

**Polarisation Th2 de la réponse immunitaire des
souris infestées par les tiques *Ixodes ricinus*,
infectées ou non par *Borrelia burgdorferi*.**

par
Martine Christe
Diplômée en biologie

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

1997

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

**Polarisation Th2 de la réponse immunitaire des
souris infestées par les tiques *Ixodes ricinus*
infectées ou non par *Borrelia burgdorferi***

de Mme Martine Christe

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

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

Mme Lise Gern, MM. M. Brossard (directeur de thèse),
B. Rutti, P. Launois (WHO, Uni. de Lausanne) et
L. Mbow (Colorado State Uni. USA)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 10 mars 1998

Le doyen:



F. Stoeckli

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	1
1.1. LES TIQUES: PARASITES ET VECTEURS DE MALADIES	1
1.2. SYSTEMATIQUE ET BIOLOGIE DES TIQUES.....	2
1.2.1. <i>Ixodes ricinus</i>	3
1.3. LES COMPOSANTS DE LA SALIVE DES TIQUES.....	3
1.4. LES REPONSES IMMUNOLOGIQUES DE L'HOTE SUITE AUX PIQURES DES TIQUES	6
1.4.1. <i>La composante humorale</i>	6
1.4.2. <i>La composante cellulaire</i>	7
1.4.2.1. <i>Transfert de cellules</i>	7
1.4.2.2. <i>Etudes histologiques</i>	8
1.4.2.3. <i>Souris déficientes en mostocytes</i>	8
1.4.2.4. <i>Drogues immunosuppressives</i>	8
1.4.2.5. <i>Tests cutanés</i>	9
1.4.3. <i>Le système complément</i>	10
1.5. POLARISATION TH1/TH2	10
1.6. MODULATION DE LA REPONSE IMMUNOLOGIQUE.....	14
1.7. FONCTIONS ET PROPRIETES DES CYTOKINES CONSIDEREES DANS CE TRAVAIL.....	15
1.7.1. <i>L'interleukine 4 (IL-4)</i>	15
1.7.2. <i>L'interleukine 12 (IL-12)</i>	15
1.7.3. <i>L'interféron-γ (IFN-γ)</i>	16
1.8. ASSOCIATION SOURIS-NYMPHES D' <i>I. ricinus</i> ET <i>B.-burgdorferi</i>	16
1.9. BUTS DU TRAVAIL	18
2. MATERIEL ET METHODES	19
2.1. ANIMAUX	19
2.1.1. <i>Tiques</i>	19
2.1.2. <i>Souris</i>	19
2.2. INFESTATIONS.....	20
2.3. PRISE DE SANG	21

TABLE DES MATIERES

2.4. PREPARATION DES EXTRAITS ANTIGENIQUES.....	21
2.4.1. <i>Extrait de tiques</i>	21
2.4.2. <i>Extrait de B. burgdorferi</i>	22
2.5. CULTURE CELLULAIRE.....	22
2.5.1. <i>Dissection des souris et prélèvement des ganglions</i>	22
2.5.2. <i>Culture</i>	23
2.6. IMMUNOBLOT	23
2.7. ELISA	24
2.7.1. <i>ELISA cytokines</i>	24
2.7.2. <i>ELISA IgE</i>	24
2.7.3. <i>ELISA IgG et IgG2a anti-borrelia</i>	25
2.8. PREPARATION DES ANTI-CYTOKINES IL-4 ET IFN- γ	25
2.8.1. <i>Préparation</i>	25
2.8.2. <i>Injections</i>	25
2.9. INTERLEUKINE 12 RECOMBINANTE.....	26
2.9.1. <i>Schéma de l'expérience</i>	26
2.10. EXPERIENCE AVEC <i>BORRELIA BURGDORFERI</i>	27
2.10.1. <i>Nymphes infectées par B. burgdorferi</i>	27
2.10.2. <i>Injections de B. burgdorferi</i>	27
2.11. TRAITEMENTS STATISTIQUES.....	27
3. RESULTATS	29
3.1. TROIS INFESTATIONS SUCCESSIVES DES SOURIS BALB/c (H-2d), C57BL/6 (H-2b), OU C3H (H-2k) PAR LES NYMPHES D'<i>I. ricinus</i>	29
3.1.1. <i>BIOLOGIE DES NYMPHES D'<i>I. RICINUS</i> ET EVOLUTION DES IGE TOTALES</i>	29
3.1.2. <i>PRODUCTION DES IGG</i>	32
3.2. CONSTITUTION GENETIQUE ET POLARISATION TH2 DE LA REPONSE IMMUNOLOGIQUE DES SOURIS INFESTEES PAR LES NYMPHES D'<i>I. ricinus</i>.....	33
3.3. CHARGE PARASITAIRE ET POLARISATION TH2 DE LA REPONSE IMMUNOLOGIQUE DES SOURIS BALB/c INFESTEES PAR LES NYMPHES D'<i>I. ricinus</i>.....	33

TABLE DES MATIERES

3.4. INJECTIONS D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-IL-4 OU ANTI-IFN-γ A DES SOURIS BALB/c INFESTEES PAR LES NYMPHES OU LES LARVES D'<i>I. ricinus</i>: EFFETS SUR LA BIOLOGIE DES TIQUES, L'EVOLUTION DES IgE TOTALES ET LA PRODUCTION DES CYTOKINES IL-4 ET IFN-γ	35
3.4.1. BIOLOGIE DES NYMPHES ET EVOLUTION DES IGE TOTALES.....	35
3.4.2. BIOLOGIE DES LARVES ET EVOLUTION DES IGE TOTALES.....	39
3.4.3. PRODUCTION <i>IN VITRO</i> DES CYTOKINES IL-4 ET IFN- γ	39
3.4.4. PRODUCTION DES IGG.....	44
3.5. EFFET D'UN TRAITEMENT DES SOURIS C3H AVEC DE L'IL-12 RECOMBINANTE.	45
3.5.1. BIOLOGIE DES NYMPHES ET EVOLUTION DES IGE TOTALES.....	45
3.5.2. PRODUCTION DES CYTOKINES IL-4 ET IFN- γ	45
3.6. INOCULATION DE <i>B. burgdorferi</i> A DES SOURIS BALB/c, DES SOURIS BALB/c DEFICIENTES EN IL-4 ET DES SOURIS C3H PAR LES NYMPHES D'<i>I. ricinus</i> INFECTEES OU PAR DES INJECTIONS DE SPIROCHETES.....	49
3.6.1. INFESTATIONS AVEC DES NYMPHES D' <i>I. RICINUS</i> INFECTEES PAR <i>B. BURGDORFERI</i>	49
3.6.2. SOURIS INFESTEES PAR LES NYMPHES INFECTEES PAR <i>B. BURGDORFERI</i> : PRODUCTION DES CYTOKINES IL-4 ET IFN- γ	49
3.6.3. INJECTIONS SOUS-CUTANEEES DE <i>B. BURGDORFERI</i> AUX SOURIS: PRODUCTION DES CYTOKINES IL-4 ET IFN- γ	51
3.6.4. PRODUCTION DES ANTICORPS.....	51
3.6.4.1. Détection par immunoblot des anticorps IgG anti-tiques	51
3.6.4.2. Détection par ELISA des anticorps IgG et IgG2a anti-borréliés après trois infestations par des nymphes d' <i>I. ricinus</i> infectées par <i>B. burgdorferi</i>	53
3.6.4.3. Détection par ELISA des anticorps IgG et IgG2a anti-borréliés après trois injections de <i>B. burgdorferi</i>	53
3.6.4.4. Détection par immunoblot des anticorps IgG et IgG2a anti-borréliés après trois infestations par les nymphes d' <i>I. ricinus</i> infectées par <i>B. burgdorferi</i> ou après trois injections de <i>B. burgdorferi</i>	53
3.6.3.5. IgE totales après trois infestations par des nymphes d' <i>I. ricinus</i> infectées par <i>B. burgdorferi</i>	59
3.6.3.6. IgE totales après trois injections de <i>B. burgdorferi</i>	59

TABLE DES MATIERES

4. DISCUSSION	63
4.1. IMMUNITE ANTI-TIQUES	63
4.1.1. <i>Résistance</i>	63
4.1.2. <i>Polarisation Th1 ou Th2?</i>	64
4.1.3. <i>Immunomodulation</i>	66
4.1.4. <i>Polarisation Th2</i>	68
4.2. IMMUNITE ANTI-BORRELIES	70
5. RESUME ET CONCLUSION	74
6. BIBLIOGRAPHIE	75

REMERCIEMENTS

1. INTRODUCTION

1.1. Les tiques: parasites et vecteurs de maladies

Ectoparasites hématophages, les tiques représentent des sources d'ennuis importants dans le monde entier, tant pour les hommes que pour les animaux.

Certaines espèces d'Ixodides sont responsables de pertes économiques importantes dans le domaine de la production de viande, de cuir ou de laine (Steelman, 1976): soit en raison d'infestations massives provoquant des anémies et des dégâts aux peaux des bovins (Springell, 1983), soit par l'injection de toxines salivaires induisant des paralysies (Binnington & Kemp, 1980).

En tant que vecteurs, les tiques sont également très redoutées car elles transmettent, par la salive, un grand nombre de micro-organismes. Elles sont classées au premier rang des vecteurs de pathogènes pour le bétail et en deuxième position, après les moustiques, en ce qui concerne la transmission de micro-organismes à l'homme (Balashov, 1972).

Le contrôle de ces parasites s'avère difficile. Divers moyens de lutte sont utilisés, par exemple, la rotation des pâturages ou la sélection génétique d'animaux résistants. Cependant, l'usage d'acaricides reste encore la méthode la plus pratique et la plus efficace, mais l'emploi de tels produits peut être néfaste pour l'environnement et il encourage la sélection de souches résistantes.

Par conséquent, une approche immunologique, et plus particulièrement le développement de vaccins anti-tiques, est d'un grand intérêt.

1.2. Systématique et biologie des tiques

Le développement de mesures de contrôle contre les tiques nécessite une connaissance précise de leur biologie et de leur cycle de vie.

Une classification de ces ectoparasites est présentée ci-dessous (d'après Aeschlimann *et al.*, 1990).

Phylum:	Arthropoda		
Classe:	Chelicerata		
Sous-classe:	Arachnida		
Ordre:	Acari		
Sous-ordre:	Metastigmata		
Famille:	Ixodidae	Argasidae	Nuttalliellidae

Les Argasides et les Ixodides jouent un rôle important en parasitologie en tant que vecteurs de pathogènes et leur cycle de vie est ainsi bien connu. Par contre, les Nuttalliellides (une seule espèce) sont encore très peu connus.

Les cycles de vie des Argasides et des Ixodides sont très différents:

- Les femelles Argasides prennent plusieurs repas sanguins très courts (10-60 minutes), suivis d'une ponte d'oeufs (50-200 oeufs). Les Argasides sont triphasiques et monotropes car elles se nourrissent à chaque fois sur le même groupe de vertébrés et sont très spécifiques envers leur hôte.
- Le repas sanguin des femelles Ixodides dure environ 7 jours. Il est suivi d'une unique ponte de quelques milliers d'oeufs et de la mort de la tique. Les Ixodides sont mono-, di- ou triphasiques. La plupart d'entre elles sont ditropes, les stades immatures (nymphe et larve) se nourrissent préférentiellement sur des vertébrés de petites tailles (micromammifères, oiseaux, lézards) et les adultes sur des animaux de grandes tailles (Aeschlimann, 1991).

1.2.1. *Ixodes ricinus*

Une des Ixodides les plus abondantes de Suisse et d'Europe de l'ouest est la tique *Ixodes ricinus* L., que nous avons utilisée pour notre étude. En Suisse, elle colonise les milieux forestiers abrités où l'humidité est élevée. On la retrouve jusqu'à 1200 mètres d'altitude (Aeschlimann, 1972). C'est une tique triphasique, larve, nymphe et adulte se gorgeant sur un hôte différent, et télotrope vu sa faible spécificité envers ses hôtes (Aeschlimann, 1991) (Figs. 1 et 2). L'éclosion des oeufs libère des larves hexapodes qui recherchent un hôte vertébré sur lequel elles prendront un repas sanguin. A la fin du repas, la larve se détache et mue pour donner une nymphe octopode. Celle-ci se met également à la recherche d'un hôte pour prendre un repas sanguin puis muer en une tique adulte octopode femelle ou mâle. Pour pouvoir prendre un repas sanguin complet, qui lui permettra de pondre des milliers d'oeufs, la femelle doit copuler. Le mâle ne se nourrit pas ou très peu.

I. ricinus transmet de nombreux pathogènes affectant les animaux domestiques: des babésies (Gern & Brossard, 1986), *Coxiella burnetti*, agent de la fièvre Q (Brossard & Aeschlimann, 1976) et *Ehrlichia phagocytophila*, responsable de fièvre de pâture (Liz & Pfister, 1989). Elle transmet aussi des micro-organismes responsables de maladies humaines comme le virus de l'encéphalite à tiques (FSME) (Aeschlimann *et al.*, 1979) ou *Borrelia burgdorferi*, agent de la borréliose de Lyme (Burgdorfer *et al.*, 1983).

1.3. Les composants de la salive des tiques

Pendant leur fixation sur l'hôte qui dure environ une semaine, les Ixodides adultes alternent l'ingestion de composants sanguins et l'injection à l'hôte, par la salive, de l'excès d'eau et d'ions. Cette procédure permet de concentrer les composants essentiels pour une production d'oeufs optimale. Durant la prise de son repas sanguin, la tique doit contrôler les réponses physiologiques de l'hôte, telles que l'agrégation des plaquettes, la coagulation, et la vasoconstriction, mises en place pour arrêter l'hémorragie provoquée par l'action mécanique du rostre. De plus, la tique doit essayer d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Pour ce faire, la salive des tiques contient un cocktail de substances pharmacologiquement actives (Ribeiro, 1987a et 1989). Ces substances sont des analgésiques, des anticoagulants, des vasodilatateurs et des immunosuppresseurs. Par exemple, la salive des adultes d'*I. dammini* contient des composants ayant des propriétés

Figure 1

Les trois stades d'*I. ricinus* (d'après O. Rais, 1991, Institut de Zoologie, Neuchâtel)

L=larve, N=nympe, M=mâle, F=femelle (1carré=1mm²)

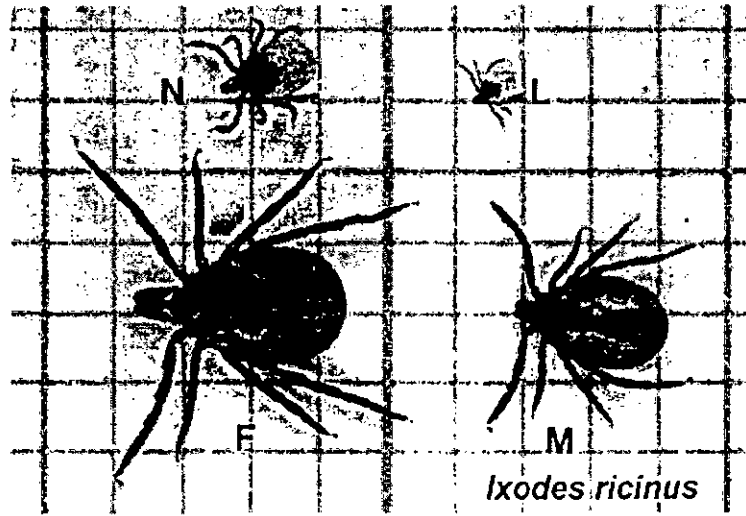
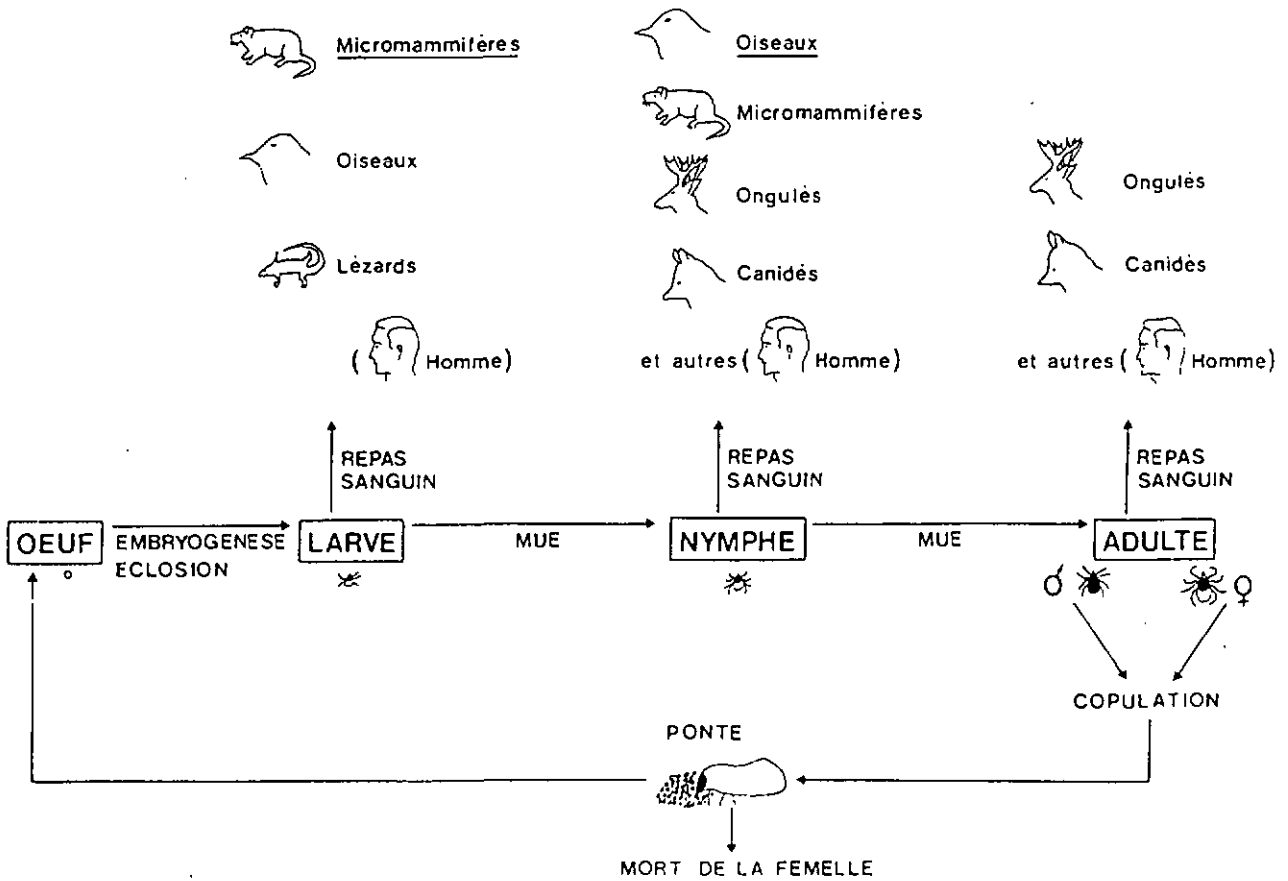


Figure 2

Cycle de vie d'*I. ricinus* (modifié d'après Aeschlimann *et al.*, 1990)



antihémostatiques, anti-inflammatoires et immunosuppressives (Ribeiro *et al.*, 1985). Pour maintenir le flux sanguin, il faut empêcher l'agrégation des plaquettes. Les stimuli induisant leur agrégation nécessitent l'ADP libéré par les cellules endommagées, de la thrombine et le facteur d'agrégation des plaquettes (PAF) libéré par les leucocytes. L'activité antihémostatique est due à l'action conjuguée de l'apyrase, de la prostaglandine E2 (PGE2) et de la prostacycline (PGI2). L'apyrase, en convertissant l'ATP en AMP empêcherait aussi les réactions inflammatoires consommant de l'ATP, telles que la dégranulation des mastocytes, qui est aussi inhibée par la PGE2 (Bach, 1997), et l'agrégation des neutrophiles. Une carboxypeptidase inactive la bradykinine et les anaphylatoxines C3a et C5a issues de l'activation du complément (Ribeiro & Spielman, 1986). La salive d'*I. dammini* contient également une substance bloquant la voie alterne du complément (Ribeiro, 1987b). Les propriétés immunosuppressives de la salive d'*I. dammini* sont démontrées dans un test *in vitro* utilisant un hybridôme de cellules T (Ribeiro *et al.*, 1985). L'adjonction de salive provoque une diminution marquée de la production d'IL-2 par les lymphocytes T. L'absence d'IL-2 entraîne une inhibition de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T, malgré la stimulation avec un anticorps monoclonal anti-Thy-1.

Les prostaglandines de la série 2 (PGE2, PGD2, PGF2 α) possèdent quelques-unes des activités mentionnées, notamment une action immunosuppressive et vasodilatatrice, et sont des molécules très importantes dans l'association hôte/tique (Bowman *et al.*, 1996).

Un extrait de glandes salivaires préparé à partir de femelles de *Dermacentor reticulatus* diminue *in vitro* l'activité des NK (Kubes *et al.*, 1994). Cependant, aucun rôle n'est encore attribué aux NK dans le phénomène de résistance contre les tiques (Wikel & Bergman, 1997). L'IFN- γ produit par les NK augmente la production de l'IL-12 par les macrophages, ce qui faciliterait un shift vers les Th1 (Trinchieri, 1995).

La salive des tiques contient de nombreuses autres protéines immunogéniques dont les fonctions sont encore inconnues. Ainsi, une fraction chromatographique enrichie d'une protéine de 65kD issues des glandes salivaires de femelles d'*I. ricinus* partiellement gorgées induit la prolifération *in vitro* des lymphocytes T contenus dans les ganglions des souris BALB/c infestées par les nymphes d'*I. ricinus* (Ganapamo *et al.*, 1997).

Certaines des associations hôtes/tiques se sont établies depuis longtemps et les deux partenaires semblent évoluer en harmonie puisque l'hôte ne développe pas de résistance. C'est le cas de *Peromyscus leucopus* infestés par les nymphes de *D. variabilis* (Trager,

1939) ou d'*Apodemus sylvaticus* infestés par les larves ou les nymphes d'*I. trianguliceps* (Randolph, 1979) ou d'*Apodemus flavicollis* infestées par les larves d'*I. ricinus* (Dizij *et al.*, 1994). Cependant, il ne faut pas généraliser car malgré le fait que les larves d'*I. ricinus* infestent depuis longtemps *Clethrionomys glareolus*, ceux-ci développent une résistance lors d'essais en laboratoire (Dizij & Kurtenbach, 1995).

Lorsque les tiques se nourrissent sur des animaux de laboratoire, ceux-ci développent souvent une résistance (Allen, 1989).

1.4. Les réponses immunologiques de l'hôte suite aux piqûres des tiques

Trager (1939), le pionnier de l'immunité anti-tiques, montre que l'acquisition de résistance des cobayes vis-à-vis des larves de *Dermacentor variabilis* est due à une réponse immunologique de l'hôte. Les manifestations de résistance sont diverses selon le modèle hôte-parasite considéré. Cela peut se manifester par une perturbation du cycle de vie des tiques tels un rejet, un prolongement du temps de gorgement, une réduction du poids d'engorgement, une diminution du rendement des pontes et de la viabilité des oeufs, une perturbation de la mue ou encore la mort de la tique sur l'hôte. Plusieurs auteurs ont décrit ces divers phénomènes (Wikel, 1982 et 1984; Wikel & Allen, 1982; Wikel & Whelen, 1986; Brown, 1985; Allen, 1989; Brossard *et al.* 1991). La composante humorale et/ou la composante cellulaire de la réponse immunitaire, de même qu'une participation du système complément sont proposées pour expliquer le phénomène de résistance.

1.4.1. La composante humorale

Trager (1939) montre que le transfert d'immun-sérum, de cobayes résistants aux larves de *D. variabilis*, confère une protection partielle à des animaux indemnes infestés par la même espèce de tiques. Wikel et Allen (1976a) confirment l'importance des anticorps grâce à un traitement des cobayes infestés par des larves de *D. andersoni* avec de la cyclophosphamide, inhibiteur de la fonction des lymphocytes B. En effet, chez les animaux traités par l'immunosuppresseur, l'expression de la résistance est partiellement inhibée. Deux injections d'immun-sérum à des lapins indemnes suffisent à leur transférer une

résistance partielle contre des adultes d'*I. ricinus* (Brossard, 1977). Le succès des transferts d'immun-sérum est remarqué dans d'autres modèles: bovins infestés par *Boophilus microplus* (Roberts & Kerr, 1976) ou encore cobayes infestés par *Amblyomma americanum* (Brown & Askenase, 1981) ou par *Rhipicephalus appendiculatus* (Brown *et al.*, 1983). Cependant, les anticorps anti-tiques ne semblent pas toujours intervenir dans le développement d'une résistance chez des animaux receveurs. C'est le cas notamment de cobayes infestés par *D. andersoni* (Wikel & Allen, 1976b) ou de lapins infestés par *R. appendiculatus* (Fivaz, 1990) où le transfert d'immun-sérum ne confère aucune protection aux receveurs. Alors que pour les expériences précédentes, les auteurs se sont surtout intéressés aux immunoglobulines de la classe IgG, Mastuda *et al.* (1990) ont montré la contribution d'un autre isotype, les IgE, dans le développement de la résistance des souris contre les larves de *Haemaphysalis longicornis*. Dans leur système, les IgE, en provoquant la dégranulation des mastocytes qui libèrent une batterie de substances, dont l'histamine, participeraient au phénomène de résistance. L'histamine inhibe la salivation et le processus de gorgement des tiques (Allen et Kemp, 1982).

1.4.2. La composante cellulaire

L'importance des cellules dans la résistance anti-tiques a été démontrée ou suggérée, par le transfert de cellules à des animaux indemnes, par des études histologiques au niveau du site de fixation des tiques, par l'emploi de souris génétiquement déficientes en cellules participant au phénomène inflammatoire, par l'utilisation de drogues immunosuppressives ou encore par des tests cutanés.

1.4.2.1. Transfert de cellules

Généralement, le transfert de cellules lymphoïdes d'animaux résistants induit une meilleure immunité chez les receveurs qu'un transfert d'immun-sérum (Bagnall, 1975). Ainsi, suite à un transfert de cellules ganglionnaires de cobayes résistants contre les larves de *D. andersoni*, les receveurs développent une protection supérieure à celle obtenue après transfert d'immun-sérum (Wikel & Allen, 1976b). Des résultats similaires sont observés avec d'autres espèces de tiques comme *R. sanguineus* (Brown & Askenase, 1981),

A. americanum (Brown, 1982), *I. holocyclus* et *R. appendiculatus* (Askenase *et al.*, 1982) infestant différents animaux.

1.4.2.2. *Etudes histologiques*

Dans différents modèles, des études histologiques de la peau montrent une infiltration massive, autour du rostre des ectoparasites, de cellules inflammatoires telles que des basophiles (Brown & Askenase, 1981; Allen & Kemp, 1982) ou un mélange d'éosinophiles et de basophiles (Brossard & Fivaz, 1982; McLaren *et al.*, 1983). Pourtant, la présence de ces cellules n'accompagne pas toujours une acquisition de résistance. Ainsi, nos études ont montré que les BALB/c ne développent pas de résistance contre les tiques malgré l'augmentation, dès la deuxième infestation, du nombre de neutrophiles, d'éosinophiles, de monocytes/lymphocytes, de basophiles et de mastocytes en voie de dégranulation au niveau du site de fixation des nymphes d'*I. ricinus* (Mbow *et al.*, 1994a).

1.4.2.3. *Souris déficientes en mastocytes*

Pour Matsuda *et al.* (1985), l'incapacité des souris déficientes en mastocytes (WBB6F1-W/Wv) d'acquérir une résistance contre les larves de *H. longicornis* est due à l'absence de mastocytes. Cependant, les mêmes souris (WBB6F1-W/Wv), infestées par des larves de *D. variabilis* deviennent résistantes (DenHollander & Allen, 1985a), ce qui relativise l'importance de ces cellules dans le phénomène de résistance.

1.4.2.4. *Drogues immunosuppressives*

Le traitement des lapins avec de la cyclosporine A, un immunosuppresseur agissant spécifiquement sur les lymphocytes T (Thomson *et al.* 1986), provoque une diminution des réactions d'hypersensibilité de type immédiat et retardé (Girardin & Brossard, 1989), ainsi qu'une atténuation des effets de la résistance sur la biologie des tiques (Girardin & Brossard, 1990). Ceci démontre l'importance des lymphocytes T dans le phénomène de résistance.

1.4.2.5. Tests cutanés

Un autre moyen de mettre en évidence la participation cellulaire dans le phénomène inflammatoire est la mesure de l'épaississement de la peau d'animaux résistants suite à une injection intra-cutanée d'antigènes. L'hypersensibilité de type immédiat est associée à une réponse IgE. Les mastocytes sensibilisés par ces IgE libèrent des médiateurs pharmacologiques, tels que l'histamine, qui déclenchent une réaction immédiate, remarquée par un épaississement de la peau dans l'heure suivant l'injection des antigènes. L'hypersensibilité retardée se manifeste plus tardivement, soit 24 à 96 heures après contact avec les antigènes. A ce moment, des cellules T sensibilisées libèrent des lymphokines, telles l'IL-2, l'IFN- γ et le TNF- α . L'IFN- γ et le TNF- α induisent la migration des lymphocytes des organes lymphoïdes secondaires vers la peau. Ces lymphocytes participent alors au phénomène d'hypersensibilité retardée (Issekutz *et al.*, 1988; Higashi *et al.*, 1995). Girardin et Brossard (1985) ont pratiqué ce genre de tests et ont remarqué que des lapins pluriinfestés par des femelles d'*I. ricinus* développaient des hypersensibilités cutanées immédiate et retardée; ceci montre que les tiques déclenchent un phénomène inflammatoire à médiation humorale et cellulaire.

C'est seulement au début des années 90 que le rôle des cellules T dans l'immunité anti-tiques commence à être précisé. Grâce à l'emploi d'anticorps dirigés contre des marqueurs de surface spécifiques à certaines sous-populations de cellules, Mbow *et al.* (1994b) remarquent que la valeur du rapport T CD4+/T CD8+ augmente au niveau du site de fixation des nymphes d'*I. ricinus* sur des BALB/c. La mise en culture et la stimulation de cellules provenant d'organes lymphatiques d'animaux infestés va permettre de caractériser cette réponse en établissant la composition des cytokines produites après une ou plusieurs infestations par des tiques. Ainsi, Ramachandra & Wikel (1992) observent que des extraits de glandes salivaires de tiques de *D. andersoni* réduisent les productions d'IL-1 et de TNF- α par les macrophages et celles de l'IL-2 et de l'IFN- γ par les lymphocytes T en culture. Ganapamo *et al.* (1995) parlent de polarisation Th2 après qu'ils aient montré que des cellules ganglionnaires de BALB/c infestées par des nymphes d'*I. ricinus* produisent essentiellement de l'IL-4 après une stimulation *in vitro* avec de la ConA; les cellules responsables de cette production sont les cellules T CD4+. Ils remarquent également une augmentation de la production d'IL-5 et d'IL-10 après une troisième infestation (Ganapamo *et al.*, 1996).

1.4.3. Le système complément

La participation du système complément dans l'acquisition de la résistance contre les tiques a été montrée chez des cobayes traités avec du venin de cobra et infestés par des larves de *D. andersoni*. Le venin de cobra entraîne une conversion massive de C3 en C3b le rendant indisponible pour la réponse anti-tiques (Wikel & Allen, 1977). Sur les animaux traités, les tiques se nourrissent mieux et en plus grand nombre. Une réduction du nombre de basophiles infiltrant l'épiderme au niveau du site de fixation des ectoparasites est également observée dans cette expérience.

Un dépôt d'antigènes salivaires de tiques, d'IgG et de facteurs du système complément a été visualisé par immunofluorescence à la jonction dermo-épidermale chez des cobayes résistants à *D. andersoni* (Allen *et al.*, 1979). L'activation du complément au niveau de cette jonction peut être la cause de l'infiltration des basophiles, le facteur C5a étant une anaphylatoxine chimiotactique pour ces cellules chez les cobayes (Ward *et al.*, 1975).

Chez des lapins infestés par *I. ricinus*, le taux sérique de C3 augmente pour atteindre un maximum en troisième infestation (Papatheodorou & Brossard, 1987). L'ingestion de C3, lors du repas sanguin, et son activation pourrait produire une perturbation physiologique de l'épithélium intestinal de la tique avec pour conséquence une digestion altérée de l'hémoglobine de l'hôte.

1.5. Polarisation Th1/Th2

La réponse immunitaire est le fruit de l'interaction entre les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques, lymphocytes B, macrophages). La communication entre ces cellules est assurée par des contacts cellulaires et des facteurs solubles, les cytokines. Les cytokines agissent sur un grand nombre de cellules cibles différentes. Ceci est possible grâce à un large spectre d'action et à des activités pouvant être aussi bien autocrine (action sur la cellule qui les a produites) que paracrine (action sur d'autres cellules). De plus, un effet identique peut être obtenu avec des cytokines différentes et plusieurs cellules peuvent produire la même cytokine.

Les cellules T CD4⁺ jouent un rôle essentiel dans les réponses immunitaires humorale et cellulaire. Cependant, de nombreuses observations dans divers modèles expérimentaux ont permis d'établir que ces deux réponses sont souvent exclusives et certainement soumises à des mécanismes de régulation distincts. En 1986, Mosmann *et al.* montraient que les lymphocytes T helper pouvaient être divisés en deux sous-populations, Th1 et Th2, selon le profil de cytokines produites après stimulation. Les Th1 murins produisent de l'IFN- γ , de l'IL-2 et du TNF- β et participent à la production des IgG2a, à l'activation des macrophages ainsi qu'aux phénomènes d'ADCC et d'hypersensibilité de type retardé. Les Th2 produisent de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 et IL-13 et pourvoient une aide optimale pour les réponses immunologiques à médiation humorale incluant le switching des isotypes IgE et IgG1. Ces deux sous-populations de cellules ne peuvent pas être stimulées en même temps puisque l'IL-10 bloque la production des cytokines par les Th1, alors que l'IFN- γ inhibe l'action de l'IL-4 (Fiorentino *et al.*, 1989; Fiorentino *et al.*, 1991). L'IL-10 n'agit pas directement sur les Th1 mais sur les APC, surtout les macrophages, en diminuant la production d'IL-12 et l'expression des molécules de surfaces B7 de ces cellules (O'Garra & Murphy, 1994). Un faible pourcentage de lymphocytes T helper présente un profil de cytokines différent de celui des Th1 et Th2. Ces cellules, les Th0, sont les précurseurs des Th1 et Th2 et produisent de l'IL-2, IL-3, IL-4 et du TNF. La différenciation des précurseurs Th0 en sous-populations Th1 et Th2 est contrôlée par l'IL-4, l'IL-12 et l'IFN- γ . En présence d'IL-4 et de l'antigène, les lymphocytes se différencient *in vitro* en Th2, quelle que soit la cellule présentatrice de l'antigène (O'Garra & Murphy, 1994). Les candidats potentiels comme source majeure d'IL-4, pouvant favoriser la différenciation des Th0 en Th2, sont les basophiles et les mastocytes (Brown *et al.*, 1987). De plus, il existe un type de cellule T capable de produire des quantités considérables d'IL-4 suite à une activation *in vitro*. Ces cellules portent le marqueur de surface NK1.1⁺ et, contrairement aux Th2, elles n'ont pas besoin d'une primo-stimulation avant de produire de l'IL-4 (Poynter *et al.*, 1997). L'IL-12, produite surtout par les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B, favorise la différenciation des Th0 en Th1 (O'Garra & Murphy, 1994). L'IFN- γ jouerait également un rôle important dans la différenciation des Th1; en présence d'IL-2, la majorité des lymphocytes se différencient en Th2 alors qu'ils se différencient en Th1 en présence d'un mélange d'IL-2 et d'IFN- γ (Gajewski *et al.*, 1989). La détermination des cytokines impliquées dans la différenciation des sous-populations Th1/Th2 a beaucoup

progressé grâce à l'utilisation de souris transgéniques pour un récepteur T spécifique d'un antigène donné (O'Garra et Murphy, 1994):

- Effets de l'IL-4 dans la différenciation des lymphocytes T: Hsieh *et al.* (1992) utilisent les lymphocytes T de souris transgéniques dont le TCR est spécifique à l'ovalbumine (OVA), tandis que Seder *et al.* (1992) utilisent les lymphocytes T de souris transgéniques dont le TCR est spécifique au cytochrome c de pigeon. Ces cellules sont utilisées pour étudier l'effet de cytokines ajoutées à des culture de lymphocytes stimulés avec différentes APC et des doses différentes d'antigène. Comme le cytochrome c de pigeon et l'OVA ne sont pas présents dans l'environnement, les cellules exprimant ces TCR transgéniques sont des lymphocytes T naïfs. Les deux groupes de chercheurs montrent que l'addition d'IL-4 à une culture de lymphocytes naïfs conduit à une population de cellules sécrétant de l'IL-4 lors des stimulations suivantes par les antigènes spécifiques. A l'inverse, l'addition d'un anticorps monoclonal anti-IL-4 conduit au développement de Th1 après une restimulation.
- Effets de l'IFN- γ dans la différenciation des lymphocytes T: l'IFN- γ est l'objet de nombreuses controverses quant à son rôle direct sur la différenciation des Th0 en Th1. Selon Macatonia *et al.* (1993), l'IFN- γ est important pour la différenciation des cellules T en Th1 car des anticorps monoclonaux anti-IFN- γ ajoutés à la culture diminue la quantité de lymphocytes T produisant de l'IFN- γ . Cependant, l'addition d'IFN- γ n'augmente pas la production de cette cytokine. Dans un autre modèle, Seder *et al.* (1992) montrent que l'addition d'IFN- γ à une culture de lymphocytes stimulés avec de l'antigène et différentes APC n'augmente pas la production d'IFN- γ . De même, la neutralisation de l'IFN- γ à l'aide d'un anticorps monoclonal ne diminue pas sa production. Ainsi, l'IFN- γ en lui-même ne semble pas suffisant pour induire le développement des Th1.
- Effets de l'IL-12 dans la différenciation des lymphocytes T: l'addition de heat-killed *L. monocytogenes* (HKLM) à une culture augmente la production d'IFN- γ par des lymphocytes naïfs de souris TCR transgéniques mais seulement si des macrophages sont présents dans la culture (Hsieh *et al.*, 1992). L'effet du HKLM n'est pas d'augmenter l'activité de présentation d'antigènes par les macrophages, mais de les induire à produire de l'IL-12. Cette dernière stimule la production d'IFN- γ par les NK et les lymphocytes T. L'IL-4 est dominant sur l'IL-12, car l'addition d'IL-12, à une culture de lymphocytes T

préalablement stimulés avec de l'IL-4, ne diminue pas la quantité d'IL-4 produite après restimulation (Hsieh *et al.*, 1992, Seder *et al.*, 1992).

L'environnement en cytokines n'est pas le seul facteur intervenant dans la différenciation des lymphocytes. D'autres éléments ont également leur importance comme:

- l'antigène: un antigène sous forme soluble active plutôt les Th2 tandis qu'un antigène particulaire active les Th1 (Burstein *et al.*, 1992).
- le site d'injection de l'antigène: par exemple, suivant le site d'inoculation de *L. major* à des souris (BALB/c x C57BL/6)F1, celles-ci seront susceptibles (activation des Th2 dans le cas d'une injection cutanée au niveau dorsale) ou elles développeront une résistance (activation des Th1 quand l'injection se fait dans les pattes arrières) (Nabors *et al.*, 1995).
- la dose d'antigène: la réponse des BALB/c normalement susceptibles à l'infection par un grand nombre de *L. major* peut être inversée en injectant aux souris un faible nombre de parasites (Doherty & Coffman, 1996).
- le type de cellules présentatrices de l'antigène: les lymphocytes B stimulent préférentiellement la prolifération des clones Th2, alors que les cellules dendritiques et les macrophages favorisent celle des clones Th1 (Gajewski *et al.*, 1991).
- les molécules de surface B7: l'association des molécules CD28 et CTLA-4 (sur les lymphocytes T) avec leurs ligands B7-1 ou B7-2 (sur les CPA) stimule différemment les lymphocytes. Le signal B7-2 favoriserait l'activation des Th2 par la production d'IL-4 (Freeman *et al.*, 1995), contrairement au signal B7-1 qui stimulerait la prolifération des Th1 (Kuchroo *et al.*, 1995).
- la constitution génétique: les lymphocytes T des souris B10.D2 (H-2d) et des BALB/c (H-2d) se différencient en Th1 ou Th2 sous l'influence de l'IL-12 ou de l'IL-4 respectivement. Lorsque ces mêmes lymphocytes sont mis en culture sans apport externe de cytokines, les lymphocytes T des B10.D2 acquièrent un phénotype Th1 beaucoup plus marqué que celui des lymphocytes des BALB/c (Güler *et al.*, 1996). Lorsque ces mêmes souris sont infestées par *L. major*, les B10.D2 développent une réponse Th1 et sont résistantes alors que les BALB/c sont susceptibles et développent une réponse Th2. Ainsi, la constitution génétique influence le développement des T helper conduisant soit à la résistance, soit à la susceptibilité de certaines souris à l'infestation par *L. major*. La susceptibilité des BALB/c est due au fait que les lymphocytes T deviennent insensibles à l'IL-12. ce qui empêche l'établissement d'une

réponse Th1. Une région du chromosome 11 étroitement liée avec le maintien de la production d'IL-12 et le développement des Th1 a été localisée. Cette région contient plusieurs gènes qui codent pour des candidats pouvant influencer le développement des Th, dont l'interferon regulating factor-1.

Il existe une association évidente entre les produits des gènes du CMH de classe II et la réponse immunologique des souris contre *B. burgdorferi* (Schaible *et al.*, 1991). Les souris d'haplotype H-2d développent une protection contre *B. burgdorferi*, tandis que les animaux H-2k, b, j, r et s montrent des arthrites sévères.

1.6. Modulation de la réponse immunologique

La polarisation de la réponse immunologique vers les Th1 ou les Th2 est bien déterminée dans certains modèles hôte/pathogène. Par exemple, les C3H sont susceptibles à l'infestation par la bactérie *B. burgdorferi* et développent une réponse Th1, tandis que les BALB/c sont résistantes et induisent une réponse Th2 (Keane-Myers & Nickell, 1995). Un traitement des souris BALB/c avec un anticorps monoclonal anti-IL-4 les rend plus susceptibles à l'infection par *B. burgdorferi* alors qu'un traitement avec un anticorps monoclonal anti-IFN- γ amplifie leur résistance naturelle.

Suite à une injection de *L. major*, les souris BALB/c développent une maladie progressive et létale accompagnée d'une réponse immunologique dirigée vers les Th2 (Heinzel *et al.*, 1989). Cette issue fatale peut être évitée par un traitement avec de l'IL-12 (Heinzel *et al.*, 1993). Un traitement des souris BALB/c avec de l'anti-IL-4 associé avec de l'antimoine permet le développement d'une réponse Th1 et l'apparition d'une protection efficace contre une infection de *L. major* (Nabors & Farrell, 1994). Les BALB/c déficientes en IL-4 résistent à l'infection de *L. major* (Kopf *et al.*, 1996). Les souris C57BL/6 et C3H maîtrisent l'infection par *L. major* et développent une immunité corrélée avec le développement d'une réponse Th1 (Heinzel *et al.*, 1989). L'injection d'anticorps monoclonaux anti-IFN- γ rend les C3H susceptibles à l'infestation (Belosevic *et al.*, 1989). L'IL-4 est d'une grande importance au tout début d'une infestation avec *L. major* pour amener la réponse vers les Th2 et supprimer celle des Th1 (Launois *et al.*, 1995). Les souris susceptibles produiraient très tôt de l'IL-4 après le contact avec le parasite. Cet IL-4 est produit par les T CD4⁺ V β 8V α 4 (Launois *et al.*, 1997). Un deuxième pic d'IL-4

apparaît plus tard et est produit par les Th2. Pour d'autres auteurs, la différenciation Th1/Th2 chez les souris infestées par *L. major* ne serait pas due à la régulation différentielle de l'IL-4, mais à la maintenance de la sensibilité à l'IL-12 (Güler *et al.*, 1996).

Un seul essai d'immunomodulation dans un système animal-tique est à relever. Schorderet et Brossard (1994) remarquent que des lapins traités avec de l'IL-2 recombinante humaine développent une résistance plus marquée contre les adultes d'*I. ricinus*. Les poids d'engorgement et de ponte des tiques sont diminués. Dans cette expérience, aucun effet du traitement avec l'IL-2 n'a été détecté ni sur la production d'anticorps ni sur la prolifération *in vitro* des lymphocytes stimulés par un extrait de glandes salivaires. Par contre, le traitement augmente l'hypersensibilité de type retardé contre cet antigène.

1.7. Fonctions et propriétés des cytokines considérées dans ce travail

1.7.1. L'interleukine 4 (IL-4)

L'IL-4 est principalement produite par les lymphocytes T CD4⁺ activés (Paul & Ohara, 1987). Cependant, d'autres types cellulaires comme les basophiles et les mastocytes peuvent également synthétiser cette cytokine (Brown *et al.*, 1987). L'IL-4 est capable d'induire la différenciation des Th0 en Th2 puis participe à la croissance de ces dernières (Swain, 1991). L'IL-4 modifie également la nature des isotypes sécrétés par les lymphocytes B. Chez la souris, elle induit les cellules B, préalablement activées par du LPS ou par les lymphocytes T, à produire des IgG1 et des IgE par des switch séquentiels des chaînes lourdes des immunoglobulines (Mandler *et al.*, 1993). L'IL-4 accroît le volume des lymphocytes B sans induire la synthèse d'ADN et augmente l'expression de certains antigènes de surface comme les IgM, le CD23 et les Ia, ce qui favorise les interactions entre les lymphocytes T et les lymphocytes B (Noelle & Snow, 1992).

1.7.2. L'interleukine 12 (IL-12)

L'IL-12 est un hétérodimère composé de deux chaînes, p40 et p35, reliées par un pont disulfure. Elle est produite par les CPA et, dans une moindre mesure, par les

lymphocytes B. Elle provoque l'augmentation de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T et les cellules natural killer (NK). L'IL-12, en association avec l'IFN- γ , induit la maturation des lymphocytes Th0 en cellules effectrices Th1 et inhibe le développement des Th2 (Trinchieri, 1995). En réponse à un antigène, l'IL-12 assure une production optimale d'IFN- γ ainsi qu'une prolifération des Th1. La différenciation des Th0 dépend de la balance entre l'IL-12, qui favorise une réponse Th1, et l'IL-4, qui favorise une réponse Th2.

1.7.3. L'interféron- γ (IFN- γ)

Les sources principales de l'IFN- γ sont les lymphocytes T activés, autant les CD4⁺ Th1, que les CD8⁺, ainsi que les cellules NK. Chez les souris, l'IFN- γ stimule la sécrétion des IgG2a et inhibe celle des IgE, IgG1 et IgG3 (Snapper & Paul, 1987). Cette cytokine participe à la présentation des antigènes en augmentant l'expression des la sur les macrophages (Geppert & Lipsky, 1985) ainsi que celle des ICAM-1, ce qui permet leur interaction avec les lymphocytes T (Mantovani & Dejana, 1989). De plus, elle augmente les propriétés phagocytaires et élève le taux d'enzymes intracellulaires des macrophages, ce qui permet la dégradation des antigènes (Allen & Unanue, 1987). L'IFN- γ induit la migration des lymphocytes des organes lymphoïdes secondaires vers la peau et participe alors au phénomène d'hypersensibilité retardée (Issekutz *et al.*, 1988).

1.8. Association souris-nymphes d'*I. ricinus* et *B. burgdorferi*

L'étude de la biologie des nymphes d'*I. ricinus* (pourcentage de fixation, poids des nymphes femelles et des mâles gorgés, durée de la mue) se gorgeant sur des BALB/c montrent que ces dernières ne développent pas de résistance lors de trois infestations successives (Mbow *et al.*, 1994a). Les études histologiques du site de fixation de ces tiques montrent une forte infiltration de cellules inflammatoires. Dès la deuxième infestation, la lésion est envahie de neutrophiles, d'éosinophiles, de monocytes/lymphocytes, de basophiles et de mastocytes en voie de dégranulation. De plus, les souris développent une hypersensibilité immédiate et une faible hypersensibilité retardée. Ganapamo *et al.* (1995) ont montré que la réponse immunologique développée contre les nymphes d'*I. ricinus* est

dirigée vers les Th2. En effet, les cellules ganglionnaires de souris infestées, stimulées *in vitro* avec de la ConA, produisent essentiellement de l'IL-4.

La tique *I. ricinus* transmet des agents infectieux dont la bactérie *B. burgdorferi* (Barbour *et al.*, 1983). Les réponses immunologiques développées contre les borrelies peuvent être influencées suivant que l'inoculation des spirochètes se fait par l'infestation avec des tiques infectées par *B. burgdorferi* ou par une injection sous-cutanée de bactéries (Gern *et al.*, 1993). La réponse immunologique de l'hôte, développée contre *I. scapularis*, influence l'infectivité et la dissémination de *B. burgdorferi* (Zeidner *et al.*, 1997). Des souris BALB/c infestées à quatre reprises par des nymphes d'*I. scapularis* deviennent résistantes aux borrelies transmises par les tiques (Wikel *et al.*, 1997). La résistance de *C. glareolus*, développée contre les larves d'*I. ricinus*, empêche aussi la transmission efficace des spirochètes (Dizij *et al.*, 1994).

Tenant compte de ces éléments, il sera intéressant d'observer d'une part si la présence du spirochète dans les nymphes modifie leur comportement (% de fixation et poids des tiques gorgées) et la réponse immunologique anti-tiques (production des cytokines IL-4 et IFN- γ et évolution des IgG et des IgE totales). D'autre part, si les réactions immunologiques (production des cytokines IL-4 et IFN- γ et IgG2a anti-borrelies) des souris produites contre les borrelies sont différentes lorsque celles-ci sont injectées par les tiques ou par une seringue.

1.9. Buts du travail

Ce travail a été projeté sur la base des résultats de Mbow *et al.* (1994a,b,c) et de Ganapamo *et al.* (1995) avec pour buts de:

a) Déterminer la susceptibilité ou la résistance des souris BALB/c (H-2d), C57BL/6 (H-2b) et C3H (H-2k) lors d'infestations répétées par les nymphes d'*I. ricinus* en relation avec la production d'IgE totales.

b) Déterminer la polarisation Th1 ou Th2 des souris BALB/c (H-2d), DBA (H-2d), C57BL/6 (H-2b), C3H (H-2k), CBA (H-2k), SJL (H-2s) et FVB (H-2q) infestées une fois par les nymphes d'*I. ricinus*.

c) Moduler la réponse en IgE des souris BALB/c par des inoculations d'anticorps monoclonaux anti-cytokines (anti-IL-4 ou anti-IFN- γ) afin de déterminer l'importance de cet isotype dans la réponse protectrice anti-tiques (larves et nymphes d'*I. ricinus*). Des souris déficientes en IL-4 ont servi de contrôle.

d) Traiter des souris C3H avec de l'IL-12 recombinante afin d'observer l'effet de cette modulation sur la biologie des tiques et les réponses immunologiques.

Dans la nature, les tiques sont souvent infectées par *B. burgdorferi* (Barbour *et al.*, 1983).

Il nous a ainsi semblé important :

e) D'étudier l'effet des infestations avec des nymphes indemnes ou des nymphes infectées par *B. burgdorferi* sur la biologie des nymphes d'*I. ricinus* et les réponses immunologiques développées contre les tiques.

f) D'étudier les réponses immunologiques développées contre *B. burgdorferi* lorsqu'elles sont inoculées par des nymphes infectées ou suite à des injections sous-cutanées des spirochètes *B. burgdorferi*.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Animaux

2.1.1. Tiques

Les tiques utilisées pour les infestations sont des nymphes et des larves de l'espèce *I. ricinus* élevées dans notre laboratoire selon la méthode décrite par Graf (1978). La préparation des antigènes se fait à partir de nymphes ou de glandes salivaires de femelles adultes de la même espèce.

2.1.2. Souris

Toutes les espèces de souris, sauf les BALB/c déficientes en IL-4, proviennent de chez Iffa Credo, L'Arbresle, France. Leur haplotype diffère selon la souche considérée:

- BALB/c et DBA: H-2d
- C57BL/6: H-2b
- C3H et CBA: H-2k
- SJL: H-2s
- FVB: H-2q

Deux couples de BALB/c déficientes en IL-4 ainsi que deux autres couples de BALB/c nous ont été envoyés par le Dr. Kopf, du Max-Planck Institute for Immunobiology en Allemagne. L'élevage de ces souris s'est fait en milieu stérile, de même que les infestations.

Toutes les souris infestées sont des femelles et sont utilisées lorsqu'elles sont âgées de huit à douze semaines.

Pour chaque expérience, les groupes sont constitués de cinq souris. Les sérums ou les cellules ganglionnaires des cinq souris d'un même groupe sont poolés pour bénéficier d'une quantité suffisante de matériel. Il faut éviter de prendre trop de sang pour ne pas trop perturber la physiologie des souris, surtout que celles-ci subissent encore des infestations avec des prises de sang importantes par les nymphes. Nous prélèverons dans le même Eppendorf 150 à 200 μ l de sang par souris, ce qui nous donnera en tout 150 à 200 μ l de sérum.

Pour la culture cellulaire, il faut plusieurs ganglions de souris pour avoir suffisamment de cellules (en moyenne 50x10⁶ cellules en poolant les ganglions de cinq souris infestées) et ainsi obtenir des quantités suffisantes de surnageant de culture permettant le dosage de plusieurs cytokines par ELISA et au besoin pour pouvoir répéter ces ELISA.

2.2. Infestations

Avant de les infester, les souris sont endormies grâce à une injection de 1 μ l/g d'un mélange de 0.5ml de Xylasol® et 0.8ml de Narketan® dans le muscle de la patte arrière. Elles sont ensuite rasées et une capsule (Semadeni), dans laquelle les tiques seront placées, est collée sur l'épaule de la souris au moyen d'une préparation de 4 parts de Colophonium et d'une part de cire d'abeille préalablement fondus et mélangés au bain-marie. Dans le cas d'infestations successives, l'emplacement des capsules sera alterné: épaule droite, puis épaule gauche, puis épaule droite. Le début des infestations est séparé de 14 jours. Après gorgement, les nymphes sont recueillies, séchées sur un papier buvard, pesées une à une sur une balance de précision (Mettler AC 100) et placées séparément dans de petites fioles en verre (Graf, 1978). Après la mue seulement, le sexe des tiques sera connu et les populations mâles et femelles pourront être séparées pour les études statistiques.

Les infestations se font toujours avec 15 nymphes sauf dans l'expérience où l'effet de la charge parasitaire est étudié. Dans ce cas, les souris sont infestées par 5, 15 ou 45 nymphes placées dans deux capsules, une capsule par épaule. Dans le cas des infestations avec des nymphes infectées par *B. burgdorferi* (p. 27), les souris sont infestées avec 10 nymphes, ceci en raison d'un nombre insuffisant de nymphes infectées par *B. burgdorferi*. Pour les infestations avec les larves, les souris sont infestées avec 50 larves. Celles-ci seront pesées 10 par 10 après le gorgement.

La physiologie des tiques n'est pas stable tout au long de l'année. En hiver, celles-ci entrent en diapause. Nous avons également remarqué une diminution du poids des nymphes gorgées au cours des différentes expériences réalisées lors des années de thèse. C'est pourquoi, les comparaisons de poids des tiques ont toujours été réalisées entre les groupes de souris infestées en même temps et avec un même lot de tiques (issues des larves d'une même femelle ou d'un pool de larves provenant de quelques femelles).

2.3. Prise de sang

Le sang, des animaux anesthésiés, est récolté par ponction rétroorbitale neuf jours après le début de chaque infestation. Le sang est laissé une nuit à 4°C puis centrifugé à 500g (Eppendorf 5415C) pendant 10 min. Le sérum est alors prélevé et congelé à -20°C.

2.4. Préparation des extraits antigéniques

2.4.1. Extrait de tiques

L'extrait de protéines solubles de glandes salivaires se fait à partir de femelles gorgées pendant cinq jours sur un lapin. L'idéal aurait été de pouvoir préparer des glandes salivaires de nymphes gorgées, mais la taille de telles glandes et surtout le nombre de dissections que cela aurait occasionné pour obtenir suffisamment de matériel, nous a vite dissuadé.

Les femelles sont disséquées dans du tampon phosphate salin (PBS) 50mM pH 7.4 (10mM NaH_2PO_4 , 40mM K_2HPO_4 , 120mM NaCl) contenant 1mM de PMSF (phenyl-methylsulphonyl fluorid) et 1mM de EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid). Les glandes salivaires de même que les nymphes sont placées dans ce même tampon à raison de 100 nymphes ou 50 paires de glandes salivaires par ml de tampon. Elles sont broyées manuellement dans un homogénéisateur. L'homogénat est centrifugé à 10000g (centrifugeuse Eppendorf 5415 C) pendant 20 min. Le surnageant est dialysé une nuit à 4°C dans une membrane Spectrapor (12-14000 cut off) dans du tampon PBS 25mM, pH 7.4. Le dialysat est centrifugé à 10000g pendant 5 min.

La concentration en protéines du surnageant est déterminée par la méthode du BCA (Pierce). Les extraits sont conservés à -20°C.

2.4.2. Extrait de *B. burgdorferi*

Une culture en phase exponentielle de *B. burgdorferi* ZS7 est centrifugée à 11000g (Sorval 28S, rotor SS-34) pendant 30 min. à température ambiante afin d'empêcher la solidification de la gélatine se trouvant dans le milieu de culture. Le surnageant est enlevé et les spirochètes sont mis en suspension, par passages répétés à travers une pipette Pasteur, dans du tampon PBS-MgCl₂ pH 7.4 (130mM NaCl, 1.5mM KH₂PO₄, 14mM NaHPO₄·2H₂O, 2.7mM KCl, 5mM MgCl₂·6H₂O). Les spirochètes sont lavés par centrifugation à 11000g pendant 30 min. à 4°C. Cette opération est répétée 2 fois. Finalement, le culot est resuspendu dans 1ml de tampon qui est alors congelé et décongelé plusieurs fois avant de doser les protéines par BCA. L'échantillon est conservé à -20°C.

2.5. Culture cellulaire

La reconnaissance des mitogènes ou des antigènes par les lymphocytes se traduit par une prolifération (Corradin *et al.*, 1977). Lors de cette prolifération, les cytokines sont produites dans le milieu de culture. Elles sont analysées par ELISA.

2.5.1. Dissection des souris et prélèvement des ganglions

Les souris sont tuées par dislocation cervicale neuf jours après le début de la troisième infestation. Les ganglions axillaires et brachiaux sont prélevés et placés dans du HBSS à 4°C. Dès cet instant, tout se fait de manière stérile. Les ganglions sont broyés manuellement dans des homogénéisateurs puis lavés dans du HBSS par deux centrifugations à 200g pendant 10 min. Après chaque centrifugation, les cellules sont remises en suspension par passages répétés à travers une pipette de 2ml. Les cellules sont resuspendues dans un volume connu de HBSS. Pour déterminer le nombre de cellules, un échantillon de 20µl est prélevé et mélangé avec 180µl de bleu de Trypan 0.4% (Sigma). Le comptage s'effectue à l'aide d'une chambre de comptage de Neubauer. Seules les cellules vivantes, celles excluant le bleu de Trypan, sont comptées.

2.5.2. Culture

Pour les cultures, des microplaques de 96 puits à fond plat (Falcon, microtest III) sont utilisées. La rangée des puits externes est remplie avec du HBSS pour créer un environnement humide et stable dans la plaque. Les cellules, à la concentration de 10^6 cellules dans un volume final de $100\mu\text{l}$ de RPMI complet [10% de FBS (Gibco), 2mM de L-glutamine (Sigma), 1mM de pyruvate de sodium (Sigma), $50\mu\text{M}$ de β -mercaptoéthanol (Fluka), 1U/ml de Pénicilline/Streptomycine (Gibco) dans du RPMI 1640 (Gibco)], sont réparties dans les puits. Les cellules sont stimulées avec $4\mu\text{g}$ de Concanavalin A (ConA, Sigma) par puits. Les surnageants de culture sont récoltés après 24 heures de stimulation à 37°C sous 5% de CO_2 et conservés à -80°C .

Quand les cellules sont stimulées avec un extrait de borréliés, la concentration de celui-ci est de $5\mu\text{g}$ par puits et le temps d'incubation est de 72 heures.

2.6. Immunoblot

La détection des IgG et des IgG2a spécifiques aux antigènes de tiques ou aux borréliés est réalisée par immunoblot. Les anticorps monoclonaux anti-OspA (IgG1, H5332), anti-OspB (IgG2b, 84C) et anti-OspC (IgG2a, 4B8F4) nous ont été offerts par le CDC, Fort Collins, Colorado.

La séparation des protéines ($200\mu\text{g/gel}$) d'un extrait de glandes salivaires de femelles d'*I. ricinus* ou d'un extrait de *B. burgdorferi* se fait par électrophorèse verticale sur un gel SDS-Page 12%. Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Après le transfert, les bandes de nitrocellulose sont lavées dans du PBS-0.05% Tween 20 (PBS-Tween 20) et saturées pendant deux heures avec du PBS-Tween 20-5% de lait. Puis les blots sont lavés dans le PBS-Tween 20 et incubés pendant une nuit à température ambiante avec les sérums de souris. Les sérums ont été collectés avant l'infestation et 7 jours après la fin de chaque infestation et sont dilués 100 fois dans du PBS-Tween 20-1% de lait. Après l'incubation, les blots sont lavés dans du PBS-Tween 20 et incubés pendant 2 heures avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (goat anti-mouse IgG, KPL; rat anti-mouse IgG2a, Pharmingen) dilué 1:500 dans du PBS-Tween 20-1% lait. Le complexe est révélé en ajoutant $300\mu\text{g/ml}$ de BCIP (5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl phosphate) et $150\mu\text{g/ml}$ de nitrobleu tctrazolium dans 100mM tampon

Tris (pH 9.5) contenant 100mM de chlorure de sodium and 5mM de chlorure de magnesium.

2.7. ELISA

2.7.1. ELISA cytokines

L'ELISA cytokine que nous avons utilisé est décrit par Ganapamo *et al.* (1995). Afin de pouvoir transformer les densités optiques (DO) en U/ml, des courbes standards avec des cytokines recombinantes sont construites.

2.7.2. ELISA IgE

Les IgE totales dans les sérums sont mesurées grâce à un ELISA en utilisant deux types d'anticorps monoclonaux anti-souris. Les plaques sont sensibilisées avec 0.5µg d'un anticorps monoclonal IgE anti-souris (Rat IgG₁, R35-72, Pharmingen) dans 100µl de tampon carbonate 50mM, pH 9.6 (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃). La saturation se fait avec une solution de PBS (10mM Na, K phosphate, 120mM NaCl, pH 7.4) contenant 2% d'albumine de bœuf (BSA). Puis les sérums dilués 10x dans du PBS-1% BSA sont placés dans les puits. L'étape suivante est l'adjonction d'un anticorps monoclonal biotinylé anti-souris IgE (Rat IgG₁, R35-118, Pharmingen) dilué 1:1000 dans du PBS-1% BSA. L'ELISA se poursuit en plaçant 0.05µg/puits d'avidine-peroxidase (Sigma) dilué dans du PBS-1% BSA. Les incubations pour chaque étape sont de 1 heure à 37°C. Entre chaque étape, trois lavages de 5 min. avec du PBS-0.05% Tween 20 sont exécutés. La présence des IgE fixées est détectée de manière colorimétrique en ajoutant 40µg/puits de o-phenylendiamine (OPD, Sigma) comme substrat dilué dans un tampon citrate-phosphate pH 5.0 (25mM C₆H₈O₇, 50mM Na₂HPO₄) additionné de H₂O₂ 35% (10µl/25ml de tampon). Les plaques sont incubées avec le substrat pendant 15-20 min. à température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture de la plaque se fait à 490 nm. Les résultats sont exprimés en densité optique.

2.7.3. ELISA IgG et IgG2a anti-borréliés

La plaque ELISA est sensibilisée avec 1µg/puits d'un extrait de borréliés (cf. 2.4.2.) dilué dans du tampon carbonate 50mM pH 9.6 (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃). La plaque est incubée une nuit à 4°C. La saturation se fait avec une solution de PBS (10mM, pH 7.4) contenant 2% de BSA. Puis les sérums dilués 50x dans du PBS-1% BSA sont placés dans les puits. L'étape suivante est l'adjonction des anticorps secondaires anti-IgG (goat anti-mouse IgG, KPL) ou anti-IgG2a (rat anti-mouse IgG2a, Pharmingen), tous deux couplés à la phosphatase alcaline, et dilués 500x dans du PBS-1% BSA. Les incubations pour chaque étape sont de 30 min. pour la saturation, 2 heures pour les sérums et 1 heure pour les anticorps secondaires, toutes à 37°C. Entre chaque étape, trois lavages de 5 min. avec du PBS-0.05% Tween 20 sont exécutés. La présence des IgG ou des IgG2a fixés est détectée de manière colorimétrique en ajoutant 100µg/puits de paranitrophénylphosphate (pNPP, Aldrich) comme substrat dilué dans un tampon diéthanolamine HCl pH 9.8. Les plaques sont incubées avec le substrat pendant 1 heure à 37°C. La lecture de la plaque se fait à 405 nm. Les résultats sont exprimés en densité optique.

2.8. Préparation des anti-cytokines IL-4 et IFN-γ

2.8.1. Préparation

Des liquides d'ascite de rats, R4-6A2 pour l'anti-IFN-γ et 11B11 pour l'anti-IL-4 sont aimablement fournis par SmithKline Beecham Biologicals SA, Rixensart, Belgique. Ils sont partiellement purifiés par une précipitation au sulfate d'ammonium 50% selon la méthode décrite dans: *Antibodies, a laboratory manual*, de E. Harlow et D. Lane. La concentration en protéine est déterminée par la méthode du BCA (Pierce). Les échantillons sont dilués à 0.5mg/ml dans du NaCl 0.9% stérile et conservés à -20°C.

2.8.2. Injections

Pour les expériences d'immunomodulation, 1ml des anti-IFN-γ ou des anti-IL-4 à la concentration de 0.5mg/ml est injecté intrapéritonéalement 1 jour avant le début de chaque infestation. Les souris contrôles reçoivent 1ml de NaCl 0.9%.

2.9. Interleukine 12 recombinante

L'interleukine-12 recombinante nous est offerte par le Genetic Institute, Inc., Cambridge, Massachusetts. L'IL-12 est amené à la concentration de 0.5mg/ml dans du NaCl 0.9% stérile.

2.9.1. Schéma de l'expérience

Première infestation de cinq C3H:

Jour -1: Une injection intrapéritonéale de 0.25 μ g d'IL-12.

Jour 0: Une injection intrapéritonéale de 0.25 μ g d'IL-12 et une infestation avec 15 nymphes.

Jours 1 à 3: Une injection intrapéritonéale de 0.25 μ g d'IL-12.

Deuxième infestation: les doses d'IL-12 injectées ont été diminuées dès le jour 0 de la deuxième infestation.

Jour -1: Une injection intrapéritonéale de 0.25 μ g d'IL-12.

Jour 0: Une injection intrapéritonéale de 0.05 μ g d'IL-12 et une infestation avec 15 nymphes.

Jours 1 à 3: Une injection intrapéritonéale de 0.05 μ g d'IL-12

Troisième infestation:

Jour -1: Une injection intrapéritonéale de 0.25 μ g d'IL-12.

Jour 0: Une injection intrapéritonéale de 0.05 μ g d'IL-12 et une infestation avec 15 nymphes.

Jours 1 à 3: Une injection intrapéritonéale de 0.05 μ g d'IL-12

Mise en culture des ganglions neuf jours après le début de la troisième infestation.

2.10. Expérience avec *Borrelia burgdorferi*

2.10.1. Nymphes infectées par *B. burgdorferi*

La souche de borrelies utilisée est ZS7, une *B. burgdorferi* sensu stricto. Les spirochètes ont été repiqué plusieurs fois, la culture est donc high passage. Cependant, des analyses par xénodiagnose confirment l'infectiosité de la souche.

Environ 10^6 spirochètes (comptage avec un hémacytomètre Helber au microscope à contraste de phase et au besoin dilution dans du milieu de culture BSK-H) sont injectés à des souris suisses. Cinq semaines après, une biopsie d'oreille placée dans un milieu de culture adéquat (BSK-H, Sigma, additionné d'antibiotiques selon Sinsky & Piesman, 1989) confirme ou non l'infection de la souris. Des larves d'*I. ricinus* sont nourries sur les souris infectées. Après la mue, les nymphes sont testées par immunofluorescence afin de déterminer la prévalence de l'infection chez les tiques. Pour les expériences, 30-50% des nymphes étaient infectées.

Les infestations se font avec 10 nymphes par souris. Trois groupes de souris sont utilisées pour cette expérience: BALB/c, BALB/c déficientes en IL-4 et C3H.

2.10.2. Injections de *B. burgdorferi*

Les spirochètes provenant d'une culture en phase exponentielle sont comptés à l'aide d'une chambre de comptage de Helber et dilués dans du BSK-H (Sigma) afin d'obtenir une concentration de 10000 spirochètes/ml.

Les injections se font en sous-cutané sur l'épaule avec 200 μ l (2000 spirochètes), les jours correspondant au début des infestations et sur les mêmes groupes de souris.

2.11. Traitements statistiques

Pour l'analyse du poids des nymphes gorgées, un test non paramétrique de Wilcoxon Mann Whitney est pratiqué. Une comparaison du pourcentage des tiques fixées se fait avec le test exact de Fisher.

Il n'est pas possible de traiter statistiquement les quantités de cytokines produites ni les titres en anticorps car les différents dosages ont été réalisés avec des pools de cellules ou de

sérums respectivement. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats reproductibles. Les résultats d'une expérience représentative ont été présentés pour chaque groupe d'expériences.

3. Résultats

3.1. Trois infestations successives des souris BALB/c (H-2d), C57BL/6 (H-2b) ou C3H (H-2k) par les nymphes d'*I. ricinus*.

3.1.1. Biologie des nymphes d'*I. ricinus* et évolution des IgE totales

Trois souches de souris, BALB/c (H-2d), C57BL/6 (H2-b) ou C3H (H-2k), représentant chacune un haplotype différent, ont été infestées à trois reprises par 15 nymphes d'*I. ricinus* afin d'étudier l'influence de la constitution génétique sur l'acquisition d'une résistance anti-tiques.

Les pourcentages de fixation et les poids des femelles et des mâles gorgés ont été répertoriés puis analysés statistiquement pour observer d'éventuels changements (diminution ou augmentation) entre les infestations I et II ou I et III. Aucune différence significative n'est à noter concernant le pourcentage de fixation et le poids des nymphes se gorgeant sur les souris entre l'infestation I et II ou I et III (Tableau I). Les comparaisons verticales, soit entre les différentes souches pour la même infestation, ne sont pas réalisables car les souris ont été infestées avec des lots de tiques différents et à des moments différents.

La quantité d'IgE totales mesurée après chaque infestation augmente d'une manière comparable au fil des infestations chez les trois souches de souris (Fig. 1).

Tableau I

Infestations successives de trois souches de souris: effets des infestations sur la biologie des nymphes d'*I. ricinus*

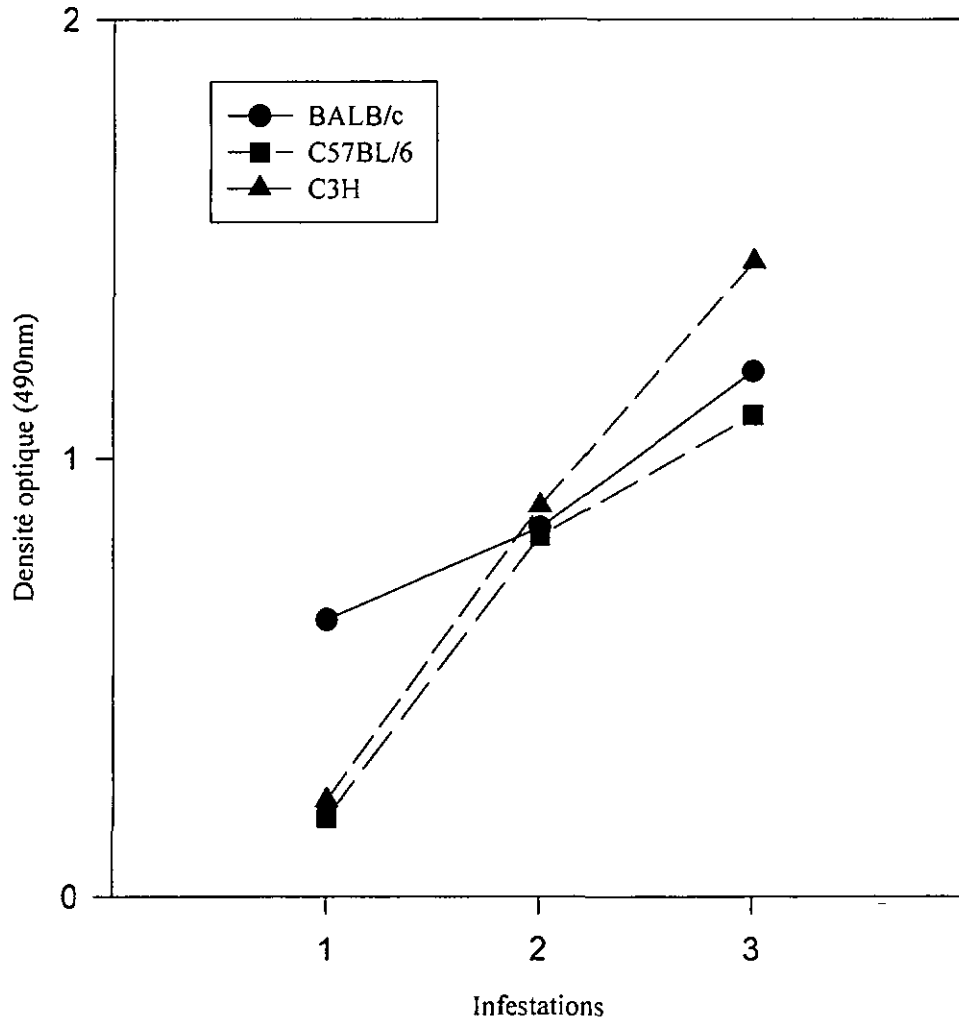
		Infestation I	Infestation II	Infestation III
% de fixation	BALB/c	73	79	77
	C57BL/6	39	49	32
	C3H	63	47	63
Poids des nymphes femelles gorgées (mg)	BALB/c	4.83±0.37 (N=23)	5.00±0.51 (N=39)	5.07±0.49 (N=33)
	C57BL/6	5.04±0.46 (N=12)	5.19±0.46 (N=17)	5.06±0.63 (N=8)
	C3H	4.52±0.42 (N=23)	4.60±0.22 (N=17)	4.61±0.33 (N=18)
Poids des nymphes mâles gorgés (mg)	BALB/c	2.76±0.42 (N=32)	2.90±0.21 (N=20)	3.13±0.50 (N=25)
	C57BL/6	3.09±0.37 (N=17)	3.06±0.35 (N=20)	2.86±0.47 (N=16)
	C3H	2.70±0.36 (N=24)	2.80±0.25 (N=18)	2.90±0.34 (N=29)

Pourcentage de fixation et poids (moyenne ± SD) des nymphes d'*I. ricinus* se gorgeant sur cinq souris BALB/c, cinq souris C57BL/6 ou cinq souris C3H pour trois infestations.

Aucune différence significative n'est à signaler en comparant les infestations I et II ou I et III.

Figure 1

Trois infestations successives de souris BALB/c, C57BL/6 et C3H par les nymphes d'*I. ricinus*: évolution des IgE totales



Mesure par ELISA des IgE totales contenues dans un pool de sérums de cinq souris BALB/c (●), cinq souris C57BL/6 (■) ou cinq souris C3H (▲) après chaque infestation par 15 nymphes d'*I. ricinus*. Avant la première infestation, le titre des IgE totales ne dépasse pas 0.1.

3.1.2. Production des IgG

Aucune des trois souches de souris ne produisent d'IgG spécifiques aux antigènes de tiques (extrait de glandes salivaires de femelles), quelque soit l'infestation considérée. Les analyses ont été réalisées par Western blot.

Conclusion partielle

Aucune résistance n'est acquise par les souris BALB/c, C57BL/6 et C3H infestées par les nymphes d'*I. ricinus*. Elles produisent des quantités croissantes d'IgE totales au cours des infestations mais pas d'IgG spécifiques à un antigène de tiques.

3.2. Constitution génétique et polarisation Th2 de la réponse immunologique des souris infestées par les nymphes d'*I. ricinus*

Sept souches de souris, BALB/c (H-2d), DBA (H-2d), C57BL/6 (H-2b), C3H (H-2k), CBA (H-2k), SJL (H-2s) et FVB (H-2q) ont été infestées une fois par 15 nymphes d'*I. ricinus*. Neuf jours après le début de l'infestation, les cellules des ganglions axillaires et brachiaux de ces animaux ont été mises en culture et stimulées pendant 24 heures avec de la ConA. Les cytokines IL-4 et IFN- γ contenues dans les surnageants de culture ont été quantifiées par ELISA.

Les cellules ganglionnaires des sept souches de souris produisent globalement plus d'IL-4 (264-300 U/ml) que d'IFN- γ (4-88 U/ml) (Tableau II) après stimulation avec de la ConA. Les souris C3H et CBA, qui ont le même haplotype, soit H-2k, produisent de plus grandes quantités d'IFN- γ (70 et 88 U/ml) que les autres souches de souris (4-32 U/ml).

3.3. Charge parasitaire et polarisation Th2 de la réponse immunologique des souris BALB/c infestées par les nymphes d'*I. ricinus*

Des souris BALB/c ont été infestées une fois avec 5, 15 ou 45 nymphes d'*I. ricinus*. Les cellules ganglionnaires de chaque groupe stimulées *in vitro* avec de la ConA produisent approximativement les mêmes quantités d'IL-4 et d'IFN- γ (Tableau III).

Conclusion partielle

Quelque soit leur constitution génétique, les différentes souris infestées par les nymphes d'*I. ricinus* développent une réponse immunologique toujours polarisée vers les Th2. Les souris C3H et CBA, qui l'haplotype H-2k, produisent de plus grandes quantités d'IFN- γ que les autres souches de souris.

Les BALB/c développent toujours une réponse Th2, qu'elles soient infestées par 5, 15 ou 45 nymphes d'*I. ricinus*.

Tableau II

Mesure par ELISA de la production *in vitro* des cytokines IL-4 et IFN- γ pour sept souches de souris infestées une fois par 15 nymphes d'*I. ricinus*

	IL-4 (U/ml)	IFN- γ (U/ml)
BALB/c (H-2d)	275	23
DBA (H-2d)	264	18
C57BL/6 (H-2b)	274	32
CBA (H-2k)	272	88
C3H (H-2k)	264	70
SJL (H-2s)	300	4
FVB (H-2q)	280	10

Un pool de cellules des ganglions axillaires et brachiaux des souris est utilisé. Les cellules sont stimulées 24 heures avec de la ConA.

Tableau III

Mesure par ELISA de la production *in vitro* des cytokines IL-4 et IFN- γ par des BALB/c infestées une fois par 5, 15 ou 45 nymphes d'*I. ricinus*

	IL-4 (U/ml)	IFN- γ (U/ml)
BALB/c + 5 nymphes	243	14
BALB/c + 15 nymphes	275	23
BALB/c + 45 nymphes	260	10

Un pool de cellules des ganglions axillaires et brachiaux des souris est utilisé. Les cellules sont stimulées 24 heures avec de la ConA.

3.4. Injections d'anticorps monoclonaux anti-IL-4 ou anti-IFN- γ à des souris BALB/c infestées par les nymphes ou les larves d'*I. ricinus*: effets sur la biologie des tiques, l'évolution des IgE totales et la production des cytokines IL-4 et IFN- γ

Les souris BALB/c de différents groupes expérimentaux ont été infestées à trois reprises par 15 nymphes d'*I. ricinus*. Les souris du premier groupe ont servi de contrôle et ont reçu des injections de NaCl 0.9% un jour avant chaque infestation. Les souris d'un deuxième groupe ont été traitées par une injection de 0.5mg d'anti-IL-4 un jour avant chaque infestation. Les souris d'un troisième groupe ont été traitées par une injection de 0.5mg d'anti-IFN- γ un jour avant chaque infestation. En complément, un quatrième groupe est composé de BALB/c déficientes en IL-4. L'étude de la biologie des nymphes (% de fixation, poids des nymphes gorgées) a été effectuée pour ces quatre groupes. Les expériences ont été répétées avec 50 larves par infestation sur des BALB/c contrôles, des BALB/c traitées avec l'anti-IL-4 et des BALB/c traitées avec l'anti-IFN- γ . L'évolution du titre des IgE totales par ELISA et la présence d'IgG spécifiques par un immunoblot sur un extrait de glandes salivaires de femelles ont été étudiés. Neuf jours après le début de la troisième infestation, les cellules des ganglions axillaires et brachiaux des souris BALB/c contrôles, BALB/c traitées avec l'anti-IL-4 et BALB/c déficientes en IL-4 ont été mises en culture et stimulées pendant 24 heures avec de la ConA. Les cytokines IL-4 et IFN- γ contenues dans les surnageants de culture ont été quantifiées par ELISA.

3.4.1. Biologie des nymphes et évolution des IgE totales

Aucune différence significative n'est observée entre les infestations I et II ou I et III autant pour le pourcentage de fixation des tiques que pour le poids des nymphes se gorgeant sur les animaux contrôles (Tableau IV). Le titre des IgE totales de ces souris augmente d'une

Tableau IV

Modulation de la réponse immunologique lors de trois infestations successives et effets sur la biologie des nymphes d'*I. ricinus*

		Infestation I	Infestation II	Infestation III
% de fixation	Souris contrôles	73	79	77
	Souris + anti-IL-4	55	45	79 **
	Souris + anti-IFN- γ	67	56	75
	Souris déficiente en IL-4	29	43	28
Poids des nymphes femelles gorgées (mg)	Souris contrôles	4.83±0.37 (N=23)	5.00±0.51 (N=39)	5.07±0.49 (N=33)
	Souris + anti-IL-4	4.80±0.29 (N=14)	5.0±0.56 (N=16)	5.36±0.58 **
	Souris + anti-IFN- γ	4.91±0.46 (N=20)	4.87±0.46 (N=19)	5.23±0.59 (N=35)
	Souris déficiente en IL-4	5.09±0.60 (N=10)	4.91±0.42 (N=13)	4.71±0.41 (N=6)
Poids des nymphes mâles gorgées (mg)	Souris contrôles	2.76±0.42 (N=32)	2.90±0.21 (N=20)	3.13±0.50 (N=25)
	Souris + anti-IL-4	2.66±0.37 (N=27)	2.93±0.40 *	3.07±0.38 ***
	Souris + anti-IFN- γ	2.80±0.43 (N=30)	3.06±0.39 (N=23)	2.81±0.39 (N=21)
	Souris déficiente en IL-4	3.09±0.46 (N=12)	2.92±0.53 (N=19)	3.03±0.58 (N=15)

* p<0.05

** p<0.01

*** p<0.001

Pourcentage de fixation et poids (moyenne \pm SD) des nymphes d'*I. ricinus* se gorgeant sur cinq souris BALB/c contrôles, cinq souris BALB/c traitées avec de l'anti-IL-4, cinq souris BALB/c traitées avec de l'anti-IFN- γ et cinq souris BALB/c déficientes en IL-4 pour trois infestations. Les comparaisons statistiques ont été réalisées entre les infestations I et II ou I et III.

infestation à l'autre (Fig. 2). Les BALB/c traitées avec de l'anti-IL-4 montrent un pourcentage de fixation plus élevé en troisième infestation qu'en première ($p < 0.01$) alors qu'aucune différence n'est observée entre la première et la deuxième infestation. Les nymphes femelles se nourrissant sur ces souris sont plus lourdes en troisième qu'en première infestation ($p < 0.01$). Quand nous comparons le poids des nymphes mâles, nous constatons qu'ils sont plus lourds en deuxième ($p < 0.05$) et en troisième ($p < 0.001$) qu'en première infestation (Tableau IV). Pour ces souris, le traitement avec l'anti-IL-4 induit une diminution du titre des IgE totales en comparaison avec les contrôles (Fig. 2).

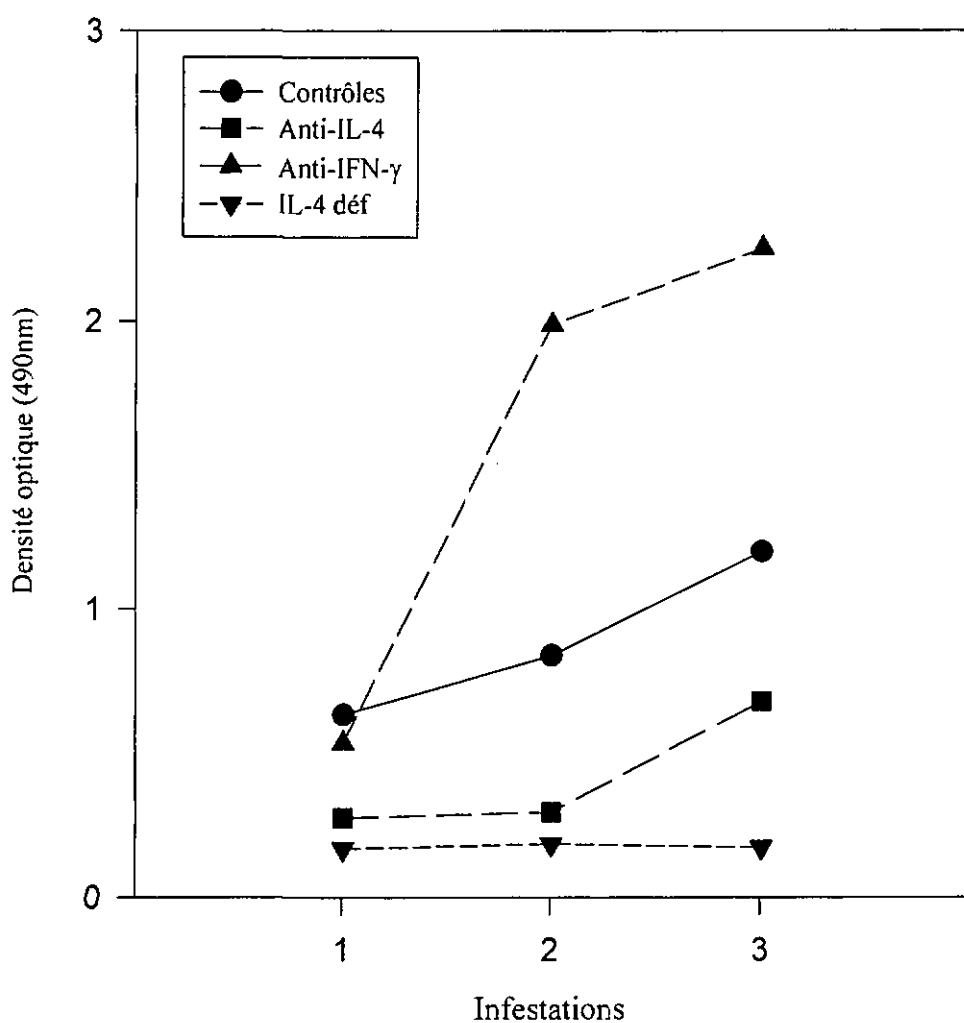
Aucune différence significative n'est enregistrée entre les infestations I et II ou I et III tant pour le pourcentage de fixation que pour le poids des nymphes se gorgeant sur des BALB/c traitées avec de l'anti-IFN- γ (Tableau IV). Ce traitement a aussi pour conséquence une augmentation générale des titres d'IgE totales en comparaison avec les contrôles et avec les deux autres groupes de souris (Fig. 2).

En ce qui concerne les BALB/c déficientes en IL-4, aucune différence significative n'est à noter entre les infestations I et II ou I et III, ni pour le pourcentage de fixation, ni pour le poids des nymphes (Tableau IV). Les IgE totales n'évoluent pas durant les infestations et restent à un titre bas (Fig. 2).

Les comparaisons entre traitements (comparaisons verticales) sur les poids des nymphes ne sont possibles qu'entre les contrôles, les BALB/c traitées avec l'anti-IL-4 et les BALB/c traitées avec l'anti-IFN- γ . Ces comparaisons montrent une seule différence significative entre les mâles se gorgeant sur les BALB/c traitées avec l'anti-IL-4 et celles traitées avec l'anti-IFN- γ en troisième infestation ($p < 0.05$). Les comparaisons verticales de ces trois groupes avec les BALB/c déficientes en IL-4 ne sont pas réalisables pour les raisons déjà évoquées dans le chapitre 2.2; les infestations de ces souris ayant été pratiquées à une autre période de l'année et en animalerie stérile. Cependant, des comparaisons ont pu être faites avec des BALB/c normales maintenues en milieu stérile et infestées en même temps. Ces comparaisons ne montrent aucune différence significative (résultats non montrés).

Figure 2

Modulation de la réponse immunologique des souris lors de trois infestations par les nymphes d'*I. ricinus*: évolution des IgE totales



Mesure par ELISA des IgE totales contenues dans un pool de sérums de cinq BALB/c contrôles (●), cinq BALB/c traitées avec de l'anti-IL-4 (■), cinq BALB/c traitées avec de l'anti-IFN- γ (▲) ou cinq BALB/c déficientes en IL-4 (▼) après chaque infestation par 15 nymphes d'*I. ricinus*. Avant la première infestation, le titre des IgE totales ne dépasse pas 0.1.

3.4.2. Biologie des larves et évolution des IgE totales

Aucune différence significative n'est observée entre les infestations I et II ou I et III en ce qui concerne les pourcentages de fixation des tiques, ceci pour les trois groupes de souris (Tableau V). Une augmentation du poids des larves gorgées est observée en comparant l'infestation I avec l'infestation II ($p < 0.05$) ou III ($p < 0.001$) pour les BALB/c contrôles; l'infestation I avec l'infestation III ($p < 0.001$) pour les BALB/c traitées avec l'anti-IL-4 ; et l'infestation I avec l'infestation II ($p < 0.001$) pour les BALB/c traitées avec l'anti-IFN- γ (Tableau V). Les comparaisons verticales, soit entre les différents traitements, ne montrent aucune différence significative. Les titres d'IgE totales sont plus élevés chez les BALB/c traitées avec l'anti-IFN- γ , que les titres d'IgE des contrôles ou des BALB/c traitées avec l'anti-IL-4 (Fig. 3).

3.4.3. Production *in vitro* des cytokines IL-4 et IFN- γ

Rappelons que les souris analysées ont subi différents traitements et ont été infestées trois fois soit par 15 nymphes soit par 50 larves d'*I. ricinus*. Neuf jours après le début de la troisième infestation, les cellules ganglionnaires des souris contrôles, stimulées par de la ConA, produisent de plus grande quantité d'IL-4 (481 U/ml pour l'infestation avec les nymphes et 332 U/ml pour l'infestation avec les larves) que d'IFN- γ (5.9 U/ml pour l'infestation avec les nymphes et 13.5 U/ml pour l'infestation avec les larves) (Fig. 4 et 5). Le traitement des animaux avec les anticorps monoclonaux anti-IL-4 n'a que peu d'effet sur la production *in vitro* des cytokines à ce moment de l'infestation. La quantité d'IL-4 (320 U/ml pour l'infestation avec les nymphes et 296 U/ml pour l'infestation avec les larves), bien que diminuée par rapport aux contrôles, est toujours largement plus importante que celle de l'IFN- γ (3.5 U/ml pour l'infestation avec les nymphes et 7.7 U/ml pour l'infestation avec les larves) (Fig. 4 et 5). Les cellules ganglionnaires des souris déficientes en IL-4, infestées par les nymphes d'*I. ricinus*, stimulées par de la ConA, ne produisent pas d'IL-4 et peu d'IFN- γ (1.18 U/ml) (Fig. 4). Les souris déficientes en IL-4 n'ont pas été infestées par les larves de tiques.

Tableau V

Modulation de la réponse immunologique des souris lors de trois infestations successives et effets sur la biologie des larves d'*I. ricinus*

		Infestation I	Infestation II	Infestation III
% de fixation	Souris contrôles	74	79	82
	Souris + anti-IL-4	80	73	78
	Souris + anti-IFN- γ	77	76	83
Poids de 10 larves gorgées (mg)	Souris contrôles	4.75 \pm 0.21 (N=186)	4.93 \pm 0.24 * (N=198)	5.10 \pm 0.22 *** (N=206)
	Souris + anti-IL-4	4.73 \pm 0.22 (N=200)	4.91 \pm 0.27 (N=183)	5.10 \pm 0.24 *** (N=195)
	Souris + anti-IFN- γ	4.79 \pm 0.26 (N=192)	4.84 \pm 0.26 (N=190)	5.30 \pm 0.29 *** (N=207)

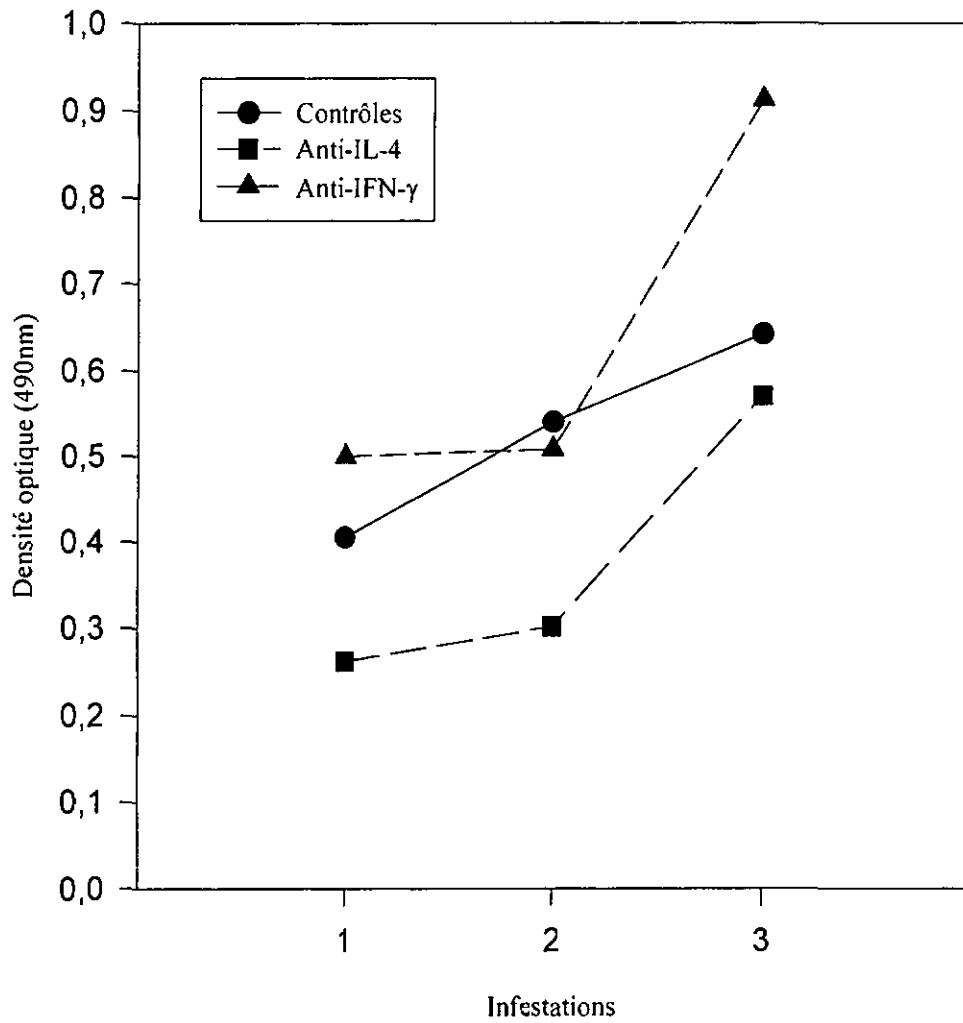
* p<0.05

*** p<0.001

Pourcentage de fixation et poids (moyenne \pm SD) des larves d'*I. ricinus* se gorgeant sur cinq souris BALB/c contrôles, cinq souris BALB/c traitées avec de l'anti-IL-4 ou cinq souris BALB/c traitées avec de l'anti-IFN- γ . Les larves sont pesées 10 par 10. Les comparaisons statistiques ont été réalisées entre les infestations I et II ou I et III.

Figure 3

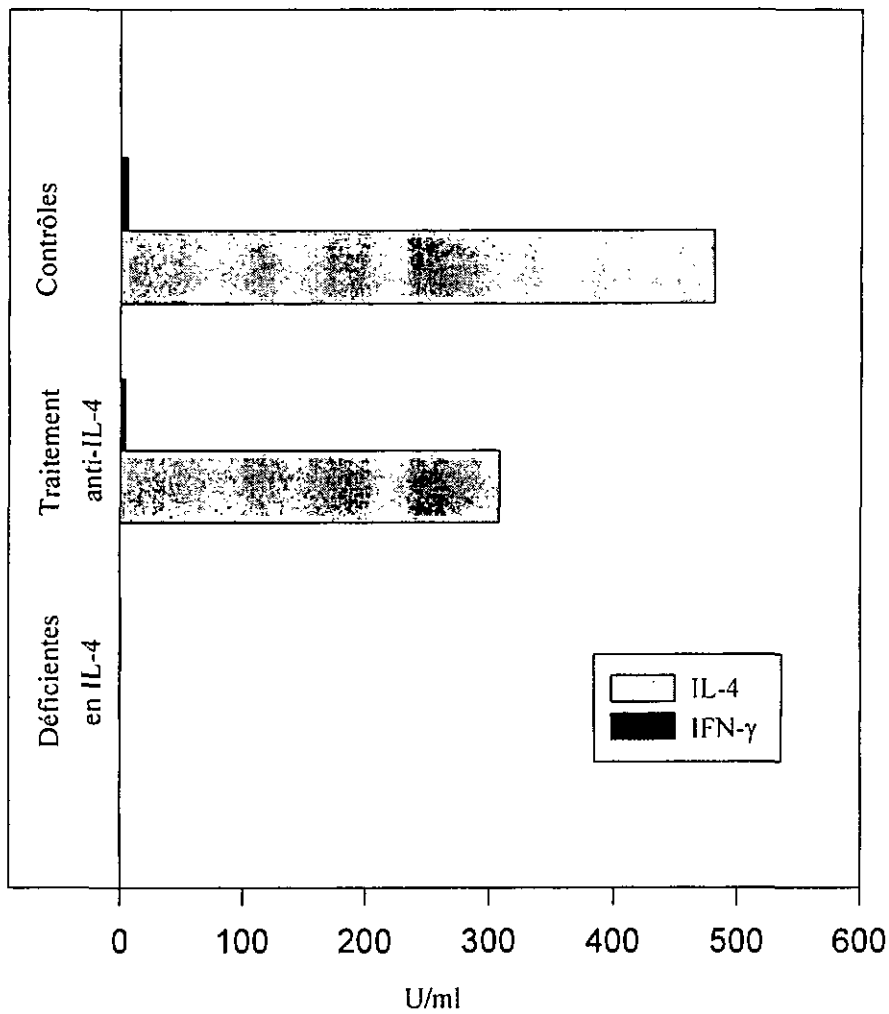
Modulation de la réponse immunologique des souris lors de trois infestations par les larves d'*I. ricinus*: évolution des IgE totales



Mesure par ELISA des IgE totales contenues dans un pool de sérum de cinq BALB/c contrôles (●), cinq BALB/c traitées avec de l'anti-IL-4 (■) ou cinq BALB/c traitées avec de l'anti-IFN- γ (▲) après chaque infestation par 50 larves d'*I. ricinus*. Pour tous les groupes, avant la première infestation le titre des IgE totales ne dépasse pas 0.1.

Figure 4

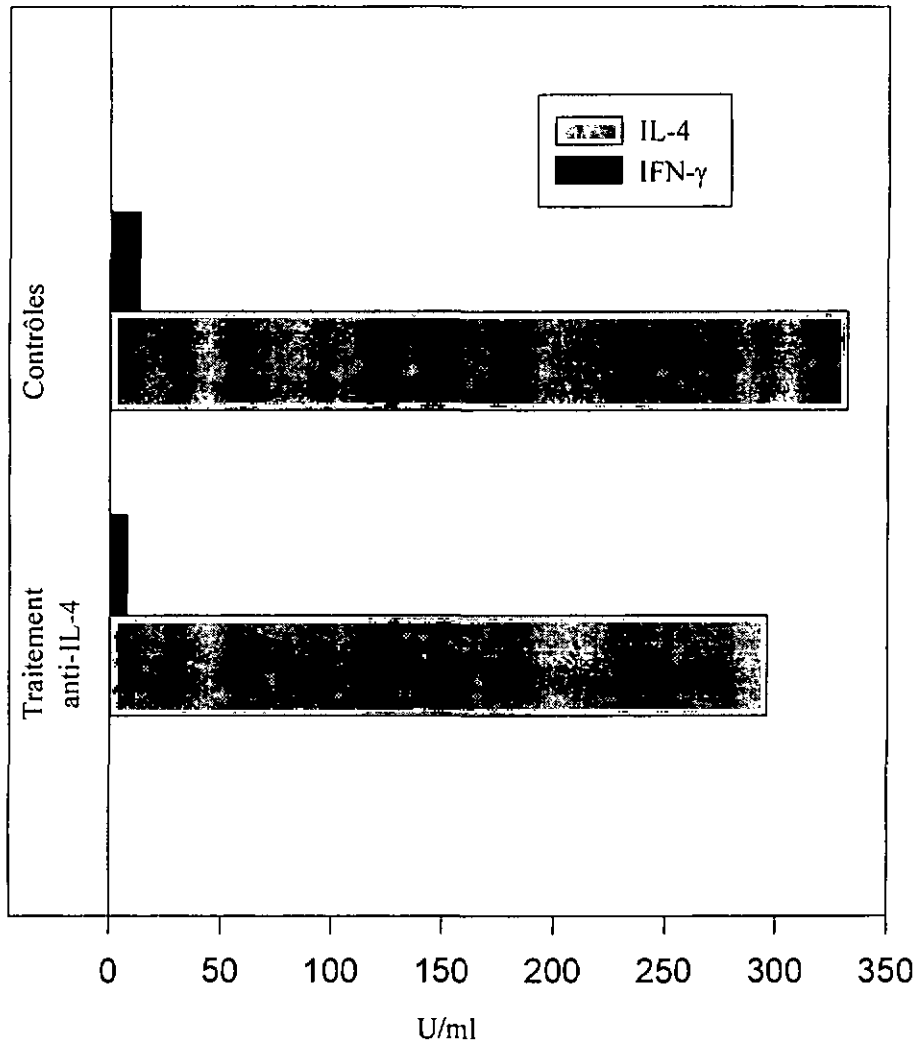
Modulation de la réponse immunologique des souris: mesure de la production *in vitro* des cytokines IL-4 et IFN- γ après trois infestations par les nymphes d'*I. ricinus*



Cinq BALB/c contrôles, cinq BALB/c traitées avec de l'anti-IL-4 ou cinq BALB/c déficientes en IL-4 ont été infestées à trois reprises avec 15 nymphes d'*I. ricinus*. Neuf jours après le début de la troisième infestation, les cellules (10^6 cellules/puits), des ganglions axillaires et brachiaux, ont été mises en culture et stimulées pendant 24 heures avec de la ConA. Les cytokines IL-4 et IFN- γ contenues dans les surnageants de culture ont été quantifiées par ELISA. Pour la préparation des cellules, les ganglions de chaque groupe de souris ont été poolés.

Figure 5

Modulation de la réponse immunologique des souris: mesure de la production *in vitro* des cytokines IL-4 et IFN- γ après trois infestations par les larves d'*I. ricinus*



Cinq BALB/c contrôles ou cinq BALB/c traitées avec de l'anti-IL-4 ont été infestées à trois reprises avec 50 larves d'*I. ricinus*. Neuf jours après le début de la troisième infestation, les cellules (10^6 cellules/puits), des ganglions axillaires et brachiaux, ont été mises en culture et stimulées pendant 24 heures avec de la ConA. Les cytokines IL-4 et IFN- γ contenues dans les surnageants de culture ont été quantifiées par ELISA. Pour la préparation des cellules, les ganglions de chaque groupe de souris ont été poolés.

3.4.4. Production des IgG

Ni les souris contrôles, ni les souris traitées avec de l'anti-IL-4 ou de l'anti-IFN- γ , ni encore les souris déficientes en IL-4 ne produisent d'IgG spécifiques aux antigènes de tiques (extrait de glandes salivaires de femelles), quelque soit l'infestation considérée.

Conclusion partielle

Le titre des IgE totales des souris BALB/c infestées par des nymphes ou des larves d'*I. ricinus* augmente lors des trois infestations successives. Les neutralisations de l'IL-4 ou de l'IFN- γ provoquent, respectivement, une diminution ou une augmentation du titre des IgE totales. Cependant, ces traitements n'ont aucun effet sur le pourcentage de fixation et le poids des tiques gorgées.

3.5. Effet d'un traitement des souris C3H avec de l'IL-12 recombinante

Le schéma de cette expérience est décrit dans matériel et méthodes (voir 2.9.1.). Un groupe de souris a subi des injections d'IL-12 et a été infesté à trois reprises avec 15 nymphes d'*I. ricinus*. Les quantités d'IL-12 injectées ont été modifiées après la première infestation pour éviter l'effet toxique probable de cette cytokine en deuxième et troisième infestation. L'évolution des IgE totales et la détection d'IgG spécifiques ont été considérées. Neuf jours après le début de la troisième infestation, les cellules des ganglions axillaires et brachiaux ont été mises en culture et stimulées pendant 24 heures avec de la ConA. Les cytokines IL-4 et IFN- γ contenues dans les surnageants de culture ont été quantifiées par ELISA.

3.5.1. Biologie des nymphes et évolution des IgE totales

Le traitement avec l'IL-12 influence le poids des nymphes gorgées en deuxième infestation. En effet, les nymphes femelles sont plus légères ($p < 0.001$) de même que les nymphes mâles ($p < 0.01$) lors de cette infestation (Tableau VI). La perturbation de la biologie des tiques pourrait être due à un effet toxique de l'IL-12 et non à une immunomodulation. Les souris semblaient en effet affaiblies au moment de cette infestation. D'autre part, la quantité d'IgE totales des souris C3H traitées avec l'IL-12 augmente au cours des infestations (Fig. 6).

En troisième infestation, le poids des nymphes est à nouveau comparable à celui de la première infestation.

3.5.2. Production des cytokines IL-4 et IFN- γ

Les cellules ganglionnaires mises en culture après la troisième infestation et stimulées avec la ConA produisent plus d'IL-4 (276 U/ml) que d'IFN- γ (36 U/ml) (Fig. 7).

Tableau VI

Traitement des souris C3H avec de l'IL-12: effets de trois infestations successives sur la biologie des nymphes d'*I. ricinus*

	Infestation I	Infestation II	Infestation III
% de fixation	88	70	96
Poids des nymphes femelles gorgées (mg)	4.40±0.61 (N=35)	4.00±0.48** (N=23)	4.39±0.42 (N=37)
Poids des nymphes mâles gorgées (mg)	2.65±0.28 (N=31)	2.35±0.27* (N=26)	2.59±0.29 (N=27)

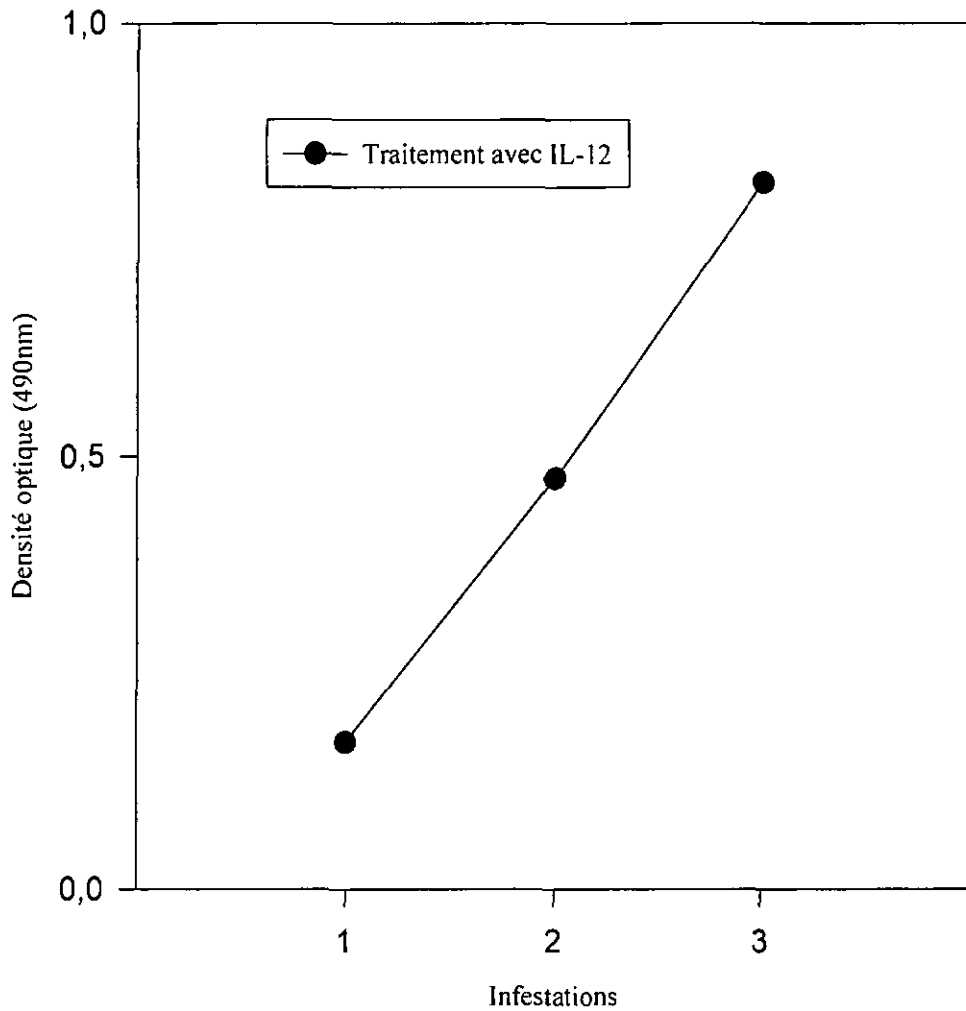
* p< 0.01

** p< 0.001

Pourcentage de fixation et poids (moyenne ± SD) des nymphes d'*I. ricinus* se gorgeant sur cinq C3H traitées avec de l'IL-12 pendant trois infestations. Les comparaisons se font entre les infestations I et II ou I et III.

Figure 6

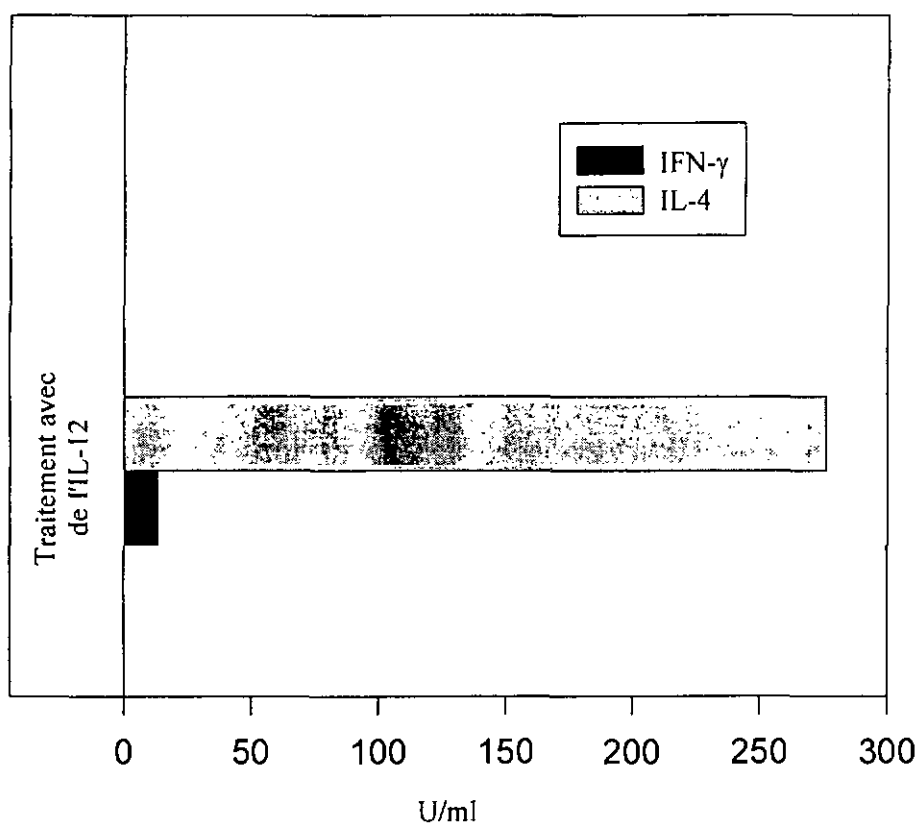
Traitement des souris C3H avec de l'IL-12 : évolution des IgE totales lors de trois infestations successives avec les nymphes d'*I. ricinus*



Mesure par ELISA des IgE totales contenues dans un pool de sérum de cinq C3H traitées avec de l'IL-12 recombinante (●) après chaque infestation par 15 nymphes d'*I. ricinus*. Avant la première infestation, les IgE totales ne dépassent pas 0,1.

Figure 7

Traitement des souris C3H avec de l'IL-12: mesure de la production *in vitro* des cytokines IL-4 et IFN- γ après trois infestations avec les nymphes d'*I. ricinus*



Cinq souris C3H traitées avec de l'IL-12 recombinante sont infestées à trois reprises avec 15 nymphes d'*I. ricinus*. Neuf jours après le début de la troisième infestation, les cellules (10^6 cellules/puits), des ganglions axillaires et brachiaux, sont mises en culture et stimulées pendant 24 heures avec de la ConA. Les cytokines IL-4 et IFN- γ contenues dans les surnageants de culture sont quantifiées par ELISA. Les ganglions des souris sont poolés.

3.6. Inoculation de *B. burgdorferi* à des souris BALB/c, des souris BALB/c déficientes en IL-4 et des souris C3H par les nymphes d'*I. ricinus* infectées ou par des injections de spirochètes

Les BALB/c, les BALB/c déficientes en IL-4 et les C3H ont été infestées à trois reprises par 10 nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi*. L'étude de la biologie des nymphes (% de fixation, poids des nymphes femelles et des mâles gorgées) a été effectuée. L'évolution du titre des IgG, des IgG2a anti-borrélioses et des IgE totales a été étudiée au fil des trois infestations. Neuf jours après le début de la troisième infestation, les cellules des ganglions axillaires et brachiaux ont été mises en culture et stimulées pendant 24 heures avec de la ConA ou pendant 72 heures avec de l'antigène de borrélioses. Les cytokines IL-4 et IFN- γ contenues dans les surnageants de culture ont été quantifiées par ELISA.

Les mêmes souches de souris ont aussi été infectées par trois injections de 2000 spirochètes dilués dans du milieu de culture BSK-H. L'évolution des titres d'anticorps et la production de cytokines *in vitro* ont aussi été considérées.

3.6.1. Infestations avec des nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi*

Pour les trois souches de souris, la présence des spirochètes dans les nymphes ne perturbe pas leur fixation et leur nutrition. On observe une tendance non significative à l'augmentation du poids des nymphes gorgées (Tableau VII). Ce phénomène avait été également observé pour les nymphes non infectées (Tableau I).

3.6.2. Souris infestées par les nymphes infectées par *B. burgdorferi*: production des cytokines IL-4 et IFN- γ

Après une stimulation avec de la ConA, les cellules ganglionnaires des souris BALB/c et des souris C3H produisent des quantités importantes d'IL-4 (232 U/ml et 61 U/ml

Tableau VII

Effets de trois infestations successives sur la biologie des nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi*

		Infestation I	Infestation II	Infestation III
% de fixation	BALB/c	92	79	72
	BALB/c IL-4 déf.	94	90	90
	C3H	88	90	90
Poids des nymphes femelles gorgées (mg)	BALB/c	4.27±0.32 (N=25)	4.32±0.11 (N=22)	4.35±0.37 (N=18)
	BALB/c IL-4 déf.	4.14±0.43 (N=22)	4.25±0.46 (N=21)	4.33±0.42 (N=24)
	C3H	4.10±0.32 (N=18)	4.05±0.22 (N=25)	4.27±0.49 (N=21)
Poids des nymphes mâles gorgées (mg)	BALB/c	2.52±0.34 (N=21)	2.62±0.21 (N=17)	2.72±0.30 (N=19)
	BALB/c IL-4 déf.	2.48±0.27 (N=25)	2.57±0.35 (N=24)	2.54±0.45 (N=21)
	C3H	2.44±0.29 (N=26)	2.60±0.25 (N=20)	2.57±0.40 (N=24)

Pourcentage de fixation et poids (moyenne ± SD) des nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi* se gorgeant sur cinq BALB/c, cinq BALB/c déficientes en IL-4 ou cinq C3H lors de trois infestations. Aucune différence significative n'est observée entre les infestations I et II ou I et III.

respectivement), contrairement à celles des souris BALB/c déficientes en IL-4 qui n'en produisent que 7 U/ml (Tableau VIII). Des quantités négligeables d'IFN- γ sont produites par les trois groupes de souris (2-5 U/ml). Après stimulation avec de l'antigène de borrélie, des quantités négligeables d'IL-4 sont produites par les trois groupes de souris (Tableau VIII). Par contre, de l'IFN- γ est produit par les cellules ganglionnaires des BALB/c déficientes en IL-4 (47 U/ml) et surtout par les cellules ganglionnaires des C3H (101 U/ml).

3.6.3. Injections sous-cutanées de *B. burgdorferi* aux souris: production des cytokines IL-4 et IFN- γ

Après une stimulation avec de la ConA, les cellules ganglionnaires des trois groupes de souris produisent peu d'IL-4 et des quantités négligeables d'IFN- γ (Tableau IX).

Après une stimulation avec de l'antigène de borrélie (ZS7), les cellules ganglionnaires des trois groupes de souris produisent peu d'IL-4 (Tableau IX). Par contre, les cellules ganglionnaires des souris BALB/c déficientes en IL-4 et des souris C3H produisent des quantités significatives d'IFN- γ (37 U/ml et 93 U/ml respectivement)

3.6.4. Production des anticorps

3.6.4.1. Détection par immunoblot des anticorps IgG anti-tiques

On a tenté de détecter des anticorps IgG anti-tiques par immunoblot en utilisant un extrait de glandes salivaires de femelles d'*I. ricinus* qui ont été nourries pendant cinq jours sur un lapin. Aucune des souches de souris, qu'elles soient infestées par les nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi* ou qu'elles aient reçu les borrélie par injection ne développent d'anticorps IgG anti-tiques.

Tableau VIII

Trois infestations successives des souris par des nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi*: mesure de la production *in vitro* des cytokines IL-4 et IFN- γ

		IL-4 (U/ml)	IFN- γ (U/ml)	IL-4 (U/ml)	IFN- γ (U/ml)
		+ ConA		+ ZS7	
BALB/c	Nymphes ZS7	232	2	9	13
BALB/c IL-4 déf.	Nymphes ZS7	7	5	7	47
C3H	Nymphes ZS7	61	5	7	101

Production des cytokines IL-4 et IFN- γ par un pool de cellules ganglionnaires stimulées par de la ConA (4 μ g/puits) pendant 24 heures ou par un extrait ZS7 (5 μ g/puits) pendant 72 heures. Les pools de cellules proviennent de cinq BALB/c, de cinq BALB/c déficientes en IL-4 ou de cinq C3H infestées trois fois par des nymphes infectées par *B. burgdorferi*.

Tableau IX

Trois injections de *B. burgdorferi*: mesure de la production *in vitro* des cytokines IL-4 et IFN- γ

		IL-4 (U/ml)	IFN- γ (U/ml)	IL-4 (U/ml)	IFN- γ (U/ml)
		+ ConA		+ ZS7	
BALB/c	Injection ZS7	18	2	10	12
BALB/c IL-4 déf.	Injection ZS7	8	2	8	37
C3H	Injection ZS7	10	2	9	93

Production des cytokines IL-4 et IFN- γ par un pool de cellules ganglionnaires stimulées par de la ConA (4 μ g/puits) pendant 24 heures ou par un extrait ZS7 (5 μ g/puits) pendant 72 heures. Les pools de cellules proviennent de cinq BALB/c, de cinq BALB/c déficientes en IL-4 ou de cinq C3H ayant reçu trois injections de 2000 spirochètes.

3.6.4.2. Détection par ELISA des anticorps IgG et IgG2a anti-borrélios après trois infestations par des nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi*

Seules les BALB/c déficientes en IL-4 produisent des quantités importantes d'IgG anti-borrélios (DO de 0.730 après la troisième infestation) (fig. 8) et d'IgG2a anti-borrélios (DO de 1.300 après la troisième infestation) (fig. 9). Les titres des IgG et des IgG2a anti-borrélios des BALB/c et des C3H restent bas au cours des infestations (Fig. 8 et 9).

3.6.4.3. Détection par ELISA des anticorps IgG et IgG2a anti-borrélios après trois injections de *B. burgdorferi*

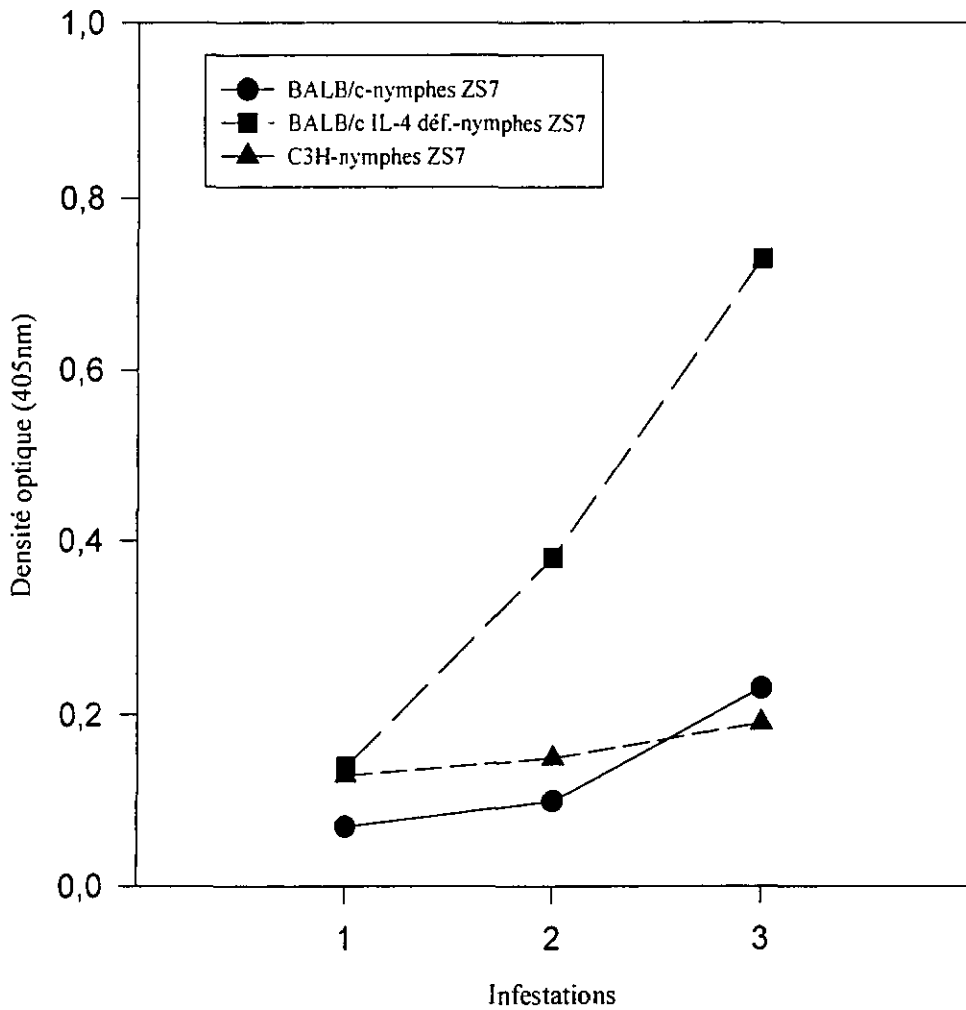
Les BALB/c déficientes en IL-4 et les C3H produisent la même quantité d'IgG anti-borrélios (0.830 pour les BALB/c déficientes en IL-4 et 0.770 pour les C3H après la troisième injection) (Fig. 10). Les BALB/c produisent moins d'anticorps IgG anti-borrélios que les deux autres souches de souris (DO de 0.540 après la troisième injection) (Fig. 10). Les BALB/c déficientes en IL-4 et les C3H produisent de plus grandes quantités d'IgG2a anti-borrélios (DO de 1.380 et 1.340 respectivement après la troisième injection) que les BALB/c (DO de 0.700 après la troisième injection) (Fig. 11).

3.6.4.4. Détection par immunoblot des anticorps IgG et IgG2a anti-borrélios après trois infestations par les nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi* ou après trois injections de *B. burgdorferi*

Les bandes sont classées de telle sorte à montrer les différences d'anticorps produits entre trois infestations par des nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi* et trois injections de *B. burgdorferi* (Fig. 12). Les résultats obtenus pour les IgG anti-borrélios montrent de plus fortes réactions après trois injections de *B. burgdorferi* qu'après trois infestations avec des nymphes infectées par *B. burgdorferi* pour les C3H (A, bandes 1 et 2, Fig. 12) et pour les BALB/c (A, bandes 3 et 4). Pour les BALB/c déficientes en IL-4, les réactions sont fortes dans les deux cas (A, bandes 5 et 6, Fig. 12). La même tendance est observée pour les IgG2a spécifiques à *B. burgdorferi* (B, bandes 1 à 6, Fig. 12).

Figure 8

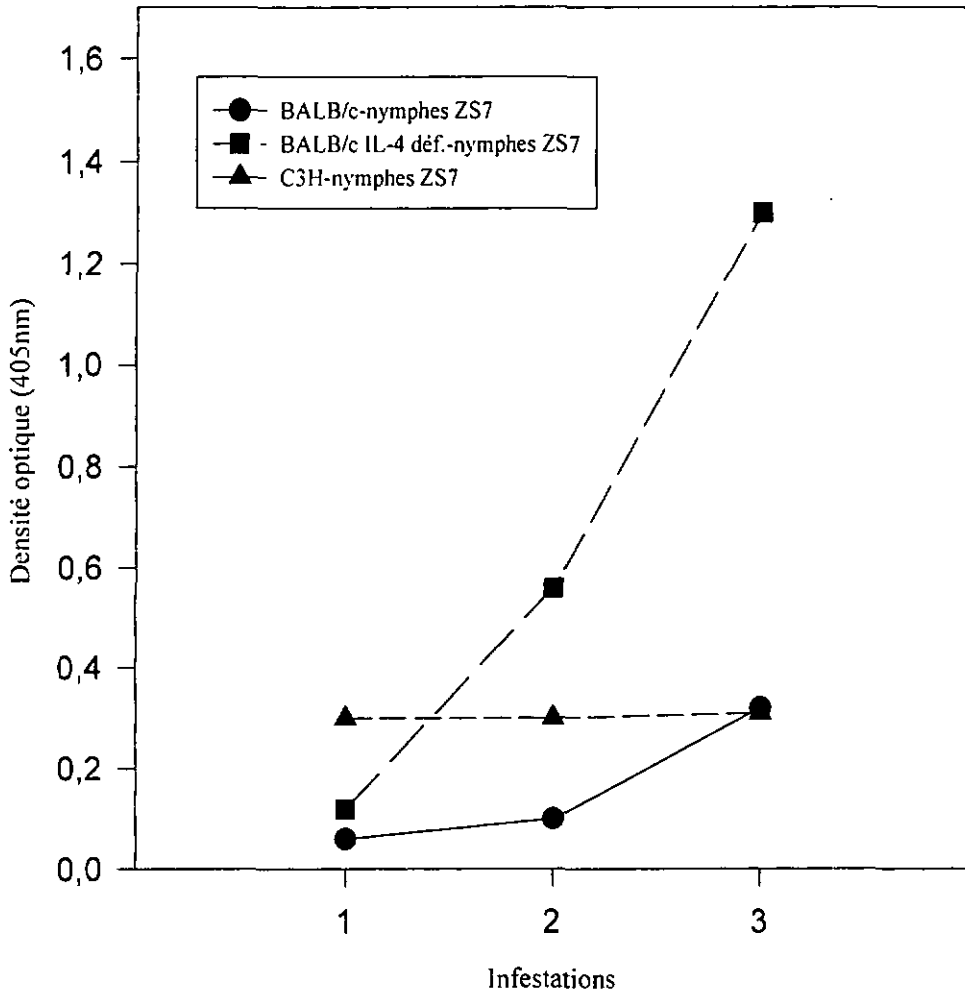
Infestation des souris par des nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi*: évolution des IgG spécifiques à *B. burgdorferi* lors de trois infestations successives



Mesure par ELISA des IgG spécifiques à *B. burgdorferi* contenues dans un pool de sérums de cinq BALB/c (●), cinq BALB/c déficientes en IL-4 (■) ou cinq C3H (▲) après chaque infestation par 15 nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi*. Avant la première infestation, les IgG ne dépassent pas 0.1.

Figure 9

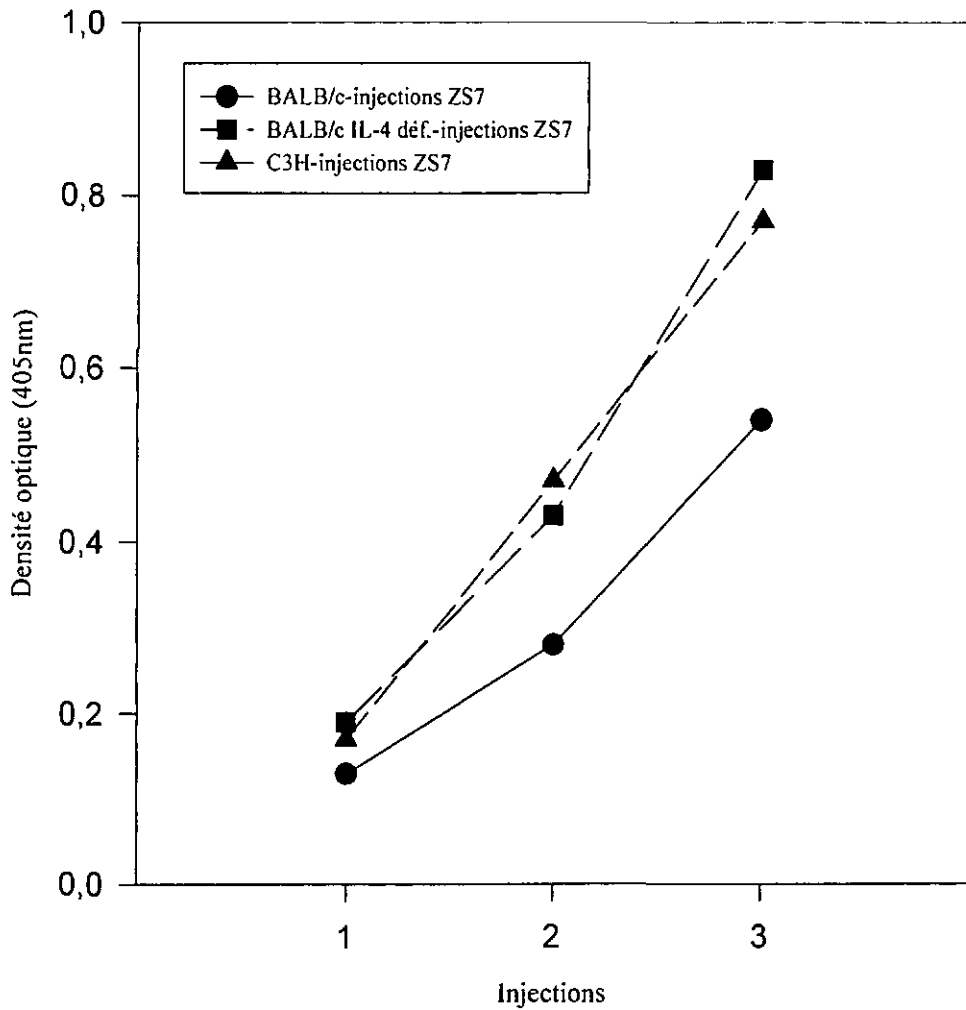
Infestations des souris par des nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi*: évolution des IgG2a spécifiques à *B. burgdorferi* lors de trois infestations successives



Mesure par ELISA des IgG2a spécifiques à *B. burgdorferi* contenues dans un pool de sérums de cinq BALB/c (●), cinq BALB/c déficientes en IL-4 (■) ou cinq C3H (▲) après chaque infestation par 15 nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi*. Avant la première infestation, les IgG2a ne dépassent pas 0.1.

Figure 10

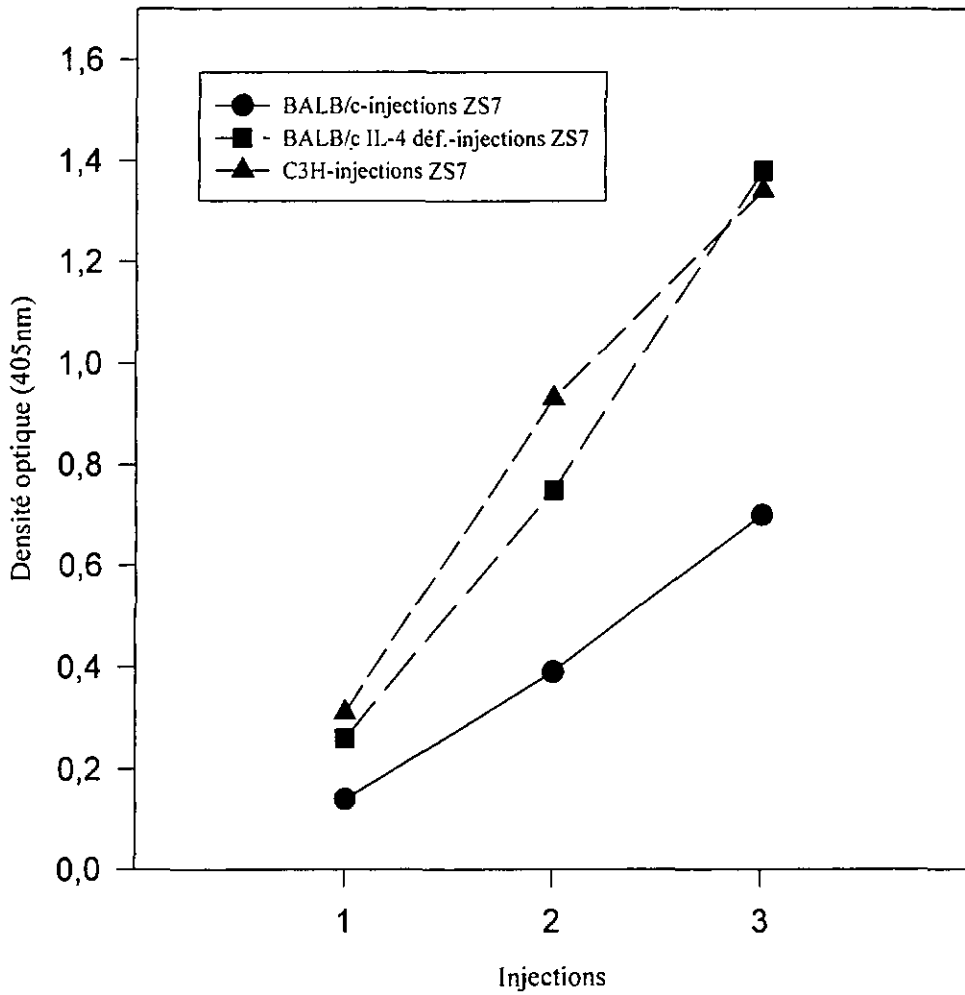
Injections de *B. burgdorferi*: évolution des IgG spécifiques à *B. burgdorferi* lors de trois injections successives



Mesure par ELISA des IgG spécifiques à *B. burgdorferi* contenues dans un pool de sérums de cinq BALB/c (●), cinq BALB/c déficientes en IL-4 (■) ou cinq C3H (▲) après trois injections de 2000 spirochètes. Avant la première infestation, les IgG ne dépassent pas 0.1.

Figure 11

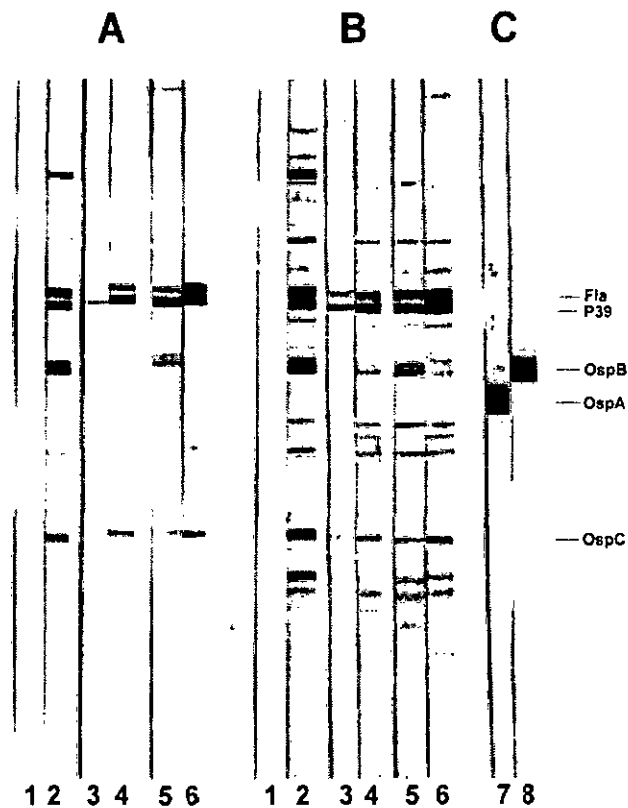
Injections de *B. burgdorferi*: évolution des IgG2a spécifiques à *B. burgdorferi* lors de trois injections successives



Mesure par ELISA des IgG2a spécifiques à *B. burgdorferi* contenues dans un pool de sérums de cinq BALB/c (●), cinq BALB/c déficientes en IL-4 (■) ou cinq C3H (▲) après trois injections de 2000 spirochètes. Avant la première infestation, les IgG2a ne dépassent pas 0.1.

Figure 12

Trois infestations successives des souris par des nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi* ou trois injections de *B. burgdorferi*: détection des IgG et des IgG2a spécifiques à *B. burgdorferi*



Mise en évidence d'IgG (A) et d'IgG2a (B) anti-borrelies chez les souris C3H, BALB/c ou BALB/c déficientes en IL-4 (1, 3, 5 respectivement) infestées trois fois par des nymphes infectées ou injectées trois fois par *B. burgdorferi* (2, 4, 6). Réaction avec des anticorps monoclonaux (C) anti-OspA (7) ou anti-OspB (8).

Des réactions avec des anticorps monoclonaux anti-protéine de surface, anti-OspA ou anti-OspB (C, bande 7 et 8 respectivement, Fig. 12) nous permettent d'affirmer qu'aucune souris ne développe d'anticorps contre l'OspA. Des anticorps anti-OspB sont développés par toutes les souris ayant reçu 3 x 2000 spirochètes avec la plus forte réaction pour les souris C3H. Pour les souris infestées avec les nymphes infectées, seules les BALB/c déficientes en IL-4 produisent des anticorps contre l'OspB.

3.6.3.5. IgE totales après trois infestations par des nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi*

Les IgE totales sont quantifiées par ELISA. Les BALB/c et les C3H produisent les mêmes quantités d'IgE (DO de 0.900 et 0.820 respectivement après la troisième infestation) (Fig.13). Les BALB/c déficientes en IL-4 produisent des quantités négligeables d'IgE (DO de 0.060). (Fig. 13).

3.6.3.6. IgE totales après trois injections de *B. burgdorferi*

Les IgE totales sont quantifiées par ELISA. Seules les BALB/c produisent des IgE totales (DO de 0.500 après la troisième injection) (Fig. 14). Les C3H et les BALB/c déficientes en IL-4 produisent des quantités négligeables d'IgE totales (DO de 0.080 et 0.070 respectivement après la troisième injection) (Fig. 14).

Conclusion partielle

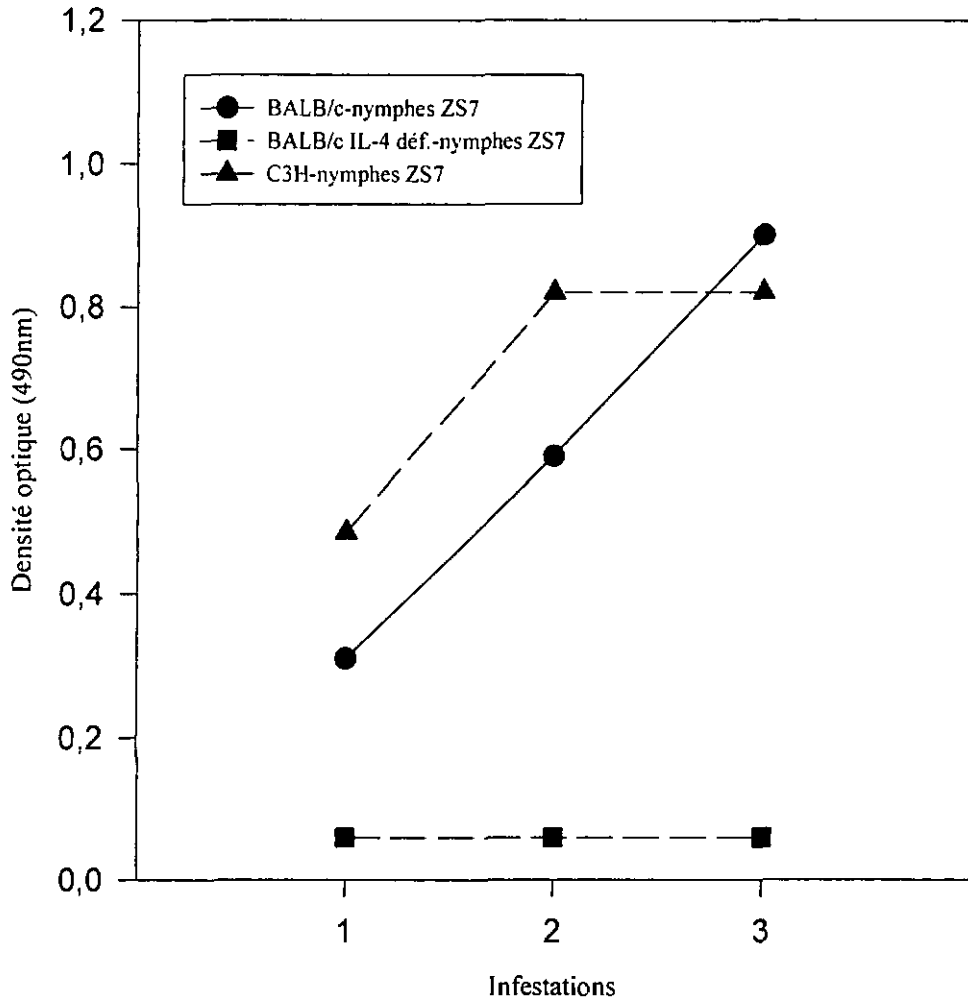
La présence des spirochètes n'influence pas la biologie des nymphes (% de fixation et poids des tiques gorgées) lors de trois infestations.

L'IL-4 produite par les souris BALB/c et C3H suite aux infestations par les nymphes provoque une diminution de la production des IgG et des IgG2a spécifiques aux borrelies et une augmentation de la production des IgE totales en comparaison avec les résultats obtenus avec les souris BALB/c déficientes en IL-4.

Suite aux injections sous-cutanées des spirochètes, les souris BALB/c produisent moins d'IgG et d'IgG2a spécifiques aux borrelies que les souris BALB/c déficientes en IL-4 et les

Figure 13

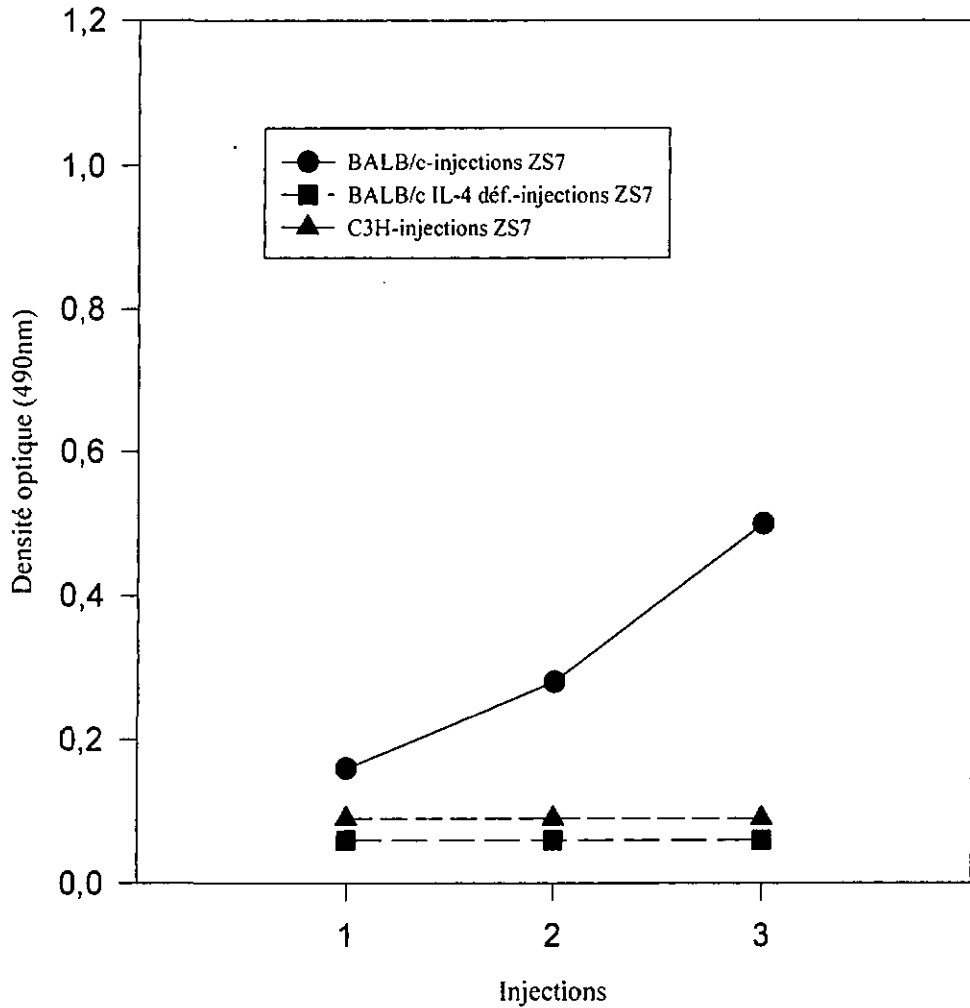
Infestations des souris par des nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi*:
évolution des IgE totales lors de trois infestation successives



Mesure par ELISA des IgE totales contenues dans un pool de sérums de cinq BALB/c (●), cinq BALB/c déficientes en IL-4 (■) ou cinq C3H (▲) après chaque infestation par 15 nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi*. Avant la première infestation, les IgE totales ne dépassent pas 0.1.

Figure 14

Injections de *B. burgdorferi*: évolution des IgE totales lors de trois injections successives



Mesure par ELISA des IgE totales contenues dans un pool de sérums de cinq BALB/c (●), cinq BALB/c déficientes en IL-4 (■) ou cinq C3H (▲) après trois injections de 2000 spirochètes. Avant la première infestation, les IgE totales ne dépassent pas 0.1.

C3H. Par contre, elles produisent d'importantes quantités d'IgE totales contrairement aux deux autres groupes de souris.

Les BALB/c développent une réponse Th2 contre les borrelies, qu'elles soient inoculées par les nymphes infectées ou injectées par une seringue. Les BALB/c déficientes en IL-4 produisent une réponse Th1 dans les deux cas. Pour les souris C3H infestées par les nymphes infectées, malgré la quantité importante d'IFN- γ produite par les cellules ganglionnaires stimulées avec de l'antigène de borrelies (10I U/ml), l'IL-4 produite par les cellules ganglionnaires stimulées avec la ConA domine et la réponse immunologique de ces souris est Th2. En effet, elles produisent peu d'IgG2a et d'importantes quantités d'IgE totales. Par contre, suite à une injection des spirochètes, la réponse immunologique des C3H est dirigée vers les Th1.

4. Discussion

4.1. Immunité anti-tiques

4.1.1 Résistance

Dans le cas d'infestation d'animaux avec des tiques, une résistance des hôtes se manifeste par des perturbations de la biologie des ectoparasites. La résistance est très nette lorsque des femelles adultes d'*I. ricinus* se gorgent sur des lapins (Bowessidjaou *et al.*, 1977). En effet, en deuxième infestation, le poids des femelles gorgées diminue de 32% et atteint une diminution de 68% en quatrième infestation. Les lapins développent une faible résistance lorsqu'ils sont infestés par les nymphes d'*I. ricinus* (Andreutti, résultats non publiés). Seul le poids des nymphes femelles diminue au cours des infestations, cette diminution de poids atteint au plus 14% à la troisième infestation. Le poids des nymphes mâles ne varie pas au cours des infestations. Les souris infestées par des nymphes d'*I. ricinus* ne développent pas de résistance. Cette observation a été faite avec les souris DBA (Andreutti, résultats non publiés) de même qu'avec les BALB/c (Mbow *et al.*, 1994a; Dusbabek *et al.*, 1995). Par contre, les souris semblent développer une faible résistance suite à des infestations par des larves de différentes autres espèces de tiques. Dans ce cas, les auteurs remarquent surtout une augmentation du nombre de larves partiellement gorgées et une faible diminution du poids des larves gorgées (DenHollander & Allen, 1985a et 1985b; Matsuda *et al.* 1985). Selon les modèles, la fixation des tiques diminue de 15 à 95%, tandis que le poids des larves gorgées diminue de 7 à 15%.

Dans notre travail, les souris ne développent pas de résistance contre les nymphes d'*I. ricinus*. Cette observation a été répétée dans différentes situations: en infestant

différentes souches de souris, en variant la charge parasitaire, après des traitements des souris avec des anticorps monoclonaux anti-IL-4 ou anti-IFN- γ , en infestant les souris avec des nymphes infectées par *B. burgdorferi*. Les seules perturbations de la biologie des nymphes remarquées dans cette étude sont des diminutions de poids suite à un traitement avec de l'IL-12 recombinante. Mais nous pensons qu'il s'agit dans ce cas d'un effet toxique de l'IL-12; les souris étaient affaiblies, ce qui a pu perturber les tiques. Parfois, le pourcentage de fixation des tiques varie d'une infestation à l'autre. Dans ce cas, les nymphes ou les larves se sont échappées en profitant du détachement de la capsule. De plus, bien qu'elles soient stockées dans des conditions d'humidité et de température contrôlées, les tiques paraissent influencées par les saisons. En automne et en hiver, elles se nourrissent moins bien qu'au printemps ou en été.

4.1.2. Polarisation Th1 ou Th2?

Mbow *et al.* (1994a) ont montré que les BALB/c ne devenaient pas résistantes aux infestations par des nymphes d'*I. ricinus*. Pourtant, dès une réinfestation, les souris développent une hypersensibilité immédiate, une faible hypersensibilité retardée et le site de fixation des nymphes est envahi de cellules inflammatoires, neutrophiles, éosinophiles, monocytes/lymphocytes, basophiles et mastocytes en voie de dégranulation. La détection d'ARN messagers (ARNm) codant pour l'IFN- γ , l'IL-2 et l'IL-4 a été effectuée par des hybridations *in situ* sur des coupes de peau de souris prélevées 72 heures après une troisième infestation (Mbow *et al.*, 1994c). Un signal positif intense est observé avec la sonde détectant les ARNm codant pour l'IFN- γ . Un signal plus faible est obtenu avec la sonde IL-2. Un faible signal est détecté avec la sonde IL-4. La réponse immunologique locale serait ainsi mixte Th1/Th2. Par contre, des cellules ganglionnaires de BALB/c, prélevées neuf jours après le début de l'infestation par les nymphes d'*I. ricinus*, produisent essentiellement de l'IL-4 après mises en culture et stimulation avec de la ConA pendant 24 heures (Ganapamo *et al.*, 1995). La réponse immunologique qui se développe dans les organes lymphoïdes de drainage est dirigée plutôt vers les Th2. Les deux travaux ne nous paraissent pas contradictoires. En effet, les tissus considérés et les moments des observations sont différents dans les deux cas. D'autre part, les molécules détectées varient également, ARNm ou cytokines après stimulation.

Dans notre travail, nous avons confirmé les résultats obtenus par Ganapamo *et al.* (1995), à savoir que les cellules ganglionnaires des BALB/c infestées par les nymphes d'*I. ricinus*, stimulées *in vitro* avec de la ConA, produisent des quantités importantes d'IL-4 et peu d'IFN- γ . La ConA est un mitogène qui stimule les lymphocytes activés. Dans les ganglions drainant le site de fixation des tiques, il n'est pas erroné d'admettre que la plupart des lymphocytes activés le sont par la salive des tiques. Dans leur étude, Elghazali *et al.* (1997) montrent que la quantité de cytokine produite est plus importante quand des cellules mononuclées sont stimulées avec un mitogène qu'avec de l'antigène, mais le rapport IL-4/IFN- γ reste le même.

Un autre moyen de déterminer la polarisation de la réponse immunitaire est d'analyser les sous-classes d'immunoglobulines produites. L'IL-4, produite par les Th2, induit les cellules B, préalablement activées par du LPS ou par les lymphocytes T, à produire des IgG1 et des IgE par des switch séquentiels des chaînes lourdes des immunoglobulines (Mandler *et al.*, 1993). L'IFN- γ , sécrétée par les Th1, stimule l'expression des immunoglobulines d'isotype IgG2a et inhibe la production des isotypes IgG1, IgG2b, IgG3 et IgE (Snapper & Paul, 1987). Dans notre travail, nous avons recherché les IgG spécifiques produites contre des antigènes de glandes salivaires de tiques par immunoblot ou les IgE totales par ELISA. Les résultats obtenus ont montré que les BALB/c ne produisent pas d'IgG spécifiques anti-tiques mais des quantités croissantes d'IgE totales lors des infestations successives. Nous pouvons dès lors admettre que la réponse immunitaire des BALB/c infestées par les nymphes d'*I. ricinus* est polarisée vers les Th2.

Comme la réponse immunologique est influencée par la constitution génétique des souris (Güler *et al.*, 1996), d'autres souches de souris ont été infestées pour contrôler si elles étaient susceptibles aux infestations avec les nymphes d'*I. ricinus* comme le sont les BALB/c. Deux souches de souris d'un haplotype différent de celui des BALB/c (H-2d), les C57BL/6 (H-2b) et les C3H (H-2k), ont été infestées à trois reprises avec 15 nymphes d'*I. ricinus*. Comme le montre le pourcentage de fixation et le poids des tiques, ces souris ne développent pas de résistance aux nymphes d'*I. ricinus*. Leur réponse immunologique est également dirigée vers les Th2, elles produisent des quantités croissantes d'IgE totales au fil des infestations. Pour d'autres souches de souris, soient DBA (H-2d), CBA (H-2k), SJL (H-2s) et FVB (H-2q), une seule infestation et le dosage des cytokines IL-4 et IFN- γ produites par les cellules ganglionnaires stimulées pendant 24 heures avec de la ConA, ont été réalisées. Pour toutes les souches testées de grandes quantités d'IL-4 et peu d'IFN- γ ont

été détectées. Ainsi, l'infestation par les nymphes d'*I. ricinus* semble diriger la réponse immunologique des souris vers les Th2.

4.1.3. Immunomodulation

Puisque toutes les souches de souris développent une réponse Th2 suite aux infestations par les nymphes d'*I. ricinus*, nous avons décidé de moduler la réponse immunologique des souris dans l'espoir qu'elles développent une résistance et de pouvoir ainsi étudier ce phénomène pour mieux le comprendre. Des expériences de neutralisation de l'IL-4 et de l'IFN- γ ont été pratiquées sur des BALB/c. Ces neutralisations ne perturbent pas la biologie des tiques. Le pourcentage de fixation et les poids des tiques gorgées ne sont pas modifiés par les traitements. Pourtant, les neutralisations ont un effet sur les quantités d'IgE totales produites suite aux infestations. Les injections d'anti-IL-4 provoquent une diminution des IgE, tandis que le traitement avec des anti-IFN- γ provoque une augmentation de ces immunoglobulines. Ainsi, dans notre système, les IgE n'induisent pas de résistance contrairement à ce qui se passe chez des souris infestées par des larves d'*H. longicornis*. Dans ce modèle, une résistance est observée et il semblerait que les IgE soient indispensables à son acquisition (Matsuda *et al.*, 1990).

Dans le système leishmanies-souris, une réponse Th1 est nécessaire à la guérison (Belosevic *et al.*, 1989). Ainsi, un traitement des BALB/c avec de l'anti-IL-4 améliore l'effet thérapeutique de l'antimoine tout en permettant le développement d'une réponse Th1 (Nabors & Farrell, 1994). Dans notre système, les injections d'anti-IL-4, précédant chaque infestation par les tiques, provoquent une légère diminution de la quantité d'IL-4 produite par les cellules ganglionnaires prélevées après trois infestations. Cependant, la quantité d'IL-4 est toujours largement supérieure à celle de l'IFN- γ . Les injections d'anti-IL-4 n'ont donc pas permis de diriger la réponse vers les Th1 d'une façon constante et définitive. Les anticorps monoclonaux inhibent la cytokine produite mais non la capacité des cellules à produire cette cytokine. Ainsi, comme les injections d'anti-IL-4 n'ont pas permis le shift vers les Th1, les cellules ganglionnaires de ces souris, stimulées *in vitro* avec de la ConA produisent de grandes quantités d'IL-4. Nous n'avons fait aucune expérience permettant d'affirmer que l'IL-4 a été totalement neutralisée *in vivo* suite aux injections d'anti-IL-4. Cependant, suite aux traitements avec l'anti-IL-4, les titres en IgE des souris traitées sont nettement inférieurs à ceux des souris contrôles. Sachant que l'IL-4

est indispensable à la production des IgE par les lymphocytes B (Mandler *et al.*, 1993), nous pouvons admettre que les injections d'anti-IL-4 ont neutralisé, *in vivo*, cette cytokine. Cependant, il se peut que la neutralisation soit incomplète puisque les titres en IgE des souris traitées augmente après une troisième infestation.

L'environnement en cytokines est important lors de la différenciation des lymphocytes précurseurs Th0 en Th1 ou Th2. En présence d'IL-4 et de l'antigène, les lymphocytes se différencient *in vitro* en Th2, quelle que soit la cellule présentatrice de l'antigène, tandis que l'IL-12, produite surtout par les macrophages et les lymphocytes B, favorise le différenciation des Th1 (O'Garra & Murphy, 1994). Une absence totale d'IL-4, chez les souris déficientes en IL-4, pourrait ainsi favoriser la prolifération des Th1. Cette observation a été faite lors d'une infection par *L. major* (Kopf *et al.*, 1996). Dans nos expériences, les BALB/c déficientes en IL-4 ne produisent pas d'IgE totales ni d'IgG spécifiques suite aux infestations successives avec des nymphes d'*I. ricinus*. Les cellules ganglionnaires de ces souris, mises en culture neuf jours après la troisième infestation, ne produisent pas d'IL-4 et peu d'IFN- γ après stimulation avec de la ConA. Ainsi, malgré l'absence d'IL-4, on n'observe pas de prolifération des Th1.

Un moyen de favoriser la prolifération des Th1 est l'injection d'IL-12. Un traitement avec l'IL-12 permet la guérison des BALB/c, qui, sans traitement, meurent à la suite d'une infection avec *L. major* (Heinzel *et al.*, 1993). Ce type d'expérimentation, soit des injections d'IL-12, a été réalisé dans notre système. Des souris C3H ont été choisies car, infestées par les tiques, ces souris, avec les CBA d'ailleurs, produisent des quantités d'IFN- γ supérieures aux autres souches de souris. Les injections d'IL-12 (voir point 3.5.1., tableau VI) produisent une diminution du poids des nymphes mâles et des nymphes femelles en deuxième infestation. En troisième infestation, les poids sont à nouveau comparables à ceux de la première infestation. Prélevées après la troisième infestation, les cellules ganglionnaires produisent de grandes quantités d'IL-4 et peu d'IFN- γ . Un shift momentané de la réponse immunologique vers les Th1 qui aurait perturbé la biologie des nymphes, aurait pu être envisagé si l'augmentation constante des IgE totales et l'absence d'IgG2a spécifiques anti-tiques n'avaient pas été observées. On doit encore envisager un effet toxique de l'IL-12 qui perturberait la nutrition des nymphes. Cet effet toxique aurait disparu après diminution des quantités d'IL-12 injectées dès le début de la deuxième infestation. Lors d'une expérience préliminaire, des souris C3H avaient déjà été traitées par de l'IL-12 recombinante (résultats non présentés). Le poids des nymphes mâles se gorgeant

sur ces souris était inférieur au poids des nymphes mâles se gorgeant sur des animaux contrôles. De plus, ce traitement inhibait la production des cytokines IL-4 et IFN- γ . Chez ces souris, les ganglions drainant étaient diffus et d'un aspect laiteux et ne contenaient que très peu de cellules. De plus, les souris étaient très affaiblies. Nous supposons que les quantités d'IL-12 injectées (5 injections de 0.5 μ g réparties sur cinq jours, la première injection ayant été faite un jour avant l'infestation par les nymphes) étaient toxiques. Les effets toxiques de l'IL-12 déclenchent, entre autres, une anémie, une neutropénie et une lymphopénie (Romani *et al.*, 1997). Ces perturbations de la physiologie des souris pourraient perturber la biologie des nymphes.

4.1.4. Polarisation Th2

Les prostaglandines pourraient être à l'origine de la réponse Th2. La salive de plusieurs espèces d'Ixodides contient des prostaglandines (PGs). C'est le cas de la salive d'*A. americanum* et de *H. anaticum* (Ribeiro *et al.*, 1992), d'*I. dammini* (Ribeiro *et al.*, 1985) et de *B. microplus*. Les PGs de la série 2, comme les PGE₂, les PGD₂ et les PGF_{2 α} sont dérivés de l'acide gras polyinsaturé, l'acide arachidonique (AA). Pour qu'un tissu puisse produire des PGs, il doit avoir la capacité d'accumuler et de stocker l'AA puis de convertir cet AA en PGs. De récentes études ont montré que les glandes salivaires des femelles d'*A. americanum* satisfaisaient à ces critères (Bowman *et al.*, 1996). L'AA contenu dans les glandes salivaires est séquestré lors du repas sanguin.

Pour prendre son repas sanguin, la tique enfonce son rostre dans la peau de son hôte. Par mouvements de l'hypostome et des dents des chélicères, des capillaires sont rompus et il se forme des microhémorragies. Normalement, ces microhémorragies devraient être arrêtées immédiatement lors d'un processus d'hémostase normale. La première phase de ce phénomène implique l'adhésion des plaquettes aux vaisseaux sanguins endommagés puis leur agrégation. Les plaquettes exposées au collagène de ces endothéliums sont activées et libèrent de l'ADP, ce qui amplifie l'attraction et l'agrégation d'autres plaquettes. Certains arthropodes, comme les moustiques ou les mouches hématophages, empêchent l'agrégation des thrombocytes en sécrétant une enzyme, l'apyrase, qui stoppe les effets de l'ADP en la convertissant en AMP. Certaines tiques possèdent aussi cette enzyme (*I. dammini*) tandis que d'autres pas (*A. americanum*). Nous avons mentionné précédemment que les tiques

sécrètent des PGs, et notamment la PGI₂, connues pour être de puissants inhibiteurs de l'agrégation des plaquettes et de la sécrétion d'ADP.

Il est nécessaire que le flux de sang persiste tout au long du repas sanguin malgré le fait que des peptides vasoconstricteurs soient normalement relargués par l'endothélium vasculaire lors d'une blessure. A cet effet, les PGs sont de puissants vasodilatateurs et contrent l'effet de ces peptides.

Mais ce qui nous intéresse plus particulièrement dans ce travail, c'est le rôle immunosuppresseur des PGs. La salive ou un extrait de glandes salivaires de tiques empêchent le bon fonctionnement des lymphocytes T. Ce dysfonctionnement est en partie dû à la réduction de la production de certaines cytokines, comme l'IL-2 ou l'IFN- γ (Ramachandra & Wikel, 1992).

La PGE₂ inhibe la production de l'IL-2 et de l'IFN- γ par les lymphocytes T mais pas celle de l'IL-4 et de l'IL-5 et ainsi favorise le développement des lymphocytes de type 2 (Th2) (Betz & Fox, 1991; Katamura *et al.*, 1995). Les cellules dendritiques préalablement incubées avec de la PGE₂ ne produisent pas d'IL-12 mais une grande quantité d'IL-10, contrairement aux cellules dendritiques contrôles, sans stimulation préalable avec de la PGE₂, qui produisent une importante quantité d'IL-12 et très peu d'IL-10 (Kalinski *et al.*, 1997).

L'accès aux Th1 peut également être bloqué par l'IL-10. Cette cytokine empêche la prolifération des Th1 en bloquant l'expression des molécules de surface B7 et la production de l'IL-12 par les CPA, surtout par les macrophages (O'Garra et Murphy, 1994).

En conclusion, les stades immatures d'*I. ricinus* provoquent une forte polarisation Th2 de la réponse immunitaire des souris BALB/c (H-2d), DBA (H-2d), C57BL/6 (H-2b), C3H (H-2k), CBA (H-2k), SJL (H-2s) et FVB (H-2q). Aucune des souches de souris pluriinfestées (BALB/c, C57BL/6 et C3H) n'a permis le développement d'une résistance acquise. Cette réponse n'a pas pu être inversée ni en bloquant l'IL-4, ni en injectant de l'IL-12 sans doute parce que des constituants de la salive ou l'IL-10 bloquent l'accès à une réponse Th1.

4.2. Immunité anti-borrélios

Dans ce travail, nous avons voulu comparer l'effet des infestations avec des nymphes d'*I. ricinus* indemnes ou infectées par *B. burgdorferi* et l'effet de l'injection des spirochètes par une seringue.

Les souris BALB/c, BALB/c déficientes en IL-4 et C3H infestées par des nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi* ne développent pas de résistance contre les tiques. La présence des spirochètes, mais surtout la réponse immunitaire se développant contre ces micro-organismes, ne semble en aucun cas perturber la biologie des nymphes. Par contre, les tiques influencent la réponse immunitaire induite contre les borrélios.

Afin d'être au plus près de la réalité, nous avons fait des injections sous-cutanées de 2000 spirochètes, chiffre correspondant sans doute à la quantité injectée par les nymphes (Gern, communication personnelle). Les cellules ganglionnaires de BALB/c infestées à trois reprises par des nymphes infectées par *B. burgdorferi* produisent de l'IL-4 (232 U/ml) et peu d'IFN- γ (2 U/ml) lorsqu'elles sont stimulées avec de la ConA. Lorsque ces mêmes cellules ganglionnaires sont stimulées avec un extrait de *B. burgdorferi*, elles ne produisent plus d'IL-4 (9 U/ml) et toujours très peu d'IFN- γ (13 U/ml). Ces souris produisent peu d'IgG2a spécifiques à *B. burgdorferi* et beaucoup d'IgE totales. Aucune IgG anti-tique n'a été décelée. La réponse immunitaire de ces souris est polarisée vers les Th2. Les cellules ganglionnaires des C3H infestées à trois reprises par les nymphes infectées par *B. burgdorferi* produisent de l'IFN- γ (101 U/ml) lorsqu'elles sont stimulées avec un extrait de borrélios. Cet IFN- γ semble influencer la production d'IL-4 par les cellules ganglionnaires des C3H stimulées avec de la ConA. Celles-ci ne produisent plus que 61 U/ml d'IL-4 après trois infestations par les nymphes d'*I. ricinus* infectées par *B. burgdorferi* contre 260 U/ml après trois infestations par les nymphes d'*I. ricinus* non-infectées (résultats non présentés). Cependant, l'IL-4 semble toujours dominer, car, chez ces souris, peu d'IgG2a spécifiques aux borrélios et beaucoup d'IgE totales ont été décelées. La réponse immunitaire des C3H est, comme pour les BALB/c, polarisée vers les Th2. Par contre, celle des BALB/c déficientes en IL-4 semble être plutôt de type Th1. Ainsi, les cellules ganglionnaires de ces souris produisent de l'IFN- γ (47 U/ml) après stimulation avec un extrait de *B. burgdorferi*. Leur sérum contient de grandes quantités d'IgG2a spécifiques aux borrélios et très peu d'IgE totales.

Lorsque les souris reçoivent les spirochètes par injections, les cellules ganglionnaires stimulées avec un extrait de *B. burgdorferi* produisent de l'IFN- γ , soit 93 U/ml pour les C3H, 37 U/ml pour les BALB/c déficientes en IL-4 et 12 U/ml seulement pour les BALB/c. L'ensemble des groupes de souris produit des quantités négligeables d'IL-4 (8-10 U/ml). La stimulation de ces mêmes cellules avec de la ConA montre une faible production d'IFN- γ (2 U/ml) et d'IL-4 (8 U/ml pour les BALB/c déficientes en IL-4, 10 U/ml pour les C3H et 18 U/ml pour les BALB/c).

Les BALB/c déficientes en IL-4 produisent autant d'IgG2a spécifiques à *B. burgdorferi* qu'elles soient infestées par des nymphes infectées par *B. burgdorferi* ou qu'elles reçoivent les borrélioses par injection. Par contre, les C3H et les BALB/c produisent plus d'IgG2a (DO 1.340 et 0.700 respectivement) quand elles reçoivent les spirochètes par injection qu'à la suite d'une infestation (DO 0.310 et 0.320 respectivement). Seules les BALB/c, produisent des IgE après injection des bactéries. Le peu d'IL-4 produite par les cellules ganglionnaires des BALB/c, démontré après stimulation avec la ConA, semble suffisant pour influencer la production des IgG2a anti-borrélioses et des IgE totales.

En résumé, les BALB/c développent une réponse Th2 contre les borrélioses, qu'elles soient inoculées par les nymphes infectées ou injectées par une seringue. Les BALB/c déficientes en IL-4 produisent une réponse Th1 dans les deux cas. La réponse Th2 des C3H est diminuée lorsque les souris sont infestées avec des nymphes infectées par *B. burgdorferi* par rapport à une infestation avec des nymphes indemnes (diminution de la production d'IL-4 après stimulation des cellules ganglionnaires avec de la ConA) mais cette réponse Th2 est toujours dominante. La production d'IgG2a spécifique à *B. burgdorferi* est faible et celle des IgE totales est importante. Par contre, les C3H développent une réponse Th1 lorsque les spirochètes sont injectés par une seringue.

Dans leur travail, Keane-Myers et Nickell (1995) ont montré que les C3H et les BALB/c avaient des susceptibilités différentes aux borrélioses. Suite à une injection sous-cutanée de 5×10^5 spirochètes, les C3H développent de sévères pathologies incluant des arthrites et un grand nombre de bactéries sont disséminées dans les tissus. Les BALB/c sont résistantes, elles ne présentent pas d'inflammation de la jonction tibio-tarsale et peu de bactéries colonisent leurs tissus. Les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle important dans le contrôle de la croissance des spirochètes puisque après la destruction de ces cellules par un anticorps monoclonal anti-CD4, les arthrites sont plus sévères et une augmentation du nombre de spirochètes retrouvés dans les tissus est observée. Les cytokines produites ainsi

que les sous-classe d'IgG suggèrent que les souris susceptibles, les C3H, développent une réponse Th1 suite à l'infection par *B. burgdorferi*, tandis que les souris résistantes, les BALB/c, présentent une réponse Th2. Des expériences de déplétion *in vivo* de l'IL-4 montrent l'importance de cette cytokine dans le contrôle de la croissance des spirochètes.

Dans une autre étude, les borréliés sont injectées aux souris à travers le vecteur *I. scapularis* (Zeidner *et al.*, 1997). La réponse immunologique des souris C3H contre les nymphes non-infectées d'*I. scapularis* est polarisée vers les Th2. Cette polarisation est amplifiée lorsque les C3H sont infestées par des nymphes infectées avec *B. burgdorferi*. Zeidner *et al.* (1997) suggèrent que le vecteur et le pathogène utilisent les mêmes mécanismes pour échapper au système immunitaire de l'hôte en favorisant une réponse de type Th2. En effet, l'IFN- γ empêcherait la transmission des borréliés. Les deux études montrent des résultats opposés. Pour Keane-Myers et Nickell (1995), c'est l'IL-4 qui contrôle la croissance des spirochètes tandis que pour Zeidner *et al.* (1997), c'est l'IFN- γ qui contrôle la transmission des borréliés.

Ainsi, dans notre modèle, l'infestation par les nymphes serait bénéfique pour la transmission des pathogènes si l'on se réfère aux travaux de Zeidner *et al.* (1997). Par contre, si l'IL-4 contrôle la croissance des spirochètes, comme le suggèrent Keane-Myers et Nickell (1995), les tiques favoriseront leur élimination.

L'analyse, par immunoblot, de la production des anticorps IgG ou IgG2a spécifiques aux borréliés, nous permet d'identifier les protéines immunogéniques. Ces analyses confirment les résultats obtenus par Schaible *et al.* (1993) et Gern *et al.* (1993), à savoir que les souris ne développent pas d'anticorps contre l'OspA si les quantités de spirochètes injectées sont inférieures à 10^4 . Ils émettent la même hypothèse en ce qui concerne l'OspB. Dans nos expériences, des anticorps anti-OspB sont développés par toutes les souris ayant reçu 3×2000 spirochètes avec la plus forte réaction pour les souris C3H. Pour les souris infestées avec les nymphes infectées, seules les BALB/c déficientes en IL-4 produisent des anticorps contre l'OspB. Gern *et al.* (1993) suggèrent que les anticorps anti-OspA et anti-OspB sont responsables de l'élimination des spirochètes et qu'ils réduisent la transmission de ce pathogène par les tiques. Dans nos expériences, l'IL-4 produite par les souris BALB/c et C3H suite aux infestations par les nymphes d'*I. ricinus* semble empêcher la production des anticorps IgG2a anti-OspB. Cette cytokine contribuerait ainsi à une meilleure transmission de *B. burgdorferi*.

En tenant compte de tous les immunogènes, nous remarquons que les souris BALB/c et C3H infestées par les nymphes infectées produisent beaucoup moins d'anticorps IgG2a spécifiques aux borréliés que les mêmes souris recevant les borréliés par injection. C'est l'IL-4 produite suite aux infestations par les nymphes qui est à l'origine de cette diminution. Des souris BALB/c déficientes en IL-4 infestées par les nymphes infectées produisent autant d'IgG2a spécifiques aux borréliés que les mêmes souris injectées par *B. burgdorferi*.

Schaible *et al.*, (1991) montrent qu'il n'existe aucune corrélation entre le profil d'anticorps anti-borréliés et la susceptibilité à développer des arthrites. Par contre, une corrélation est montrée avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Les souris avec un haplotype H-2d développent une protection contre *B. burgdorferi*, tandis que celles avec les haplotypes H-2k, b, j, r et s montrent des arthrites sévères.

5. Résumé et conclusion

Les souris infestées par les larves ou les nymphes d'*I. ricinus* ne développent pas de résistance. Cette susceptibilité semble être associée avec le développement d'une réponse Th2. En effet, les cellules ganglionnaires de ces souris, mises en culture et stimulées *in vitro* avec de la ConA, produisent des quantités importantes d'IL-4 et peu d'IFN- γ . De plus, les souris produisent des quantités croissantes d'IgE totales au cours des infestations. Différents traitements, injection d'anticorps monoclonaux anti-IL-4 ou injection d'IL-12 recombinante, n'ont pas permis le shift de la réponse vers les Th1. La présence des spirochètes dans les nymphes ne perturbe pas la biologie de celles-ci. Par contre, la réponse immunologique développée contre les nymphes influence celle mise en place envers les bactéries.

De nombreux pathogènes sont transmis par l'intermédiaire d'un vecteur arthropode hématophage tels que les moustiques, les mouches tsé-tsé, les phlébotomes ou les tiques. C'est le cas des plasmodiums, des filaires, des trypanosomes africains, des leishmanies et des borréliés. Le vecteur semble favoriser la transmission des pathogènes. Ainsi, un mélange de glandes salivaires de phlébotomes et de *L. major* injecté à des souris provoque des lésions plus importantes et contenant plus de parasites qu'une injection de *L. major* seules (Titus & Ribeiro, 1990; Samuelson *et al.* 1991). Un extrait de glandes salivaires de moustiques *Aedes aegyptii* inhibe la production du TNF- α par les mastocytes. L'absence de cette cytokine peut faciliter la prise du repas sanguin mais également augmenter l'infectivité des pathogènes (Bissonnette *et al.* 1993). Les tiques vectrices, *R. appendiculatus* et *A. variegatum*, du Thogotto virus, sécrètent un facteur salivaire qui potentialise la transmission de ce virus (Jones *et al.* 1992).

Mais il ne faut pas oublier que le vecteur essaye en tout premier lieu d'obtenir un repas sanguin optimal et que le pathogène peut secondairement profiter des mécanismes mis en place par le vecteur.

6. Bibliographie

A

Aeschlimann, A. (1972). *Ixodes ricinus*, Linné 1758 (Ixodoidea, Ixodidae). Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. *Acta Tropica* **29**, 321-340.

Aeschlimann, A. (1991). Ticks and disease: susceptible hosts, reservoir hosts, and vectors. In: *Parasite-Host Association*. Eds. C.A. Toft, Aeschlimann A. et Bolis L., Oxford Science Publications, Oxford, pp.148-156.

Aeschlimann, A., Brossard, M., Haug, T. & Rutti, B. (1990). A survey of tick vaccines. *Anim. Res. Dev.* **32**, 52-72.

Aeschlimann, A., Burgdorfer, W., Matile, H., Peter, O. & Wyler, R. (1979). Aspects nouveaux du rôle de vecteur joué par *Ixodes ricinus* L. en Suisse. *Acta Tropica* **36**, 181-191.

Allen, J.R. (1989). Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. *Exp. Appl. Acarol.* **7**, 5-13.

Allen, J.R. & Kemp, D.H. (1982). Observations on the behaviour of *Dermacentor andersoni* larvae infesting normal and tick resistant guinea-pigs. *Parasitology* **84**, 195-204.

Allen, P.M. & Unanue, E.R. (1987). Antigen processing and presentation at a molecular level. *Adv. Exp. Med. Biol.* **54**, 166-211.

Allen, J.R., Khalil, H.M. & Graham, J.E. (1979). The location of tick salivary antigens, complement and immunoglobulin in the skin of guinea-pigs infested with *Dermacentor andersoni* larvae. *Immunology* **38**, 467-472.

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

B

Bach, M.K. (1997). Mediators of anaphylaxis and inflammation. *Annu. Rev. Microbiol.* **36**, 371-413.

Bagnall, B.G. (1975). Cutaneous immunity to the tick *Ixodes holocyclus*. Ph. D. Thesis, University of Sydney.

Balashov, Y.S. (1972). A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea) - Vectors of diseases of man and animals. *Misc. Publ. Entomol. Soc. America* **8**, 167-376.

Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Hayes, S.F., Péter, O. & Aeschlimann, A. (1983). Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Curr. Microbiol.* **8**, 123-126.

Belosevic, M., Finbloom, D.S., Van Der Meide, P.H., Slayter, M.V. & Nacy, C.A. (1989). Administration of monoclonal anti-IFN- γ antibodies *in vivo* abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J. Immunol.* **143**, 266-274.

Betz, M. & Fox, B.S. (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J. Immunol.* **146**, 108-113.

Binnington, K.C. & Kemp, D.H. (1980). Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission. *Adv. Parasitol.* **18**, 315-339.

Bissonnette, E.Y., Rossignol, P.A. & Befus, A.D. (1993). Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumor necrosis factor alpha release from mast cells. *Parasite Immunol.* **15**, 27-33.

Bowessidjaou, J., Brossard, M. & Aeschlimann, A. (1977). Effects and duration of resistance acquired by rabbits on feeding and egg laying in *Ixodes ricinus* L. *Experientia* **33**, 528-530.

Bowman, A.S., Dillwith, J.W. & Sauer, J.R. (1996). Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. *Parasitol. Today* **12**, 388-396.

Brossard, M. (1977). Rabbits infested with the adults of *Ixodes ricinus* L.: Passive transfer of resistance with immune serum. *Bull. Soc. Path. Exot.* **70**, 289-294.

Brossard, M. & Aeschlimann, A. (1976). Preliminary studies of *Coxiella burnetii* in Switzerland. Isolation of a strain. Transmission by *Ixodes ricinus*. In: *Proceedings of the Second International Colloquium on Natural Foci of Infectious Diseases in Central Europe*, Graz, pp. 305-312.

Brossard, M. & Fivaz, V. (1982). *Ixodes ricinus* L.: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or reinfested rabbits. *Parasitology* **85**, 583-592.

Brossard, M., Rutti, B. & Haug, T. (1991). Immunological relationship between hosts and Ixodid ticks. In: *Parasite-Host Association*. Eds. C.A. Toft, Aeschlimann A. et Bolis L., Oxford Science Publications, Oxford, pp.177-200.

Brown, S.J. (1982). Antibody-and cell-mediated immune resistance by guinea pigs to adult *Amblyomma americanum* ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**, 1285-1290.

Brown, S.J. (1985). Immunology of acquired resistance to ticks. *Parasitol. Today* **1**, 165-171.

Brown, S.J. & Askenase, P.W. (1981). Cutaneous basophil responses and immune resistance of guinea pigs to ticks: passive transfer with peritoneal exudate cells or serum. *J. Immunol.* **127**, 2164-2167.

Brown, S.J., Worms, M.J. & Askenase, P.W. (1983). *Rhipicephalus appendiculatus*: larval feeding sites in guinea pigs actively sensitized and receiving immune serum. *Exp. Parasitol.* **55**, 111-120.

Brown, M.A., Pierce, J.H., Watson, C.J., Falco, J., Ihle, J.N. & Paul, W.E. (1987). B cell stimulatory factor-1/Interleukin-4 mRNA is expressed by normal and transformed mast cells. *Cell* **50**, 809-818.

Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Peter, O. & Aeschlimann, A. (1983). Erythema chronicum migrans-a tickborne spirochetosis. *Acta Tropica* **40**, 79-83.

Burstein, H.J., Shea, C.M. & Abbas, A.K. (1992). Aqueous antigens induce *in vitro* tolerance selectively in IL-2 and IFN- γ producing (Th1) cells. *J. Immunol.* **148**, 3687-3690.

C

Corradin, G., Etlinger, H.M. & Chiller, J.M. (1977). Lymphocyte specificity to protein antigens. I. Characterization of antigen-induced *in vitro* T cell-dependent proliferative response with lymph node cells from primed mice. *J. Immunol.* **119**, 1048-1053.

D

DenHollander, N. & Allen, J.R. (1985a). *Dermacentor variabilis*: resistance to ticks acquired by mast cell-deficient and other strains of mice. *Exp. Parasitol.* **59**, 169-179.

DenHollander, N. & Allen, J.R. (1985b). *Dermacentor variabilis*: acquired resistance to ticks in BALB/c mice. *Exp. Parasitol.* **59**, 118-129.

Dizij, A., Arndt, S., Seitz, H.M. & Kurtenbach, K. (1994). *Clethrionomys glareolus* acquires resistance to *Ixodes ricinus*: a mechanism to prevent spirochete inoculation? In: *Advances in Lyme borreliosis research. Proceedings of the VI International Conference on Lyme Borreliosis, Bologna, Italy*. Eds R. Cevenini, V. Sambri, and M. LaPlaca. pp. 228-231.

Dizij, A. & Kurtenbach, K. (1995). *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquired resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. *Parasite Immunol.* **17**, 177-183.

Doherty, T.M. & Coffman, R.L. (1996). *Leishmania major*: Effect of infectious dose on T cell subset development in BALB/c mice. *Exp. Parasitol.* **84**, 124-135.

Dusbabek, F., Borsky, I., Jelinek, F. & Uhlir, J. (1995). Immunosuppression and feeding success of *Ixodes ricinus* nymphs on BALB/c mice. *Med. Vet. Entomol.* **9**, 133-140.

E

Elghazali, G., Perlmann, H., Rutta, A.S.M., Perlmann, P. & Troye-Blomberg, M. (1997). Elevated plasma levels of IgE in *Plasmodium falciparum*-primed individuals reflect an increased ratio of IL-4 to interferon-gamma (IFN-gamma)-producing cells. *Clin. Exp. Immunol.* **109**, 84-89.

F

Fiorentino, D.F., Bond, M.W. & Mosmann, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* **170**, 2081-2095.

Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W. & O'Garra, A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* **146**, 3444-3451.

Fivaz, B.H. (1990). Immunological responses of the rabbit host to infestation by the brown ear-tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina: Ixodidae). *Exp. & Applied Acarol.* **9**, 219-238.

Freeman, G.J., Boussiotis, V.A., Anumanthan, A., Bernstein, G.M., Ke, X.Y., Rennert, P.D., Gray, G.S., Gribben, J.G. & Nadler, L.M. (1995). B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* **2**, 523-532.

G

Gajewski, T.F., Joyce, J. & Fitch, F.W. (1989). Antiproliferative effect on IFN- γ in immune regulation. III. Differential selection of Th1 and Th2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN- γ . *J. Immunol.* **143**, 15-22.

Gajewski, T.F., Pinnas, M., Wong, T. & Fitch, F.W. (1991). Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J. Immunol.* **146**, 1750-1758.

Ganapamo, F., Rutti, B. & Brossard, M. (1995). *In vitro* production of interleukin-4 and interferon- γ by lymph node cells from BALB/c mice infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Immunology* **85**, 120-124.

Ganapamo, F., Rutti, B. & Brossard, M. (1996). Immunosuppression and cytokine production in mice infested with *Ixodes ricinus* ticks: a possible role of laminin and interleukin-10 on the *in vitro* responsiveness of lymphocytes to mitogens. *Immunology* **87**, 259-263.

Ganapamo, F., Rutti, B. & Brossard, M. (1997). Identification of an *Ixodes ricinus* salivary gland fraction through its ability to stimulate CD4 T cell present in BALB/c mice lymph node draining the tick fixation site. *Parasitology* **115**, 91-96.

Gern, L. & Brossard, M. (1986). Evolution annuelle de l'infestation de bovins par la tique *Ixodes ricinus* L. et de l'infection de ces ectoparasites par *Babesia divergens* dans le Clos du Doubs (Jura, Suisse). *Schweiz. Arch. Tierheilk.* **128**, 361-363.

Gern, L., Schaible, U.E. & Simon, M.M. (1993). Mode of inoculation of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* influences infection and immune responses in inbred strains of mice. *J. Infectious Disease* **167**, 971-975.

Geppert, T.D. & Lipsky, P.E. (1985). Antigen presentation by interferon- γ -treated endothelial cells and fibroblasts: differential ability to function as antigen-presenting cells despite comparable Ia expression. *J. Immunol.* **135**, 3750-3762.

Girardin, P. & Brossard, M. (1985). Développement d'une hypersensibilité retardée chez des lapins infestés par les femelles d'*Ixodes ricinus* L. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **60**, 299-309.

Girardin, P. & Brossard, M. (1989). Effects of cyclosporin-A on humoral immunity to ticks, and on cutaneous immediate (type I) and delayed (type IV) hypersensitivity reactions to *Ixodes ricinus*, L. salivary gland antigens in re-infested rabbits. *Parasitol. Res.* **75**, 657-662.

Girardin, P. & Brossard, M. (1990). Rabbits infested with *Ixodes ricinus* L. adults: Effects of treatment with cyclosporin A on the biology of ticks fed on naive and immune hosts. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **65**, 262-266.

Graf, J.-F. (1978). Copulation, nutrition et ponte chez *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea: Ixodidae) - Ie partie. *Bull. Soc. Ent. Suisse* **51**, 89-97.

Güler, M.L., Gorham, J.D., Hsieh, C.S., Mackey, A.J., Steen, R.G., Dietrich, W.F. & Murphy, K.M. (1996). Genetic susceptibility to *Leishmania*: IL-12 responsiveness in T_H1 cell development. *Science* **271**, 984-987.

H

Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Coffman, R.L. & Locksley, R.M. (1989). Reciprocal expression of interferon- γ or interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. *J. Exp. Med.* **169**, 59-72.

Heinzel, F.P., Schoenhaut, D.S., Rerko, R.M., Rosser, L.E. & Gately, M.K. (1993). Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **177**, 1505-1509.

Hsieh, C.S., Heimberger, A.B., Gold, J.S., O'Garra, A., Murphy, K.M. (1992). Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell- receptor transgenic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 6065-6069.

Higashi, N., Yoshizuka, N., Ohuchi, A., Osawa, T. & Kobayashi, Y. (1995). Involvement of inflammatory cytokines in a delayed-type hypersensitivity reaction. *Cell. Immunol.* **161**, 288-294.

I

Issekutz, T.B., Stoltz, J.M. & Van Der Meide, P.H. (1988). Lymphocyte recruitment in delayed-type hypersensitivity. The role of IFN- γ . *J. Immunol.* **140**, 2989-2993.

J

Jones, L.D., Kaufman, W.R. & Nuttall, P.A. (1992). Modification of the skin feeding site by tick saliva mediates virus transmission. *Experientia* **48**, 779-782.

K

Kalinski, P., Hilkens, C.M.U., Snijders, A., Snijdewint, F.G.M. & Kapsenberg, M.L. (1997). IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E₂, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J. Immunol.* **159**, 28-35.

Katamura, K., Shintaku, N., Yamauchi, Y., Fukui, T., Ohshima, Y., Mayumi, M. & Furusho, K. (1995). Prostaglandin E₂ at priming of naive CD4⁺ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN- γ and IL-2, but not IL-4 and IL-5. *J. Immunol.* **155**, 4604-4612.

Keane-Myers, A. & Nickell, S.P. (1995). Role of IL-4 and IFN- γ in modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. *J. Immunol.* **155**, 2020-2028.

Kopf, M., Brombacher, F., Köhler, G., Kienzle, G., Widmann, K.-H., Lefrang, K., Humborg, C., Ledermann, B. & Solbach, W. (1996). IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **184**, 1127-1136.

Kubes, M., Fuchsberger, N., Labuda, M., Zuffova, E. & Nuttal, P.A. (1994). Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity *in vitro*. *Immunology* **82**, 113-116.

Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N. & Glimcher, L.H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: Application to autoimmune disease therapy. *Cell* **80**, 707-718.

L

Launois, P., Ohteki, T., MacDonald, H.R., & Louis, J.A. (1995). In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4⁺ T cells which are NK1.1⁻. *Eur. J. Immunol.* **25**, 3298-3307.

Launois, P., Swihart, K.G., Milon, G. & Louis, J.A. (1997). Early production of IL-4 in susceptible mice infected with *Leishmania major* rapidly induces IL-12 unresponsiveness. *J. Immunol.* **158**, 3317-3324.

Liz, J. & Pfister, K. (1989). Enquête sur l'Ehrlichiose bovine (fièvre de pâture) en Suisse. *Revue suisse de médecine vétérinaire* **6**, 7-8.

M

- Macatonia, S.E., Doherty, T.M., Knight, S.C., O'Garra, A.** (1993). Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN- γ production. *J. Immunol.* **150**, 3755-3765.
- Mandler, R., Finkelman, F.D., Levine, A.D. & Snapper, C.M.** (1993). IL-4 induction of IgE class switching by lipopolysaccharide-activated murine B cells occurs predominantly through sequential switching. *J. Immunol.* **150**, 407-418.
- Mantovani, A. & Dejana, E.** (1989). Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol. Today* **10**, 370-375.
- Matsuda, H., Fukui, K., Kiso, Y. & Kitamura, Y.** (1985). Inability of genetically mast cell-deficient W/W^v mice to acquire resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks (Ixodoidea: Ixodidae). *J. Parasitol.* **71**, 443-448.
- Matsuda, H., Watanabe, N., Kiso, Y., Hirota, S., Ushio, H., Kannan, Y., Azuma, M., Koyama, H. & Kitamura, Y.** (1990). Necessity of IgE antibodies and mast cells for manifestation of resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks in mice. *J. Immunol.* **144**, 259-262.
- Mbow, M.L., Christe, M., Rutti, B. & Brossard, M.** (1994a). Absence of acquired resistance to nymphal *Ixodes ricinus* ticks in BALB/c mice developing cutaneous reactions. *J. Parasitol.* **80**, 81-87.
- Mbow, M.L., Rutti, B. & Brossard, M.** (1994b). Infiltration of CD4⁺, CD8⁺ T cells, and expression of ICAM-1, Ia antigens, IL-1 alpha and TNF-alpha in the skin lesion of BALB/c mice undergoing repeated infestations with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Immunology* **82**, 596-602.
- Mbow, M.L., Rutti, B. & Brossard, M.** (1994c). IFN- γ , IL-2, and IL-4 mRNA expression in the skin and draining lymph nodes of BALB/c mice repeatedly infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Cell. Immunol.* **156**, 254-261.
- McLaren, D.J., Worms, M.T. & Askenase, P.W.** (1983). Cutaneous basophil associated resistance to ectoparasites (ticks). Electron microscopy of *Rhipicephalus appendiculatus* larval feeding sites in actively sensitized guinea pigs and recipients of immune serum. *J. Pathol.* **139**, 291-308.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. & Coffman, R.L.** (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokines activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 2348-2357.

N

Nabors, G.S. & Farrell, J.P. (1994). Depletion of interleukin-4 in BALB/c mice with established *Leishmania major* infections increases the efficacy of antimony therapy and promotes Th1-like responses. *Infect. Immun.* **62**, 5498-5504.

Nabors, G.S., Nolan, T., Croop, W., Li, J. & Farrell, J.P. (1995). The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/cxC57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. *Parasite Immunol.* **17**, 569-579.

Noelle, R. & Snow, E.C. (1992). T helper cells. *Curr. Opin. Immunol.* **4**, 333-337.

O

O'Garra, A. & Murphy, K. (1994). Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 458-466.

P

Papatheodorou, V. & Brossard, M. (1987). C3 levels in sera of rabbits infested and reinfested with *Ixodes ricinus* L. and in midgut of fed ticks. *Exp. & Applied Acarol.* **3**, 53-59.

Paul, W.E. & Ohara, J. (1987). B-cell stimulatory factor-1/interleukin 4. *Annu. Rev. Immunol.* **5**, 145-173.

Poynter, M.E., Mu, H.-H., Chen, X.-P., Daynes, R.A. (1997). Activation of NK1.1⁺ T cells *in vitro* and their possible role in age-associated changes in inducible IL-4 production. *Cell. Immunol.* **179**, 22-29.

R

Ramachandra, R.N. & Wikel, S.K. (1992). Modulation of host-immune responses by ticks (acari: ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *J. Med. Entomol.* **29**, 818-826.

Randolph, S.E. (1979). Population regulation in ticks: The role of acquired resistance in natural and unnatural hosts. *Parasitology* **79**, 141-156.

Ribeiro, J.M.C. (1987a). Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* **32**, 463-478.

- Ribeiro, J.M.C. (1987b). *Ixodes dammini*: Salivary anti-complement activity. *Exp. Parasitol.* **64**, 347-353.
- Ribeiro, J.M.C. (1989). Role of saliva in tick/host interactions. *Exp. & Applied Acarol.* **7**, 15-20.
- Ribeiro, J.M.C. & Spielman, A. (1986). *Ixodes dammini*: Salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Exp. Parasitol.* **62**, 292-297.
- Ribeiro, J.M.C., Evans, P.M., MacSwain, J.L. & Sauer, J. (1992). *Amblyomma americanum*: Characterization of salivary prostaglandins E₂ and F_{2α} by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Exp. Parasitol.* **74**, 112-116.
- Ribeiro, J.M.C., Makoul, G.T., Levine, J., Robinson, D.R. & Spielman, A. (1985). Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J. Exp. Med.* **161**, 332-344.
- Roberts, J.A. & Kerr, J.D. (1976). *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. *J. Parasitol.* **62**, 485-488.
- Romani, L., Puccetti, P. & Bistoni, F. (1997). Interleukin-12 in infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 611-636.

S

- Samuelson, J., Lerner, E., Tesh, R. & Titus, R. (1991). A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J. Exp. Med.* **173**, 49-54.
- Schaible, U.E., Kramer, M.D., Wallich, R., Tran, T., Simon, M.M. (1991). Experimental *Borrelia burgdorferi* infection in inbred mouse strains: antibody response and association of H-2 genes with resistance and susceptibility to development of arthritis. *Eur. J. Immunol.* **21**, 2397-2405.
- Schaible, U.E., Gern, L., Kramer, M.D., Prester, M. & Simon, M.M. (1993). Distinct patterns of protective antibodies are generated against *Borrelia burgdorferi* in mice experimentally inoculated with high and low doses of antigen. *Immunol. Letters* **36**, 219-226.
- Schorderet, S. & Brossard, M. (1994). Effects of human recombinant interleukin-2 on resistance, and on the humoral and cellular response of rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* ticks. *Vet. Parasitol.* **54**, 375-387.
- Seder, R.A., Paul, W.E., Davis, M.M., Fazekas, D.S., Groth, B. (1992). The presence of interleukin 4 during *in vitro* priming determines the lymphokine-producing potential of CD4⁺ T cells from T receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.* **176**, 1091-1098.

Sinsky, R.J. & Piesman, J. (1989). Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1723-1727.

Snapper, C.M. & Paul, W.E. (1987). Interferon- γ and B-cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* **236**, 944-947.

Springell, P.H. (1983). The cattle tick in relation to animal production in Australia. In: *Selected articles from the world animal review*, pp. 1-5.

Steelman, C.D. (1976). Effects of external and internal arthropod parasites on domestic livestock production. *Annu. Rev. Entomol.* **21**, 155-178.

Swain, S.L. (1991). Regulation of the development of distinct subsets of CD4+ T cells. *Res. Immunol.* **142**, 14-18.

Swain, S.L., Bradley, L.M., Croft, M., Tonkonogy, S., Atkins, G., Weinberg, A.D., Duncan, D.D., Hedrick, S.M., Dutton, R.W., Huston, G. (1991). Helper T-cell subsets: phenotype, function and role of lymphokines in regulating their development. *Immunol. Rev.* **123**, 115-144.

T

Thomson, A.W., Smith, S.W.G. & Chappel, L.H. (1986). Cyclosporin A: immune suppressant and antiparasitic agent. *Parasitol. Today* **2**, 288-290.

Titus, R.G. & Ribeiro, J.M.C. (1990). The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitol. Today* **6**, 157-160.

Trager, W. (1939). Acquired immunity to ticks. *J. Parasitol.* **25**, 57-81.

Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 251-276.

W

Ward, P.A., Dvorak, H.F., Cohen, S., Yoshida, T., Data, R. & Selvaggio, S.S. (1975). Chemotaxis of basophils by lymphocyte-dependent and lymphocyte-independent mechanisms. *J. Immunol.* **114**, 1523-1531.

Wikel, S.K. (1982). Immune responses to arthropods and their products. *Annu. Rev. Entomol.* **27**, 21-48.

Wikel, S.K. (1984). Immunomodulation of host responses to ectoparasite infestation-an overview. *Vet. Parasitol.* **14**, 321-339.

Wikel, S.K. & Allen, J.R. (1976a). Acquired resistance to ticks. II. Effects of cyclophosphamide on resistance. *Immunology* **30**, 479-484.

Wikel, S.K. & Allen, J.R. (1976b). Acquired resistance to ticks. I. Passive transfer of resistance. *Immunology* **30**, 311-316.

Wikel, S.K. & Allen, J.R. (1977). Acquired resistance to ticks. III. Cobra venom factor and the resistance response. *Immunology* **32**, 457-465.

Wikel, S.K. & Allen, J.R. (1982). Immunological basis of host resistance to ticks. In *Physiology of ticks*. Eds Obenchain, F.D. and Galun, R.L., Pergamon, Oxford, pp. 169-196.

Wikel, S.K. & Whelen, A.C. (1986). Ixodid-host immune interaction: Identification and characterization of relevant antigens and tick-induced host immunosuppression. *Vet. Parasitol.* **20**, 149-174.

Wikel, S.K. & Bergman, D. (1997). Tick-host immunology: significant advances and challenging opportunities. *Parasitol. Today* **13**, 383-389.

Wikel, S.K., Ramachandra, R.N., Bergman, D.K., Burkot, T.R. & Piesman, J. (1997). Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes ricinus* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. *Infect. Immunity* **65**, 335-338.

Z

Zeidner, N., Mbow, M.L., Dolan, M., Massung, R., Baca, E. & Piesman, J. (1997). Effects of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi* on modulation of the host immune response: Induction of a TH2 cytokine response in Lyme disease-susceptible (C3H/HeJ) mice but not in disease-resistant (BALB/c) mice. *Infect. Immunity* **65**, 3100-3106.