

# THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

## Résumé

---

**Orientation :** Médecine vétérinaire

**Titre de la thèse en français :** Identification d'une nouvelle famille de protéines inhibitrices du complément exprimées par les tiques *Ixodes* appartenant au complexe *Ixodes ricinus*

**Titre de la thèse en anglais :** Identification of a new family of anti-complement proteins encoded by *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex

**Candidat :** Virginie Daix

**Promoteur :** Docteur A. Vanderplasschen

**Département et Service :** Département des Maladies infectieuses et parasitaires, Service d'Immunologie - Vaccinologie

**Date de la défense publique :** le 21 septembre 2005

**Composition du Jury :** Membres extérieurs à la Faculté :

Professeur J.-C. Renauld, UCL, Belgique ; Professeur J. Vercruyse, Université de Gand, Belgique

Membres internes à la faculté de Médecine vétérinaire :

Professeur P. Gustin ; Professeur B. Losson ; Professeur P.-P. Pastoret ;

Docteur F. Bureau ; Docteur D. Desmecht ; Docteur L. Grobet ; Docteur B. Mignon ;

Docteur A. Vanderplasschen

### DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Les tiques sont des ectoparasites hématophages qui infestent un grand nombre d'organismes vertébrés. Au cours de leur repas sanguin, les tiques peuvent transmettre un nombre important de pathogènes tel que *Borrelia burgdorferi*, agent étiologique de la maladie de Lyme. Le contrôle de ces parasites est donc primordial. Durant toute la durée du repas sanguin, qui peut durer plusieurs jours, le rostre de la tique reste implanté dans l'épiderme et le derme de l'hôte sans qu'une réaction inflammatoire importante ne se développe au site de morsure. Cette absence de réaction de rejet efficace est le résultat de l'expression de facteurs immunomodulateurs sécrétés par

les glandes salivaires de la tique et injectés au site de morsure.

L'inhibition du système du complément de l'hôte par les protéines salivaires des tiques joue un rôle déterminant dans la tripartite hôte-tique-pathogène (Lawrie, *et al.*, 1999 ; Wikel and Allen, 1977 ; Wikel, 1979). En effet, cette inhibition contribue non seulement à éviter le rejet de la tique par l'hôte, mais favorise également la transmission des pathogènes véhiculés par le parasite en les protégeant d'une composante importante de la réponse immunitaire innée de l'hôte.

Récemment, une étude réalisée sur la tique américaine *Ixodes scapularis* a mené au clonage d'une nouvelle protéine salivaire inhibitrice de la voie alternative du complément

(Valenzuela *et al.*, 2000). Cette protéine fut appelée Isac pour « *Ixodes scapularis* anti-complément ». Cette découverte est fascinante à la fois d'un point de vue fondamental et d'un point de vue appliqué. D'un point de vue fondamental, l'absence d'homologie entre la protéine Isac et les protéines régulatrices du complément connues à ce jour suggère fortement que la protéine Isac représente le fruit d'un processus d'évolution convergente. Pour la recherche appliquée, la protéine Isac représente un excellent candidat antigène pour le développement d'un vaccin anti-tique potentiellement capable d'induire le rejet précoce de la tique par l'hôte et/ou d'inhiber la transmission des pathogènes véhiculés par celle-ci.

L'objectif initial de ce travail était d'identifier l'orthologue de la protéine Isac de la tique américaine *Ixodes scapularis* chez la tique européenne *Ixodes ricinus*, et de développer un système d'expression permettant à l'issue de cette thèse d'entreprendre l'étude des propriétés de cet orthologue comme antigène d'un vaccin anti-tique. Les recherches poursuivies nous ont amené à découvrir une nouvelle famille de protéines inhibitrices du complément exprimée dans la salive de tiques *Ixodes* appartenant au complexe *Ixodes ricinus* (Etude 1). Divers systèmes d'expression ont ensuite été développés pour les deux membres de cette famille découverts chez la tique *Ixodes ricinus* (Etude 2 et 3). Ces systèmes d'expression permettront à l'avenir de poursuivre des recherches fondamentales sur ces protéines et d'investiguer leurs qualités en temps qu'antigène vaccinal pour le développement d'un vaccin anti-tique.

## RÉSULTATS

La première partie de ce travail consistait à isoler les homologues de la séquence Isac chez la tique européenne *Ixodes ricinus* par une approche RT-PCR. Nous avons isolé deux séquences originales différentes de l'Isac à partir du transcriptome des glandes salivaires d'*Ixodes ricinus*. L'expression de ces cDNAs a révélé qu'ils codent tous deux pour des homologues fonctionnels de l'Isac. Ils ont été dénommés IRAC I et IRAC II pour *I. ricinus* anti-complément protéin I and II. En effet, les tests d'activité effectués ont révélé la capacité des deux protéines à inhiber la voie alterne du complément. Celles-ci présentaient cependant des courbes effet/doses différentes, la protéine IRAC II semblant être plus efficace qu'IRAC I dans

les conditions utilisées. Mieux, un effet synergique a été observé lorsque ces deux protéines étaient introduites ensemble dans les tests d'activité. Des analyses plus poussées ont permis de déterminer certains des sites d'action des protéines au sein de la voie alterne du complément. Ainsi, ces deux protéines agissent au niveau des premiers facteurs C3 et B de la voie alterne du complément. Une caractérisation plus poussée des IRACs à l'aide d'anticorps monoclonaux a permis de révéler que ces deux protéines sont exprimées de façon constitutive au sein des glandes salivaires de la tique *Ixodes ricinus* et sont surexprimées durant le repas sanguin.

Ensuite, l'étude des relations phylogéniques existant entre les différents membres de cette famille potentielle a été entreprise. En effet, confortant notre hypothèse d'appartenance des IRACs à une famille génique, d'autres séquences homologues ont été rapportées par d'autres groupes suite à la découverte des IRACs. Préalablement à l'étude phylogénique, la vérification du caractère génique et non allélique des IRACs s'imposait. Des analyses par immunomarquage ont fourni la preuve que ces protéines IRAC I et IRAC II sont bien codées par des gènes distincts et non par des allèles d'un même locus. Par la suite, les analyses phylogéniques ont permis d'étudier les relations existant entre les différentes séquences codant pour les protéines homologues des IRACs isolées des tiques appartenant au complexe *Ixodes ricinus* (*Xu et al.*, 2003) encodent une famille encore non décrite de molécules anti-complément qui se sont diversifiées au cours de l'évolution par sélection positive.

Les résultats obtenus au cours de la

première étude soulignent l'importance du système du complément dans la relation hôte-tique. L'étude des propriétés biologiques des IRACs, mais également l'étude de leur potentiel vaccinal nécessitent cependant l'utilisation de techniques de production protéique plus performantes que celles utilisées dans la première étude. En effet, les faibles quantités protéiques obtenues par transfection transitoire en culture de cellules mammifères ne permettaient pas la poursuite de nos recherches. Le développement de systèmes d'expression plus performants fut le second objectif de cette thèse (Etudes 2 et 3). Deux systèmes d'expression complémentaires ont été développés. Ils permettront la poursuite de l'étude des protéines IRACs dans le laboratoire d'accueil.

La seconde étude consistait en l'expression des protéines IRAC I et IRAC II par le vecteur viral BoHV-4, un gammaherpèsvirus du genre *rhadinovirus*, cloné en système BAC. Le large spectre d'hôtes et le faible pouvoir pathogène de ce virus en font un vecteur vaccinal potentiel. Cette étude avait deux buts : d'une part l'utilisation de l'herpèsvirus bovin 4 en tant que vecteur d'expression de protéines IRACs fonctionnelles, d'autre part, l'utilisation de l'herpèsvirus bovin 4 en tant que vecteur vaccinal. Afin de déterminer le potentiel de ce virus en tant que vecteur d'expression, les protéines IRAC I et II ont été clonées au sein de séquences non codantes du génome viral et l'activité inhibitrice du complément des produits d'expression a été réévaluée et comparée à l'activité des produits d'expression obtenus en transfection transitoire. L'activité inhibitrice du complément des produits d'expression virale était conservée. Les molécules IRACs issues de l'infection possèdent en effet

une activité au moins comparable et même meilleure au sein de la lignée cellulaire MDBK. Par la suite, ces vecteurs viraux ont été inoculés à des lapins, modèle animal de l'infection au BoHV4, afin d'évaluer leur potentiel vaccinal. Cependant, aucune réponse humorale à l'encontre des protéines ne pu être décelée.

La troisième étude consistait à développer un système d'expression protéique permettant de poursuivre l'étude du potentiel vaccinal de ces protéines. Les IRACs ont ainsi été exprimés en système bactérien. Les protéines produites ont été purifiées et injectées à des souris Balb/c. Des analyses d'immunofluorescence ont permis de prouver que le sérum récolté reconnaissait les protéines exprimées en lignée cellulaire et les protéines endogènes exprimées au sein des glandes salivaires. De plus, ces anticorps ont présenté un pouvoir neutralisant contre l'activité inhibitrice du complément des protéines IRACs.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats générés au cours de cette thèse pourraient avoir dans l'avenir des implications tant fondamentales qu'appliquées :

Tout d'abord, comme exposé lors de la première étude, les IRACs et leurs homologues séquentiels pourraient appartenir à une famille issue d'un processus d'évolution convergente. La famille génique identifiée au sein des tiques appartenant au complexe *Ixodes ricinus* compte au moins quatre membres. Cependant, depuis la découverte de trois nouvelles séquences homologues à l'Isac chez *Ixodes scapularis*, il semble que cette famille soit encore plus étendue. Il serait intéressant de tenter d'isoler tous les membres de

cette famille.

Deuxièmement, l'existence de cette famille de molécules à potentiel inhibiteur du complément au sein du sialome de plusieurs tiques du même genre souligne l'importance de l'implication de ces molécules dans le repas sanguin de la tique. Il a été démontré que les protéines IRAC I et II sont issues de gènes paralogues et non d'allèles. L'avantage sélectif conféré par l'existence de ces deux paralogues au sein des glandes salivaires de la tique *Ixodes ricinus* pourrait être expliqué d'une part par l'action synergique des deux molécules exercée sur la voie alterne du complément humain. Cette synergie n'étant pas observée aux sites d'action C3b et fB, il est probable qu'au moins une des deux protéines possède une activité supplémentaire au niveau de la voie alterne du complément. D'autre part, l'avantage sélectif conféré par ces deux molécules pourrait être expliqué par un élargissement du spectre d'hôte de la tique *Ixodes ricinus*. A cette fin, l'activité inhibitrice de chaque protéine IRAC I et II sera testée sur différentes espèces sources de complément appartenant et n'appartenant pas au spectre d'hôtes de la tique *Ixodes ricinus*, afin de déterminer leur implication dans l'adaptation de cette tique à l'hôte.

Enfin, d'un point de vue appliqué, cette première étude a permis de confirmer que l'étude du potentiel vaccinal de ces molécules inhibitrices du complément est primordiale. En effet, plusieurs arguments suggèrent que les IRACS pourraient être de bons antigènes pour le développement d'un vaccin anti-tique. Tout d'abord, l'implication de la voie alterne du complément dans des cas de résistances aux tiques a été prouvée (Wikel, 1979). De plus, les IRACS sont exprimés de

façon constitutive dans la salive des tiques non nourries, ce qui soulève leur importance au cours des premières étapes du repas sanguin. Elles font parties des premiers antigènes injectés au site de morsure. Ensuite, aucune homologie aux IRACs n'a été décrite à ce jour chez les organismes vertébrés. Enfin, des anticorps peuvent être produits à un titre convenable contre ces protéines. Le potentiel vaccinal des antigènes générés lors de la troisième étude sera testé tout d'abord dans le cadre d'une infestation de tique sur des souris et ensuite dans le cadre d'une transmission de borrelies à des souris par des tiques infectées. La capacité des IRACs à protéger les borrelies des effets délétères du complément de l'hôte sera également étudiée d'un point de vue moléculaire, dans la capacité des borrelies à fixer les IRACS via leurs récepteurs Osp E et CRAPS liant le facteur H de l'hôte (Hellwage *et al.*, 2001). Le potentiel thérapeutique des molécules IRACS pourrait également être investigué dans le cadre d'immunopathologies aigües causées ou aggravées par une activation incontrôlée du système du complément telles que les glomérulonéphrites à immuns complexes.

En conclusion, les recherches menées dans ce travail auront permis d'une part à démontrer l'existence d'une famille génique de protéines inhibitrices du complément chez les tiques *Ixodes* appartenant au complexe *Ixodes ricinus* et d'autre part de développer divers systèmes d'expression de ces protéines afin de permettre la poursuite de l'étude de leur propriétés tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué.

## REFERENCES

- HELLWAGE J., MERIT T., HEIKKILA T., ALITALO A., PANELIUS J., LAHDENNE P., SEPPALA I.J., MERI S. The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 8427-8435.
- LAWRIE C.H., RANDOLPH S.E., NUTTALL P.A. *Ixodes* ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. *Exp. Parasitol.*, 1999, **93**, 207-214.
- VALENZUELA J.G., CHARLAB R., MATHER T.N., RIBEIRO J.M. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem.*, 2000, **275**, 18717-18723.
- WIKEL S.K., ALLEN J.R. Acquired resistance to ticks. iii. Cobra venom factor and the resistance response. *Immunology*, 1977, **32**, 457-465.
- WIKEL S.K. Acquired resistance to ticks: expression of resistance by C4-deficient guinea pigs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1979, **28**, 586-590.
- XU G., FANG Q.Q., KEIRANS J.E., DURDEN L.A. Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. *J. Parasitol.*, 2003, **89**, 452-457.
- DAIX V., SCHROEDER H., PRAET N., GEORGIN J.-P., CHIAPPINO I., GILLET L., DE FAYS K., DECREM Y., LEBOULLE G., GODFROID E., BOLLEN A., PASTORET P.-P., GERN L., SHARP P. M. AND VANDERPLASSCHEN A. *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Mol. Biol.*, 2007, **16**, 155-166.
- DAIX V., CHIAPPINO I., PRAET N., LOSSON B., MAINIL J. G., THIRY E. , PASTORET P.-P., VANDERPLASSCHEN A. Les maladies transmises par les tiques. *Ann. Med. Vet.*, 2007, in preparation
- DAIX V., GODFROID E., PASTORET P. P., BOLLEN A., AND VANDERPLASSCHEN A. (2004). Anticomplement polypeptide from salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*. *Patent no. EP1399549*.
- DAIX V./GILLET L., DONOFRIOG, WAGNER M., KOSZINOWSKI U. H., CHINA B., ACKERMANN M., MARKINE-GORIAYNOFF N., VANDERPLASSCHEN A. Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *J. Gen. Virol.*, 2005, **86**, 907-917.

## Publications issues du travail de thèse

## Remerciements

Ce travail a été supporté par les subventions suivantes: "Recherche d'initiative du Ministère de la Région Wallonne" program n°14628; "Programme réseaux" convention Région Wallonne 315543, "Projet FRSC du FNRS" n° 1.4.015.04.F.