dans les testicules (Larsen et al., 1997). La fonction de cette protéine est complètement inconnue (Larsen et al., 1997). La protéine isolée dans l'épididyme de l'homme (HE1) ou de la souris (ME1) n'est pas mieux définie fonctionnellement. Ces deux dernières protéines, qui sont sécrétées, ont été localisées dans les cellules épithéliales bordant les canaux de l'épididyme (Nakamura et al., 2000). Elles seraient éventuellement impliquées dans l'enlèvement du cholestérol de la membrane des spermatozoïdes (Nakamura et al., 2000). Du fait des homologies de séquences entre ces protéines et les allergènes du groupe II, quelques chercheurs ont postulé que les allergènes du groupe II seraient également sécrétés dans le tractus reproducteur des acariens mâles. Cependant, aucun allergène du groupe II a été observé ailleurs que dans le tractus gastro-intestinal et les pellets fécales (Park et al., 2000). Ces protéines EPV20, HE1 et ME1 semblent donc n'avoir aucun lien de fonction avec les allergènes. Si néanmoins ces allergènes II ont une fonction antibactérienne, on pourrait émettre l'hypothèse que la protéine EPV20 montre une activité similaire dans le lait des bovins.

La structure et la nature cellulaire des systèmes digestifs d'un grand nombre d'acariens libres apparaissent être similaires à ceux des tiques (Nisbet et Billingsley, 2000). On peut donc émettre l'hypothèse que cette protéine allergène d'*I. ricinus* serait également impliquée dans la digestion comme chez les acariens des poussières. Peut-être serait-elle également impliquée dans la défense antibactérienne comme l'écrivent Ichikawa et al. (1998) pour les acariens.

L'adjonction de la protéine allergène d'*I. ricinus* dans une culture de borrelies a été entreprise, car, bien que les tiques transmettent très bien ces bactéries, il est possible tout de même que ces arthropodes luttent contre elles dans l'intestin, et que certaines bactéries parviennent tout de même à s'échapper pour gagner les glandes salivaires. En effet, Zhu (1998) a montré que *B. burgdorferi* était présente dans l'intestin d'*I. ricinus* femelle 1 un jour après le repas sanguin, et que dès le deuxième jour du repas sanguin, toutes les bactéries avaient disparues de l'intestin, la cause de cette disparition étant inconnue. Dans notre travail, nous avons donc mis cet allergène dans une culture liquide de borrelies pour étudier si cette protéine avait un effet contre ces bactéries. De plus, certains auteurs (Diehl, comm. personnelle) soupçonnent la présence de substances antibactériennes dans l'intestin d'*I. ricinus*. Il semblerait que cet allergène ait un effet négatif sur la croissance et la mobilité de ces borrelies (observation préliminaire). Mais il faudrait encore faire d'autres tests pour être sûr de ce résultat. En effet, le simple fait d'ajouter une substance non protéolytique dans le milieu de culture des bactéries peut avoir des conséquences dramatiques (Diehl, comm. personnelle). Il faudrait réaliser d'autres études pour vérifier si la pression osmotique et le pH sont changés. Pour résumer, on ne peut pas admettre ici avec certitude que cet allergène ait un quelconque effet antibactérien envers *B. burgdorferi*.

Pour localiser cet allergène dans l'intestin d'*I. ricinus*, des anticorps dirigés contre cet antigène ont été produits. Une protéine recombinante a pu tout d'abord être fabriquée à partir de la partie codante de ce gène allergène, comme avec le gène cystatine. Cette protéine étant insoluble, l'isolement des corps d'inclusion (protéines insolubles) a été effectuée, mais d'autres molécules non solubles étaient à nouveau présentes ensemble avec les protéines de fusion. Eriksson et al. (1998) ont décrit également la formation de corps d'inclusions par l'allergène de *T. putrescentiae*. L'électroélution a été donc à nouveau utilisée avec succès, suivie de la digestion enzymatique avec la thrombine. A la fin, l'allergène pur a été récupéré. Des anticorps dirigés contre cette protéine ont été produits chez

les souris Balb/C avec succès. La quantité d'anticorps obtenue était grande, et leur spécificité était bien dirigée uniquement contre l'allergène injecté aux souris, comme cela a été prouvé sur Western blot.

L'anticorps a démontré la présence d'un antigène dès le deuxième jour de gorgement sur Western blot, mais en quantité faible. Aux 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} jours, la protéine est bien présente ; dès le 6^{ème} jour, elle diminue pour être absente dès le 7^{ème} jour. Ces résultats ont été confirmés et complétés par immunocytochimie et microscopie électronique. Le traitement préalable des coupes au paraformaldéhyde a beaucoup endommagé les structures cellulaires, qui sont devenues souvent difficilement reconnaissables. Néanmoins, cette protéine a été localisée dans les vésicules de sécrétion des cellules sécrétrices uniquement. Toutes les vésicules de sécrétion ne sont pas marquées, d'autres protéines en plus de cet allergène étant probablement sécrétées. Cette protéine est déjà présente en très faible quantité (très peu de grains d'or) dans des vésicules de cellules intestinales chez les tiques à jeun (Vlimant, comm. personnelle) même si le gène codant pour cette protéine n'a pas été observé suite à l'amplification à partir d'ADNc de tiques non-gorgées avec les amorces spécifiques à cet allergène. Au premier jour d'engorgement, des grains d'or s'observent également, preuve de la présence de l'allergène. Sur Western Blot par contre, aucune bande n'apparaissait dès le premier jour. La détection par immunocytochimie étant beaucoup plus sensible, c'est probablement pour cette raison qu'aucune bande n'apparaît avant le 2^{ème} jour sur Western blot. En plus, les grains d'or étaient bien moins nombreux dans les vésicules de sécrétion aux stades 1 et 6 jours qu'aux autres stades. Dès la fin du repas sanguin, cette protéine disparaît, ce qui confirme les résultats du Western blots (négatif à 7 jours de gorgement). Dès que les tiques se détachent ainsi que 6 jours plus tard, cette protéine n'a plus été observée (Vlimant, comm. personnelle).

Dès que les cellules sécrétrices fusionnent avec la membrane de la cellule pour l'exocytose de leur contenu, leur marquage à l'or disparaît. Quelques grains d'or isolés se retrouvent dans la lumière aux abords des vésicules exocytosées, mais ceux-ci sont en faible nombre. Il semblerait donc que cette protéine se dilue très rapidement dans la lumière. Renard et al. (2002) ont également observé le même résultat avec l'immunolocalisation d'une cathepsine : celle-ci était présente dans les vésicules de sécrétion à l'apex des cellules sécrétrices, mais aucun grain d'or n'était présent dans la lumière. Ces auteurs en concluent que cette enzyme serait lavée à l'extérieur par l'action d'autres matériaux solubles, ce qui rendrait presque impossible l'immunolocalisation. L'autre hypothèse serait que cet allergène, sous forme inactive dans les vésicules de sécrétion, changerait de conformation en se liant à une autre protéine au contact du pH de la lumière intestinale ce qui masquerait les épitopes pour les anticorps.

Les borrelies contenues dans l'intestin d'une tique à jeun (ayant servi de contrôle) provenant de la nature n'ont pas été reconnues par les anticorps anti-allergènes. Ces mêmes anticorps n'ont pas pu reconnaître les borrelies dans les nymphes gorgées infectées, car sur les coupes d'intestins, les bactéries n'étaient pas reconnaissables, voir absentes. Il faudrait recommencer l'expérience, car ces anticorps anti-allergène, même s'ils ne reconnaissent pas les borrelies dans les tiques à jeun, pourraient se lier aux spirochètes des tiques gorgées. En effet, dès le début du repas sanguin, les borrelies expriment d'autres protéines de surface (De Silva et al., 1996).

IV.4. Conclusions

Ce travail est la première étude moléculaire prenant comme matériel de départ l'intestin des tiques et ne se centrant pas sur la description d'une seule enzyme déjà présente chez d'autres espèces animales. Cette étude pionnière sur *I. ricinus* contribue à élargir les connaissances de la physiologie de la digestion pendant une partie du repas sanguin chez ce vecteur. Leboulle et al. (2002a et b) ont effectué une étude similaire sur les glandes salivaires d'*Ixodes ricinus* en obtenant par hybridation soustractive les gènes spécifiques aux tiques gorgées 5 jours. Les deux études moléculaires de ce type sont les seules réalisées sur cette espèce de tiques.

À part la cathepsine, les molécules obtenues dans notre travail n'ont jamais été isolées dans l'intestin d'une tique. Deux des ces protéines- la cystatine et l'allergène – pourraient avoir une fonction antibactérienne. En effet, celles-ci sont sécrétées dans la lumière du fait de leur peptide signal. De plus, plusieurs auteurs ont démontré ou supposent une fonction antibactérienne de ces enzymes chez d'autres espèces animales. Chez les tiques, la cystatine lutterait contre les endoparasites (que les tiques transmettent ou non) en inhibant les protéases de ceux-ci et peut-être plus précisément les protéases responsables de la dégradation de la membrane péritrophique et de l'épithélium intestinal. L'allergène est moins bien décrit dans la littérature, mais une fonction antibactérienne a été avancée (Ichikawa et al., 1998). Ces deux protéines n'ont pas une fonction purement digestive, puisque, en consultant la littérature, de nombreuses substances digestives ont été retrouvées également dans les tiques à jeun, mais en concentration beaucoup plus faible. De l'ARNm codant pour ces molécules était donc déjà présent dans les tiques à jeun et celui-ci a été éliminé par l'utilisation de la RDA. Il serait donc nécessaire d'analyser d'une manière non-soustractive les banques d'ADNc de tiques à jeun et partiellement gorgées pour retrouver les gènes codant pour des enzymes digestives protéolytiques et également ceux codant pour la synthèse des constituants de la membrane péritrophique.

Il faudrait tester les deux substances cystatine et allergène contre diverses souches de bactéries (bien plus que celles que les tiques peuvent transmettre), d'une manière similaire à celle décrite par Hindle et Duncan (1925), en cultivant des bactéries sur boîte de Petri avant d'y ajouter ces deux substances. Il faudrait tout d'abord mieux tester l'allergène contre les borrelies, en respectant le pH et la pression osmotique, ce qui n'était sûrement pas le cas dans notre étude. La culture des bactéries sur milieu solide serait certainement une bonne manière. Des tests biochimiques *in vitro* devraient également être entrepris pour mieux caractériser les trois substances décrites.

La glutathion peroxydase a un rôle digestif bien défini, celui d'empêcher les dommages oxydatifs aux structures cellulaires. La seule inconnue réside dans le fait de sa localisation intra- ou extracellulaire. Dans le cas d'une présence à l'intérieur de la cellule, cette enzyme empêcherait l'oxydation des lipides membranaires due aux peroxydes d'hydrogène contenus dans la cellule. Si cette enzyme est extracellulaire, celle-ci protégerait l'intestin contre les dommages oxydatifs de l'hème, produit provenant de la dégradation de l'hémoglobine, ou d'autres radicaux oxygènes provenant des cellules immunitaires contenues dans le sang de l'hôte. Il serait donc nécessaire de fabriquer des anticorps, pour permettre la localisation exacte de cette enzyme et ainsi mieux comprendre sa fonction.

Il faudrait également réaliser le même travail d'hybridation soustractive en prenant des tiques à un stade plus précoce, par exemple à 2 jours de gorgement, pour récupérer ainsi peut-être d'autres gènes, notamment ceux codant pour la membrane péritrophique.

Ces substances, dont deux (cystatine et allergène) sont clairement sécrétées dans la lumière intestinale, prouvent que les cellules intestinales des tiques sécrètent plus de molécules dans la lumière qu'une unique hémolysine qui a été décrite dans la littérature. Ces substances extracellulaires pourraient permettre la fabrication d'anticorps qui seraient ensuite injectés aux hôtes des tiques, pour observer si ces anticorps contenus dans le sang de l'hôte ingéré pourraient avoir un effet significativement négatif sur la survie des tiques. Si c'était le cas, la fabrication d'un vaccin pourrait éventuellement être envisagée. Les molécules similaires à la glutathion peroxydase et à l'allergène seraient peut-être les mieux sujets à la confection d'un vaccin, la fonction supposée

de la cystatine – inhibition des protéases bactériennes dégradant la membrane pérित्रophique – étant probablement moins importante à la survie de la tique.

V. Bibliographie

- Abrahamson M., Dalboge H., Olafsson I., Carlsen S. and Grubb A.** (1988) : Efficient production of native, biologically active human cystatin C by *E. Coli*. *FEBS lett.* 236 (1) : 14-18
- Aeschlimann A.** (1972) : *Ixodes ricinus* L., 1778 (Ixodoidea : Ixodidae). Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. *Acta Trop.* 29 : 321-340
- Agbede R.I.S. and Kemp D.H.** (1985) : Digestion in the cattle-tick *Boophilus microplus*. Light microscope study of the gut cells in nymphs and females. *Int. J. Parasitol.* 15 : 147-157
- Agbede R.I.S. and Kemp D.H.** (1987) : Ultrastructure of secretory cells in the gut of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Int. J. Parasitol.* 17 : 1089-1098
- Agyei A.D., Runham N.W. and Blackstock N.** (1992) : Histochemical changes in the midgut of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. *Exp. Appl. Acarol.* 13 : 187-212
- Agyei A.D. and Runham N.W.** (1995) : Studies on the morphological changes in the midguts of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. *Int. J. Parasitol.* 25(1) : 55-62
- Akov S.** (1982) : Blood digestion in ticks. In : Physiology of ticks (Obenchain F.D. and Galun R. eds.) Pergamon Press, Oxford, p. 197-211
- Akov S., Samish M. and Galun R.** (1976) : Protease Activity in female *Ornithodoros tholozani* ticks. *Acta Trop.* 33(1) : 37-51
- Al-Hashimi I., Dickinson D.P., and Levine M.J.** (1988) : Purification, molecular cloning and sequencing of salivary cystatin SA-I. *J. Biol. Chem.* 263 : 9381-9387
- Araman S.** (1979) : Protein digestion and synthesis in ixodid female. In : Recent Advances in Acarology, vol.1 (Rodriguez J., ed.). Academic Press, New York, p. 385-395
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E, Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K.** (1994) : Current protocols in molecular biology. Vol. 3. John Wiley & Sons Inc. pp. 16.7.1-16.7.15
- Azzouz F.** (2001) : Identification moléculaire d'une chitinase CECHI 1, sa localisation et son rôle chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Thèse. Institut de Zoologie. Faculté des Sciences, Université de Neuchâtel.
- Baertschi G.** (1998) : Réalisation à deux états physiologiques d'une banque d'ADNc des tissus intestinaux de la tique dure *Ixodes ricinus*. Mémoire de licence. Institut de Zoologie. Faculté des Sciences, Université de Neuchâtel.
- Balashov Y.S.** (1972) : Bloodsucking ticks (Ixodoidea). Vectors of diseases of man and animals. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 8 : 161-376
- Barbour A.G.** (1984) : Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57 : 521-525
- Baxter G.D. and Barker S.C.** (1999) : Isolation of a cDNA for an octopamine-like, G-protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Ins. Bioch. Mol. Biol.* 29 : 461-467

- Beck J.D.** (1998) : Dental infections and arteriosclerosis. *Colloque international : Infections et Arthériosclérose, Annecy, 6-9 décembre 1998.*
- Bergman D.K., Ramachandra R.N. and Wikel S.K.** (1998) : Characterization of an immunosuppressant protein from *Dermacentor andersoni* (Acari : Ixodidae) salivary glands. *J. Med. Entomol.* 35(4) : 505-509
- Berner R., Rudin W. and Hecker H.** (1983) : Peritrophic membranes and protease activity in the midgut of the malaria mosquito, *Anopheles stephensi* (Liston) (Insecta : Diptera) under normal and experimental conditions. *J. Ultrast. Res.* 83 : 195-204
- Bior A.D., Essenberg R.C. and Sauer J.R.** (2002) : Comparison of differentially expressed genes in the salivary glands of male ticks, *Amblyomma americanum* and *Dermacentor andersoni*. *Ins. Bioch. Mol. Biol.* 32 : 645-655
- Bjork I. and Ylinenjarvi K.** (1992) : Different roles of the two disulfide bonds of the cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin, for the conformation of the active protein. *Biochem.* 31 (36) : 8597-602
- Blankenvoorde M.F., Henskens Y.M., Van't Hof W., Veerman E.C. and Niew Amerongen A.V. (1996) : **Inhibition of the growth and cysteine proteinase of *Porphyromonas gingivalis* by human salivary cystatin S and chicken cystatin.** *Biol. Chem.* 377(12) : 847-850
- Blankenvoorde M.F., van't Hof W., Walgreen-Weterings E., van Steenberg T.J., Brand H.S., Verman E.C. and Niew Amerongen A.V.** (1998) Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Biol. Chem.* 379 (11) : 1371-5
- Bobek L.A., Aguirre A. and Levine M.J.** (1991) : Human salivary cystatine S. Cloning, sequence analysis, hybridization in situ and immunocytochemistry. *Biochem. J.* 278 : 627-635
- Bogin E. and Hadani A.** (1973) : Digestive enzymes in hard ticks (Ixodoidea, Ixodidae). I. Proteolytic enzyme activity in the gut of *Hyalomma excavatum* female ticks. *Z. Parasitenk.* 41 : 139-146
- Bowler L.D., Hubank M. and Spratt B.G.** (1999) : Representational difference analysis of cDNA for the detection of differential gene expression in bacteria : development using a model of iron-regulated gene expression in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol.* 145 : 3529-3537
- Chambers I., Frampton J., Goldfarb P., Affara N., McBain W. and Harrison P.R.** (1986) : The structure of the mouse glutathione peroxidase gene : the selenocysteine in the active site is encoded by the termination codon, TGA. *EMBO J.* 5(6) : 1221-1227
- Chu F., Doroshov J.H. and Esworthy R.S.** (1993) : Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependant Glutathione peroxidase, *GSHPx-GI*. *J. Biol. Chem.* 268(4) : 2571-2576
- Chua K.Y., Doyle C.R., Simpson R.J., Turner K.J., Stewart G.A. and Thomas W.R.** (1990) : Isolation of cDNA coding for the major mite allergen *Der p II* by IgE plaque immunoassay. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 91 : 118-123

- Coleman J.L., Gebbia J.A., Piesman J., Degen J.L., Bugge T.H. and Benach J.L.** (1997) : Plasminogene is required for efficient dissemination of *Borrelia burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell* 89 : 1111-1119
- Colloff M.J. and Spieksma F.Th.M.** (1992) : Pictorial keys for the identification of domestic mites. *Clin. Exp. Allergy* 22 : 823-830
- Coombs G.H. and Mottram J.C.** (1997) : Parasite proteinases and amino acid metabolism : possibilities for chemotherapeutic exploitation. *Parasitology* 114 : S61-S80
- Coons L.B., Rosell-Davies R. and Tarnowski B.I.** (1986) : Bloodmeal digestion in ticks. In : Morphology, physiology, and behavioural biology of ticks (Sauer J.R. and Hair J.A. eds). Ellis Horwood Ltd, Chichester, pp 248-271
- Coons L.B. and Alberti G.** (1999) : Acari : Ticks. In : Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol. 8B, Chelicerate Arthropoda (Harrison FW and Foelix RF eds.) pp. 267-515
- Cotty A., Aeschlimann A. and Schneeberger S.** (1986) : Distribution et fluctuation de populations d'*Ixodes ricinus* (L.), *Haemaphysalis punctata* (can. Franz.) et *Dermacentor marginatus* (Sulzer) (Acarina, Ixodidae) en Suisse. *Bull. Soc. Entomol. Suisse* 59 : 139-150
- Dainichi T., Maekawa Y., Ishii K. and Himeno K.** (2001) : Molecular cloning of a cystatin from parasitic intestinal nematode, *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Med. Invest.* 48 (1-2) 81-87
- Das S., Marcantonio N., DePonte K., Telford II S.R., Anderson J.F., Kantor F.R. and Fikrig E.** (2000) : *Salp16*, a gene induced in *Ixodes scapularis* salivary glands during tick feeding. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 62(1) : 99-105
- Das S., Banerjee G., DePonte K., Marcantonio N., Kantor F.S. and Fikrig E.** (2001) : *Salp25D*, an *Ixodes scapularis* antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. *J. Inf. dis.* 184(8) : 1056-64
- De Silva A.M., Telford III S.R., Brunet L.R., Barthold S.W. and Fikrig E.** (1996) : *Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission blocking Lyme disease vaccine. *J. Exp. Medicine* 183(1) : 271-275
- Duncan J.T.** (1926) : On a bactericidal principle present in the alimentary canal of insects and arachnids. *Parasitology* 18 : 238-252
- Eisemann C.H. and Binnington K.C.** (1994) : The peritrophic membrane : its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. *Int. J. Parasitol.* 24(1) : 15-26
- Elvin C.M. and Kemp D.H.** (1994) : Generic approaches to obtaining efficacious antigens from vector arthropods. *Int. J. Parasitol.* 24 : 67-79
- Elvin C.M., Vuocolo T., Pearson R.D., East I.J., Riding G.A., Eisenmann C.H. and Tellam R.L.** (1996) : Characterization of a major peritrophic membrane protein, peritrophin-44, from the larvae *Lucilia cuprina*. *J. Biol. Chem.* 271(15) : 8925-8935

- Eriksson T.L.J., Johansson E., Whitley P., Schmidt M., Elsayed S. and Van Hage-Hamsten M.** (1998) : Cloning and characterization of a group II allergen from the dust mite *Tyrophagus putrescentiae*. *Eur. J. Bioch.* 251 : 443-447
- Esworthy R.S., Doan K., Doroshov J.H. and Chu F.** (1994) : Cloning and sequencing of the cDNA encoding a human testis phospholipid glutathione peroxidase. *Gene* 144 : 317-318
- Etienne J.** (1998) : Biochimie génétique. Biologie moléculaire. 4^{ème} édition. Ed. Masson, Paris. pp. 117-118
- Fogaça A.C., da Silva P.I.jr, Miranda M.T.M., Bianchi A.C., Miranda A., Ribolla P.E.M. and Daffre S.** (1999) : Antimicrobial activity of a bovine Hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 274(36) : 25330-334
- Freije J.P., Balbin M., Abrahamson M., Velasco G., Dalboge H., Grubb A. and Lopez Otin C.** (1993) : Human cystatin D, cDNA cloning, characterization of the *Escherichia Coli* expressed inhibitor, and identification of the native protein in saliva. *J. Biol. Chem* 268 (21) : 15737-15744
- Frohman M.A.** (1994) : Rapid Amplification of cDNA Ends. In : The polymerase chain reaction (Mullis K.B., Ferré F and Giggis R.A. eds). Birkäuser Boston. p. 14-37
- Gern L., Diehl P.A., Humair P.F., Vlimant M., Barton T.R., Nuttall P.A. and Randolph S.E.** (1995) : Examination of Eurasian *Ixodes* species for evidence of a peritrophic membrane. In : Proceedings and abstracts from the Second International Conference on Tick-borne Pathogens at the host-vector interface : a global perspective. Coons L. and Rothschild M. (eds). P. 359
- Gigon F.** (1985) : Biologie d'*Ixodes ricinus* L. sur le Plateau suisse - une contribution à l'écologie de ce vecteur. Thèse. Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel.
- Girardin Ph.** (1987) : Immunité du lapin contre la tique *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea, Ixodidae) : mécanismes effecteurs et leurs effets sur la biologie de l'ectoparasite. Thèse. Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel.
- Gough J.M. and Kemp D.H.** (1995) : Acid phosphatase in midgut digestive cells in partially fed females of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J. Parasitol.* 81(3) : 341-349
- Graf J.-F.** (1978a) : Copulation, nutrition et ponte chez *Ixodes ricinus* L. (Ixodidea : Ixodinae) 1^{ère} partie. *Bull. Soc. Entomol. Suisse* 51 : 89-97
- Graf J.-F.** (1978b) : Copulation, nutrition et ponte chez *Ixodes ricinus* L. (Ixodidea : Ixodinae) 3^{ème} partie. *Bull. Soc. Entomol. Suisse* 51 : 241-253
- Graf J.-F.** (1978c) : Copulation, nutrition et ponte chez *Ixodes ricinus* L. (Ixodidea : Ixodinae) 3^{ème} partie. *Bull. Soc. Entomol. Suisse* 51 : 343-360
- Grandjean O.** (1984) : Blood digestion in *Ornithodoros moubata* females. I. Biochemical changes in the midgut lumen and ultrastructure of the midgut cell, related to intracellular digestion. *Acarologia* 25(2) : 147-165
- Groot P.C. and Van Oost B.A.** (1998) : Identification of fragments of human transcripts from a defined chromosomal region : representational difference analysis of somatic cell hybrids. *Nucl. Ac. Res.* 26(19) : 4476-4481

Hakkaart G.A., Aalberse R.C. and Van Ree R. (1997) : Lack of lysozyme activity of natural and yeast-derived recombinant Der p 2. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 144 (2) : 202-204

Halton D.W. (1997) : Nutritional adaptations to parasitism within the platyhelminthes. *Int. J. Parasitol.* 27 : 693-704

Hamilton J.V., Munks R.J.L., Lehane S.M. and Lehane M.J. (2001) : Regulation of midgut defensin production in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Ins. Mol. Biol.* 10(6) : 561-571

Hamilton J.V., Munks R.J.L., Lehane S.M. and Lehane M.J. (2002) : Association of midgut defensin with a novel serine protease in the blood-sucking fly *Stomoxys calcitrans*. *Ins. Mol. Biol.* 11(3) : 197-205

He H., Chen A.C., Davey R.B., Ivie G.W. and George J.E. (1999) : Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae). *Ins. Bioch. Mol. Biol.* 29(8) : 737-43

Hindle E. and Duncan J.T. (1925) : The viability of Bacteria in *Argas persicus*. *Parasitology* 27 : 434-446

Hoogstraal H. and Aeschlimann A. (1982) : Tick-host specificity. *Bull. Soc. Entomol. Suisse* 55 : 5-32

Hubank M. and Schatz D.G. (1994) : Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucl. Ac. Res.* 22(25) : 5640-5648

Hubank M. and Schatz D.G. (1999) : cDNA Representational difference analysis : a sensitive and flexible method for identification of differentially expressed genes. *Methods Enzymol.* 303 : 325-349

Huh C., Nagle J.W., Kozak C.A., Abrahamson M. and Karlsson S. (1995) : Structural organization, expression and chromosomal mapping of the mouse cystatin-C-encoding gene (*Cst3*). *Gene* 152 : 221-226

Ichikawa S., Hatanaka H., Yuuki T., Iwamoto N., Kojima S., Nishiyama C., Ogura K., Okumura Y. and Inagaki F. (1998) : Solution structure of *Der f 2*, the major mite allergen for atopic disease. *J. Biol. Chem.* 273(1) : 356-360

Jaworski D.C., Barker D.M., Williams J.P., Sauer J.R., Ownby C.L. and Hair J.A. (1983) : Age-related changes in midgut ultrastructure and surface tegument of unfed adult lone star ticks. *J. Parasitol.* 69(4) : 701-708

Jaworski D.C., Jasinkas A., Metz C.N., Bucala R. and Barbour A.G. (2001) : Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor in the tick *Amblyomma americanum*. *Ins. Mol. Biol.* 10(4) : 323-331

Johns R., Ohnishi J., Broadwater A., Sonenshine D.E., de Silva A.M. and Hynes W.L. (2001) : Contrasts in tick immune response to *Borrelia burgdorferi* challenge : immunotolerance in *Ixodes*

scapularis versus immunocompetence in *Dermacentor variabilis* (Acari : Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 38(1) : 99-107

Joubert A.M., Louw A.I., Joubert F. and Neitz A.W.H. (1998) : Cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding factor Xa inhibitor from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Exp. Appl. Acarol.* 22 : 603-619

Kaufman W. and Sauer J. (1982) : Ion and water balance in feeding ticks : Mechanisms of tick excretion. In : Physiology of ticks (Obenchain F.D. and Galun R. eds.) Pergamon Press, Oxford, p. 197-211

Kawamoto S., Mizuguchi Y., Morimoto K., Aki T., Shigeta S., Yasueda H., Wada T., Susuki O., Jyo T. and Ono K. (1999) : Cloning and expression of *Der f 6*, a serine protease allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *Bioch. Biophys. Acta.* 1454 : 201-207

Keene W.E., Pettitt M.G., Allen S. and McKerrow J.H. (1986) : The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 163 : 536-549

Kirchhoff C., Osterhoff C. and Young L. (1996) : Molecular cloning and characterization of *HE1*, a major secretory protein of the human epididymis. *Biol. Reprod.* 54 : 847-856

Koh K., Mori T., Shiraishi S. and Uchida T.A. (1991) : Ultrastructural changes of the midgut epithelial cells in feeding and moulting nymphs of the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Int. J. Parasitol.* 21(1) : 23-36

Komatsu H., Okayasu I., Mitomi H., Imai H., Nakagawa Y. and Obata F. (2001) : Immunohistochemical detection of human gastrointestinal glutathione peroxidase in normal tissues and cultured cells with novel mouse monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 49 : 759-766

Kopacek P., Vogt R., Jindrak L., Weise C. and Safarik I. (1999) : Purification of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Ins. Bioch. Mol. Biol.* 29 : 989-997

Kuhn K.H., Rittig M., Häupl T., Burgmester G.R. (1994) : Haemocytes of the hard tick *Ixodes ricinus* express coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi*. *Dev. Comp. Immunol.* 18 : S115

Larsen L.B., Ravn P., Boisen A., Berglund L. and Petersen T. (1997) : Primary structure of *EPV20*, a secretory glycoprotein containing a previously uncharacterized type of domain. *Eur. J. Biochem.* 243 : 437-441

Le Boulay C., Van Wormhoudt A., and Sellos D. (1998) : Cathepsin L gene organization in crustaceans. *Gene* 218(1-2) : 77-84

Leboulle G., Rochez C., Louahed J., Rutti B., Brossard M., Bollen A. and Godfroid E. (2002a) : Isolation of *Ixodes ricinus* salivary gland mRNA encoding factors induced during blood feeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66(3) : 225-233

Leboulle G., Crippa M., Decrem Y., Mejri N., Brossard M., Bollen A. and Godfroid E. (2002b) : Characterization of a novel immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *J. Biol. Chem.* 277(12) : 10083-9

Li F., An H., Seymour T.A., Bradford C.S., Morrissey M.T., Bailey G.S., Helmrich A. and Barnes D.W. (1998) : Molecular cloning, sequence analysis and expression distribution of rainbow

trout (*Oncorhynchus mykiss*) cystatin C. *Comp Bioch. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 121(2) : 135-43

Liyou N., Hamilton S., Elvin C. and Willadsen P. (1999) : Cloning and expression of ecto-nucleotidase from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Ins. Mol. Biol.* 8(2) : 257-266

Liyou N., Hamilton S., McKenna R., Elvin C. and Willadsen P. (2000) : Localisation and functional studies on the 5'-nucleotidase of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp. Appl. Acarol.* 24(3) : 235-246

Lopez-Ordenez T., Rodriguez M.H. and De la Cruz Hernandez-Hernandez F. (2001) : Characterization of a cDNA encoding a cathepsin L-like protein of *Rhodnius prolixus*. *Ins. Mol. Biol.* 10(5) : 505-511

Luaces A.L and Barrett A.J. (1988) : Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* 259(3) : 903-909

Lustigman S., Brotman B., Huima T., Price A. and McKerrow J. (1992) : Molecular cloning and characterization of Onchocystatin, a cysteine proteinase inhibitor of *Onchocerca volvulus*. *J. Biol. Chem.* 267 (24) : 17339-1346

Lustigman S., McKerrow J.H., Shah K., Lui J., Huima T., Hough M. and Brotman B. (1996) : Cloning of a cystein protease required for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae. *J. Biol. Chem.* 271 (47) : 30181-30189

Maniatis T., Sambrook J. and Fritsch E.F. (1989) : Molecular cloning. A laboratory Manual. Second Edition. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp I.25 – I.28

Manoury B., Gregory W.F., Maizels R.M. and Watts C. (2001) : *Bm-CPI-2*, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. *Curr. Biol.* 11 (6) : 447-51

McKerrow J.H. (1989) : Parasite proteases. *Exp. Parasitol.* 68 : 111-115

Meister A. (1988) : Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263(33) : 17205-17208

Mendiola J., Alonso M., Marquetti M.C. and Finlay C. (1996) : *Boophilus microplus* : multiple proteolytic activities in the midgut. *Exp. Parasitol.* 82 : 27-33

Mulenga A., Sugimoto C. and Onuma M. (1999a) : Characterization of proteolytic enzymes expressed in the midgut of *Haemaphysalis longicornis*. *Jpn J. Vet. Res.* 46(4) : 179-184

Mulenga A., Sugimoto C., Ingram G., Ohashi K. and Onuma M. (1999b) : Molecular cloning of two *Haemaphysalis longicornis* cathepsin L-like cysteine proteinase genes. *J. Vet. Med. Sci.* 61(5) : 497-502

Mulenga A., Sugimoto C., Ingram G., Ohashi K. and Misao O. (2001) : Characterization of two cDNAs encoding serine proteinases from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Ins. Bioch. Mol. Biol.* 31 : 817-825

- Munderloh U.K. and Kurtti T.J.** (1995) : Cellular and molecular interrelationships between ticks and prokaryotic-borne pathogens. *Ann. Rev. Entomol.* 40 : 221-243
- Myungjo Y., Xuan X., Tsuji N., Kamio T., Igarashi I., Nagasawa H., Mikami T. and Fujisaki K.** (2001) : Molecular characterization of a troponin I-like protein from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Ins. Bioch. Mol. Biol.* 32(1) : 67-73
- Nakajima Y., Van der Goes Van Naters-Yasui A., Taylor D. and Yamakawa M.** (2001) : Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari : Argasidae). *Ins. Bioch. Mol. Parasitol.* 31 : 747-751
- Nakamura Y., Takayama N., Minamitani T., Ikuta T., Ariga H. and Matsumoto K.** (2000) : Primary structure, genomic organization and expression of the major secretory protein of murine epididymis, *ME1*. *Gene* 251 : 55-62
- Newlands G.F., Skuce P.J., Knox D.P. and Smith W.D.** (2001) : Cloning and expression of cystatin, a potent cysteine protease inhibitor from the gut of *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 122 (3) : 371-8
- Ni J., Alvares Fernandez M., Danielsson L., Chillakuru R.A., Zhang J., Grubb A., Su J., Gentz R. and Abrahamson M.** (1998) : Cystatin F is a glycosylated human low molecular cysteine proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 273 : 24797-24804
- Nisbet A.J. and Billingsley P.F.** (1999) : Immunological control of scab mites : digestive enzymes as candidate compounds. *Vet. Parasitol.* 83 : 231-239
- Nisbet A.J. and Billingsley P.F.** (2000) : A comparative survey of the hydrolytic enzymes of ectoparasitic and free-living mites. *Int. J. Parasitol.* 30 : 19-27
- Oaks J.F., McSwain J.L., Bantie J.A., Essenberg R.C., and Sauer J.R.** (1991) : Putative new expression of genes in Ixodid tick salivary gland development during feeding. *J. Parasitol.* 77(3) : 378-383
- Oliveira M.F., Silva J.R., Dansa-Petretski M.D., de Souza W., Lins U., Braga C.M.S., Masuda H. and Oliveira P.L.** (1999) : Haem detoxification by an insect. *Nature* 400 : 517
- Olsson S.I., Pihlgren U., Ploen L. and Bjork I.** (2000) : Tissue distribution of bovine cystatin C analysed by in situ hybridisation. *Eur. J. Histochem.* 44 (2) : 171-8
- Park G.M., Lee S.M., Lee I.Y., Ree H.I., Kim K.S., Hong C.S. and Yong T.S.** (2000) : Localization of a major allergen *Der p 2*, in the gut and faecal pellets of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin. Exp. All.* 30 : 1293-1297
- Pascoa V., Oliveira P.L., Dansa-Petretski M., Silva J.R., Alvarenga P.H., Jacobs-Lorena M. and Lemos F.J.A.** (2002) : *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Ins. Bioch. Mol. Biol.* 32 : 517-523
- Peters W.** (1992) : Peritrophic membranes. Springer-Verlag, Berlin.
- Podboronov V.M.** (1991) : Antibacterial protective mechanisms of Ixodoid ticks. *In* : Modern Acarology, vol. 2. Dusbabek and Bukva (eds.), Prague. pp. 375-380

- Potterat O., Hostettmann K., Hölzel A., Jung G., Diehl P.A. and Petrini O.** (1997) : Boophiline, an antimicrobial sterol amide from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Helv. Chim. Acta* 80 : 2066-2072
- Pushpa-Rekha T.R., Burdsall A.L., Oleksa L.M., Chisolm G.M. and Driscoll D.M.** (1995) : Rat Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 270(45) : 26993-23999
- Reed C.H.** (2000) : Diagnostic applications of cystatin C. *Br. J. Biomed. Sci.* 57 (4) : 323-9
- Renard G., Garcia J.F., Cardoso F.C., Richter M.F., Sakanari J.A., Ozaki L.S., Termignoni C. and Masuda A.** (2000) : Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Ins. Bioch. Mol. Biol.* 30 : 1017-26
- Renard G., Alves Lara F., Cardoso de Cardoso F., Costa Miguens F., Dansa-Petretski M., Termignoni C. and Masuda A.** (2002) : Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Ins. Mol. Biol.* 11(4) : 325-328
- Reynolds E.S.** (1963) : The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17 : 208-212
- Rhoads M.L. and Fetterer R.H.** (1996) : Extracellular matrix degradation by *Haemonchus contortus*. *J. Parasitol.* 82 : 379-383
- Ribeiro M.C** (1988) : The midgut hemolysin of *Ixodes dammini* (Acari : Ixodidae). *J. Parasitol.* 74(4) : 532-537
- Richards A.G. and Richards P.A.** (1977) : The peritrophic membranes of insects. *Acta Trop. (Basel)* 32 : 83-95
- Riding G.A., Jarmey J., McKenna R.V., Pearson R., Cobon G.S. and Willadsen P.** (1994) : A protective « concealed » antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization and possible function. *J. Immunol.* 153 : 5158-5166
- Rosa de Lima M.F, Sanchez Ferreira C.A, Joaquim de Freitas D.R., Valenzuela J.G. and Masuda A.** (2002) : Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae) glutathione S-transferase. *Ins. Bioch. Mol. Biol.* 32 : 747-754
- Rudzinska M.A., Spielman A., Lewengrub S., Piesman J. and Karakashian S.** (1982) : Penetration of the peritrophic membrane of the tick by *Babesia microti*. *Cell. Tissue Res.* 221 : 471-481
- Sajid M. and McKerrow J.H.** (2002) : Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Bioch. Parasitol.* 120 : 1-21
- Samson K.** (1909) : Zur Anatomie und Biologie von *Ixodes ricinus* L. *Z. Wiss. Zool.* 93 : 185-236
- Sangamnatdej S., Paesen G.C., Slovak M. and Nuttall P.A.** (2002) : A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Ins. Mol. Biol.* 11(1) : 79-86
- Schmidt G.P. and Roberts L.S.** (1985) : Foundation of parasitology. Third Edition. Times Mirror/Mosby College Publishing. p.594

- Schmidt M., Olsson S., Van der Ploeg I. and Hage-Hamsten M.** (1995) : cDNA analysis of the mite allergen *Lep d 1* identifies two different isoallergens and variants. *FEBS Lett.* 370 : 11-14
- Schorderet S., Pearson R.D., Vuocolo T., Eisemann C. and Riding G.A.** (1998) : cDNA and deduced amino acid sequences of a peritrophic membrane glycoprotein, "peritrophin-48", from the larvae of *Lucilia cuprina*. *Ins. Biochem. Mol. Biol.* 28(2) 99-111
- Shao L., Devenport M. and Jacobs-Lorena M.** (2001) : The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch. Ins. Bioch. Physiol.* 47 : 119-125
- Smith W., Mills K., Hazell L., Hart B. and Thomas W.** (1999) : **Molecular analysis of the group 1 and 2 allergens from the house dust mite, *Euroglyphus maynei*.** *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118(1) : 15-22
- Sonenshine D.E.** (1991) : Biology of Ticks, vol.1. Oxford University Press, Oxford.
- Soubes S.C., Liu X. and Miller L.H.** (1999) : Representational difference analysis of cDNA between two Dd2 clones of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Bioch. Parasitol.* 101 : 217-221
- Stewart G., Bird C.H. and Thompson P.J.** (1992) : Do the group II dust mite allergens correspond to lysozyme ? *J. All. Clin. Immunol.* 90 : 141-142
- Sueyoshi T., Miyata T., Hashimoto N., Kato H., Hayashida H., Miyata T. and Iwanaga S.** (1987) : Bovine high molecular weight kininogen. *J. Biol. Chem.* 262 (6) : 2768-2779
- Tang L., Gounaris K., Griffiths C. and Selkirk M.E.** (1995) : Heterologous expression and enzymatic properties of a selenium-independant glutathione peroxidase from the parasitic nematode *Brugia pahangi*. *J. Biol. Chem.* 270(31) : 18313-318
- Tarnowski B.I. and Coons L.B.** (1989) : Ultrastructure of the midgut and blood meal digestion in the adult tick *Dermacentor variabilis*. *Exp. Appl. Acarol.* 6 : 263-289
- Tatchell R.J., Araman S.F. and Boctor F.N.** (1972) : Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Protease activity in *Argas (Persicargas) persicus* (Oken) and *A. (P.) arboreus* Kaiser, Hoogstraal, and Kohls (Argasidae). *Z. Parasitenk.* 39 : 345-350
- Tellam R.L., Wijffels G. and Willadsen P.** (1999) : Peritrophic matrix proteins. *Ins. Bioch. Mol. Biol.* 29 : 87-101
- Thomas W.R. and Smith W.** (1998) : An update on allergens : house-dust-mite allergens. *Allergy* 53 : 821-832
- Towbin H., Staehelin T. and Gordon J.** (1979) : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *PNAS USA* 76 : 4350-4355
- Trudinger M., Chua K.Y. and Thomas W.R.** (1991) : cDNA encoding the major mite allergen *Der f II*. *Clin. Exp. Allergy* 21 : 33-37
- Tsuji N., Kamio T., Isobe T. and Fujisaka K.** (2001) : Molecular characterization of a peroxiredoxin from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Ins. Mol. Biol.* 10(2) : 121-129

- Turk V. and Bode W.** (1991) : The cystatins : protein inhibitors of cystein proteinases. *FEBS letters*, 285 (2) : 213-219
- Turrian-Vittoz M. and Humair P.-F.** (1990) : Importance du rôle des micromammifères et des oiseaux dans la borréliose de Lyme. Mémoire de licence. Faculté des sciences. Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel
- Valenzuela J.G., Charlab R., Mather T.N. and Ribeiro J.M.C.** (2000) : Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 275(25) : 18717-18723
- Valenzuela J.G., Francischetti I.M.B., Pham V.M., Garfield M.K., Mather T.N. and Ribeiro J.M.C.** (2002) : Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J. Exp. Biol.* 205 : 2843-2864
- Van de Locht A., Stubbs M.T., Bode W., Friedrich T., Bollschweiler C., Höffken W. and Huber R.** (1996) : The crystal structure, a key to the TAP enigma ? *EMBO J.* 15 : 6011-6017
- Van Hage-Hamsten M., Olsson S., Emilson A., Härfast B., Svensson A. and Scheynius A.** (1995) : Localization of major allergens in the dust mite *Lepidoglyphus destructor* with confocal laser scanning microscopy. *Clin. Exp. All.* 25 : 536-542
- Varela J., Ventas P., Carreira J., Barbas J., Giminez-Gallego G. and Polo F.** (1994) : Primary structure of *Lep d 1*, the main *Lepidoglyphus destructor* allergen. *Eur. J. Biochem.* 225 : 93-98
- Vundla W.R.M., Brossard M., Pearson D. and Labongo** (1992) : Characterization of aspartic proteinases from the gut of the tick, *Ripicephalus appendiculatus*. *Ins. Bioch. Mol. Biol.* 22 : 405-410
- Wharton G.W. and Brody A.R.** (1972) : The peritrophic membrane of the mite, *Dermatophagoides farinae* : Acariformes. *J. Parasitol.* 58 : 801-804
- Waxman L. and Connolly T.M.** (1993) : Isolation of an inhibitor selective for the collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J. Biol. Chem.* 268 : 5445-5449
- Weiss B.L., Stepczynski J.M., Wong P. and Kaufman W.R.** (2002) : Identification and characterization of genes differentially expressed in the testis/vas deferens of the fed male tick, *Amblyomma hebraeum*. *Ins. Bioch. Mol. Biol.* 32 : 785-793
- Wikel S.K.** (1996) : Host immunity to ticks. *Ann. Rev. Entomol.* 41 : 1-22
- Willadsen P., Riding G.A., McKenna R.V., Kemp D.H., Tellam R.L., Nielsen J.N., Lahstein J., Cobon G.S. and Gougu J.** (1989) : Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J. Immunol.* 143 : 1346-1351
- Williams D.L., Pierce R.J., Cookson E. and Capron A.** (1991) : Molecular cloning and sequencing of glutathione peroxidase from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Bioch. Parasitol.* 52 : 127-130
- Yang J., Yamamoto M., Ishibashi J., Taniai K. and Yamakawa M.** (1998) : Isolation, cDNA and gene expression of an antibacterial protein from the larvae of the coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*. *Eur. J. Bioch.* 255 : 734-738

Zhu Z. (1998) : Histological observations on *Borrelia burgdorferi* growth in naturally infected female *Ixodes ricinus*. *Acarologia* 39 : 11-22

Zhu Z., Gern L. and Aeschlimann A. (1991) : The peritrophic membrane of *Ixodes ricinus*. *Parasitol. Res.* 77 : 635-641

Zung J.L. (1989) : Fine structural evidence for the penetration of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dammini*. *Can. J. Zool.* 67 : 1737-1748

VI. Remerciements

Je désire remercier ici toutes celles et ceux qui d'une façon ou d'une autre se sont trouvés impliqués dans ce travail.

Je remercie tout d'abord le Professeur Bruno Betschart, directeur de thèse, de m'avoir donné la possibilité de faire un travail de recherche en biologie moléculaire sur les tiques dans son laboratoire. Ma gratitude s'adresse également au Professeur Peter-Allan Diehl pour son intérêt témoigné tout au long de ce travail ainsi que pour les divers articles fournis. Je leur suis également très reconnaissant de m'avoir permis de partager avec eux et leurs collègues l'expérience de l'enseignement universitaire en m'engageant comme assistant.

Je tiens à adresser un merci tout particulier à Michèle Vlimant pour sa bonne humeur, son intérêt et pour tout le travail considérable qu'elle a abattu pour la partie de ce travail concernant la microscopie électronique.

Un très grand merci à Gérard Leboulle, de l'Université libre de Bruxelles, dont la correspondance régulière par mail m'a permis de réaliser avec succès bon nombre de techniques moléculaires.

Je remercie ici aussi mes collègues et amis qui ont contribué à faire de ces quatre années des moments très agréables: Valérie Brunisholz, Mara Crippa et Pierre-François Humair.

Un merci tout particulier à Mara Crippa pour ces quatre années d'enseignement passées ensemble avec les étudiants qui ont été très enrichissantes.

Merci également à Olivier Rais pour son aide dans la manipulation des tiques, lapins et souris et pour l'immunisation.

Un merci également à Veronique Douhet-Orhant, pour m'avoir soutenu lors de changements d'orientation de ce travail, et à Jean-Luc Perret pour son aide dans la résolution de problèmes informatiques ainsi que pour sa bonne humeur.

Merci à Fayçal Azzouz pour son aide lors de certaines étapes de ce travail.

Je remercie vivement Brigitte et Natacha, les deux meilleures secrétaires du monde. Un merci tout particulier à Brigitte pour son aide dans les problèmes administratifs, l'impression couleur, et pour les soirées pleines de rire !

Enfin, merci à Gabriel Baertschi pour m'avoir incité à reprendre et continuer son travail de diplôme, et pour tout le « débroussaillage » qu'il a fait.

Merci également à mes parents pour m'avoir donné la possibilité de faire tout ce chemin dans ce domaine passionnant qu'est la biologie. Merci infiniment à Isaline pour tout ce qu'elle est.