

RESUME

De nombreuses études suggèrent que l'inhibition de la voie alterne du complément de l'hôte est nécessaire aux parasites hématophages pour leur permettre d'accomplir leur repas sanguin. Une revue décrivant ces études a été publiée dans *Developmental and Comparative Immunology* par l'auteur du présent manuscrit (Schroeder *et al.*, (2009) *Dev. Comp. Immunol.* 33, 5-13). Plusieurs études suggèrent que l'inhibition de la voie alterne de l'hôte par les protéines salivaires de tiques est importante pour l'acquisition du repas sanguin et la transmission subséquente de pathogènes à l'hôte infesté. Confortant cette hypothèse, une protéine salivaire capable d'inhiber la voie alterne du complément a été clonée chez la tique américaine *Ixodes scapularis* (Valenzuela *et al.*, (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 18717-18723). Cette protéine, appelée Isac, ne présente aucune homologie avec les autres molécules anti-complément connues à ce jour, suggérant que cette protéine a été acquise au cours de l'évolution par un mécanisme d'évolution convergente. En plus de cet aspect fondamental, Isac représente un candidat antigénique prometteur pour le développement d'un vaccin anti-tique potentiellement capable d'induire le rejet de la tique et/ou de prévenir la transmission des pathogènes.

Le but initial de cette thèse était d'identifier le ou les homologue(s) de la protéine Isac de la tique américaine *Ixodes scapularis* chez la tique européenne *Ixodes ricinus*. De façon intéressante, deux séquences différentes ont été isolées du transcriptome des glandes salivaires de la tique *I. ricinus*. L'expression de ces séquences a révélé qu'elles codent pour des protéines secrétées capables d'inhiber la voie alterne du complément. Ces protéines ont été appelées IRAC I et II pour « *Ixodes ricinus* anti-complément protein I and II ». La caractérisation 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 au cours du repas sanguin. L'étude de l'expression des protéines IRAC I et IRAC II au sein de la population d'*Ixodes ricinus* a révélé que ces deux protéines sont des paralogues codés par des gènes différents et non par des allèles d'un même locus. Enfin, des analyses phylogéniques portant sur les différentes séquences codant pour les protéines homologues à Isac isolées chez les tiques *Ixodes scapularis*, *Ixodes ricinus* et *Ixodes pacificus* ont révélé que les tiques appartenant au complexe *Ixodes ricinus* codent pour une famille encore non décrite de molécules anti-complément qui se sont diversifiées au cours de l'évolution par un processus de sélection darwinienne positive. Hélène Schroeder est le second auteur de la publication présentant les données susmentionnées (Daix *et al.*, (2007) *Insect Mol. Biol.* 16 (2), 155-166).

Les analyses phylogéniques des IRACs suggèrent que ces séquences ont subi une diversification par un processus de pression de sélection darwinienne positive, menant

probablement à des molécules possédant des propriétés biologiques différentes. Dans la seconde étude, nous avons testé l'hypothèse de travail selon laquelle chaque paralogue pourrait posséder des activités inhibitrices différentes à l'encontre du complément de différentes espèces d'hôtes naturels, contribuant ainsi à élargir le spectre d'hôte des tiques *I. ricinus*. Les résultats obtenus démontrent que cette hypothèse est correcte (Schroeder *et al.*, (2007) *Microbes Infect.* 9 (2), 247-250).

Dans la troisième et dernière étude de ce manuscrit, nous avons testé le potentiel des protéines IRACs comme candidat antigénique pour le développement d'un vaccin anti-tique. Des recombinants de l'herpèsvirus bovin 4 (BoHV-4) exprimant IRAC I ou IRAC II ont été produits. De façon intéressante, nous avons observé que bien que les recombinants BoHV-4 expriment de hauts taux de protéines IRACs fonctionnelles *in vitro*, les lapins immunisés à l'aide des recombinants BoHV-4 exprimant les IRACs ne développent pas de réponse humorale détectable à l'encontre des transgènes. Dans le but d'augmenter l'immunogénicité des IRACs exprimés comme transgène, une seconde génération de recombinants BoHV-4 a été produite. Ceux-ci induisent l'expression des IRACs sous la forme de protéines de fusion transmembranaires à la surface des cellules infectées. L'inoculation de ces recombinants à des lapins a engendré le développement d'une forte réponse humorale à l'encontre des IRACs. Néanmoins, cette réponse immune n'a pas engendré d'effet majeur sur le repas sanguin de femelles *Ixodes ricinus* placées sur les lapins immunisés. Hélène Schroeder est le second auteur de la publication présentant ces données (Gillet *et al.*, (2008) In preparation).

SUMMARY

An increasing number of studies demonstrate that inhibition of host complement activation is crucial for completion of the blood feeding process of hematophagous parasites. A review of these studies has been published in *Developmental and Comparative Immunology* by the author of this manuscript (Schroeder *et al.*, (2009) *Dev. Comp. Immunol.* 33, 5-13). Several observations suggest that inhibition of the host complement alternative pathway by tick salivary proteins is crucial for the achievement of blood feeding and efficient transmission of the pathogens transmitted by the parasite. Strongly supporting this conclusion, a salivary protein able to inhibit the alternative pathway was cloned from the American tick *Ixodes scapularis* (Valenzuela *et al.*, (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 18717-18723). Interestingly, this molecule, termed Isac, has no similarity to any previously reported anti-complement molecules suggesting that it has been acquired through a mechanism of convergent evolution. In addition to this fundamental aspect, Isac is also a promising candidate antigen for the development of an anti-tick vaccine potentially able to induce the reject of the tick and/or to prevent the transmission of the pathogens.

The initial goal of the present work was to clone the orthologue of Isac from the European tick *Ixodes ricinus*. Interestingly, two different sequences were isolated from the transcriptome of *I. ricinus* salivary glands. Expression of these sequences revealed that they both encode secreted proteins able to inhibit the complement alternative pathway. These proteins were called *I. ricinus* anticomplement (IRAC) protein I and II. Further characterization of IRACs using monoclonal antibodies revealed that both proteins are expressed constitutively in *I. ricinus* salivary glands and are up-regulated during blood feeding. Analysis of a series of individual ticks revealed that all ticks tested express both IRAC I and IRAC II, demonstrating that they are the products of different genes and not of alleles of the same locus. Finally, phylogenetic analyses of the *I. ricinus* IRAC I and II sequences together with homologues from *I. scapularis* and *I. pacificus* demonstrates that ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a new family of relatively small anti-complement molecules undergoing diversification by positive Darwinian selection. Hélène Schroeder is the second author of the publication presenting the data described above (Daix *et al.*, (2007) *Insect Mol. Biol.* 16 (2), 155-166).

Phylogenetic analyses of IRACs suggested that these sequences were diversifying by a process of positive Darwinian selection, possibly leading to molecules with different biological properties. In the second study, we tested the hypothesis that each paralogue may have different inhibitory activities against the complement of different natural host species, thereby contributing to broaden the host range of *I. ricinus* ticks. The data obtained demonstrated that this working hypothesis is correct (Schroeder *et al.*, (2007) *Microbes Infect.* 9 (2), 247-250).

In the third and last chapter of the present manuscript, we addressed the potential of IRAC I and II as candidate antigens for the development of an anti-tick vaccine. Bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) recombinants expressing IRAC I or II were produced. Interestingly, we observed that although both recombinants expressed high levels of functional IRAC proteins *in vitro*, our attempts to immunize rabbits against IRACs *via* infection with these viruses invariably failed. In order to improve the immunogenicity of IRACs expressed as transgene, a second generation of BoHV-4 recombinants was produced. The latter expressed IRACs as transmembrane fusion proteins on cell surface. Comparison of the vaccine potential of BoHV-4 recombinant viruses expressing either secreted or transmembrane IRAC proteins revealed that while the former did not induce a detectable immune response against IRACs, the latter led to high titers of anti-IRAC antibodies. However, the immune response induced against IRACs did not lead to the reject of the tick but only slightly increased the duration of the blood feeding process. Hélène Schroeder is the second author of the manuscript presenting these data (Gillet *et al.*, (2008) In preparation).