Caractérisation de IrSPI, un inhibiteur de sérine protéase impliqué dans la prise du repas sanguin et l'infection bactérienne des tiques Ixodes ricinus.

Adrien Blisnick

▶ **To cite this version:**

Adrien Blisnick. Caractérisation de IrSPI, un inhibiteur de sérine protéase impliqué dans la prise du repas sanguin et l'infection bactérienne des tiques Ixodes ricinus.. Médecine vétérinaire et santé animale. Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France, 2019. Français. NNT : 2019IAVF0005 . tel-02367678

HAL Id: tel-02367678
https://theses.hal.science/tel-02367678

Submitted on 18 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT° : 2019 IAVF 0005

THESE DE DOCTORAT

préparée à l'Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (AgroParisTech)

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut agronomique vétérinaire et forestier de France

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

École doctorale n°581
Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Adrien Blisnick

Caractérisation de IrSPI, un inhibiteur de sérine protéase impliqué dans la prise du repas sanguin et l'infection bactérienne des tiques *Ixodes ricinus*.

Directrice de thèse : **Sarah Bonnet**

Thèse présentée et soutenue à Maisons-Alfort, le Jeudi 21 février 2019

Composition du jury :

Mme Isabelle Morlais, Directrice de recherche, IRD	Présidente du jury
M. Robert Ménard, Directeur de recherche, Institut Pasteur	Rapporteur
M. Phillipe Holzmuller, Chercheur, CIRAD	Rapporteur
Mme Laurence Vial, Chercheuse, CIRAD	Examinatrice
Mme Sarah Bonnet, Directrice de recherche, INRA	Directrice de thèse

UMR 956 BIPAR
22 rue Pierre et Marie Curie, 94700 Maisons- Alfort, France

Je dédie ce manuscrit à toute ma famille,

mes amis et aux personnes qui m'ont toujours poussé vers le défit qu'est la science.

Remerciements

De toute façon, quelques mots ne sont que bien peu pour remercier l'ensemble des personnes qui m'ont soutenu au cours de ces 3 années passées à l'UMR BIPAR, que ce soit sur le plan personnel ou professionnel.

Je voudrais évidemment commencer par remercier profondément et très chaleureusement ma directrice de thèse, Sarah Bonnet. Tu m'as accompagné, soutenu et conduit à être qui je suis aujourd'hui sur le plan scientifique. Je n'ai pas vu passer ces 3 années (on recommence ?) et te remercie donc pour tous ces moments, pour les réunions tard le soir qui étaient entrecoupées d'interludes de culture, de grammaire, … de remise en question permanente. Merci également de m'avoir fait voyager et participer à des congrès internationnaux, et de m'avoir permis de compléter ma formation grâce au cours de l'Institut Pasteur « Biochimie des protéines » et à la formation à l'expérimentation animale à l'ENVA. Bref, je résumerais bien ma thèse en 3 mots, les 3 premiers mots que tu m'as dits lorsque j'ai commencé ma thèse : « tu vas en baver ». Je peux aujourd'hui en effet les confirmer !!! Mais c'était un plaisir et malgré les moments compliqués j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi et en général dans cette UMR.

Je tiens à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail. Merci à Robert Ménard et à Phillipe Holzmuller qui ont accepté d'en être les rapporteurs. Merci également à Isabelle Morlais et à Laurence Vial qui ont accepté de faire partie du jury en tant qu'examinatrices.

Je remercie le directeur du Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES, le docteur Pascal Boireau, de m'avoir accueilli au sein de son établissement, ainsi que tous les membres de la direction de l'UMR BIPAR (Nadia Haddad, Henri-Jean Boulouis, Isabelle Vallée et Sarah Bonnet) de m'avoir accueilli dans l'unité.

Je remercie chaleureusement les trois membres de mon comité de thèse Olivier Plantard, Thierry Foulon et Brice Rotureau pour leur participation, leurs conseils et leurs critiques qui m'ont fait avancer.

Remerciements aux personnes qui ont contribué à l'avancée de cette thèse, via diverses collaborations et ont partagé avec moi leurs connaissances dans leurs domaines respectifs.

Evidemment mes premiers mots de remerciement iront à tous les membres du groupe ITA composé de Martine Cote et de son acolyte Evelyne Le-Naour, de Consuelo Almazan et de Ladislav Simo, et enfin de Lisa Fourniol. Un ENORME merci pour l'aide et le soutien inconditionnels que vous m'avez tous apportés au quotidien au cours de ces 3 années de doctorat dans le groupe.

Merci à nos collaboratrices de CBM au CNR d'Orléans, Catherine Grillon, et Fabienne Fasani pour votre expertise au niveau des cellules endothéliales et votre grande aide dans la réalisation des expérimentations.

Un très grand merci à Bernard le Bonniec pour son aide dans la réalisation des expériences de coagulation et de fibrinolyse, son partage important de connaissances sur le sujet de l'hémostase et les réponses nombreuses à mes questions.

Merci également à tous les membres de la plateforme de biophysique de l'Institut Pasteur que j'ai eu la chance de rencontrer lors du cours « biochimie des protéines » à l'Institut Pasteur gracieusement offert par le laboratoire, pour tous vos conseils, vos suggestions et votre temps.

Un grand merci à Damien Vitour, à Grégory Caignard et à Sandrine Lacour pour votre aide dans la réalisation des cribles double-hybride. Merci Grégory pour ton aide concrète tout au long des manips et pour ton partage important de connaissances sur ce sujet et tes réponses nombreuses à mes questions. Merci également à l'ensemble des Scientifiques et personnels de l'UMR de Virologie qui ont participé à l'obtention de la banque d'ADNc de tique *I. ricinus*, Lesley Bell-Sakyi, Houssam Attoui, Jennifer Richardson, permettant l'étude d'interactions protéiques réalisée au cours de ma thèse. Un merci tout particulier à Jennifer Richardson, avec qui j'ai travaillé sur le volet immunologie de ma thèse et avec qui j'ai beaucoup échangé au cours de ces derniers mois notamment pour l'écriture de l'article.

Enfin un très grand merci à Hélène Huet pour l'ensemble des inclusions, des coupes, et des marquages immunohistochimiques de tiques et de peau, qui a passé un temps considérable à la recherche de la protéine qui fait l'objet de cette thèse.

Une thèse, c'est aussi un environnement de travail, de partage avec ses collègues.

Je remercie toutes les personnes du bâtiment carré, anciens et nouveaux, pour l'ambiance familiale qui est créée dans ce bâtiment : mes co-doctorants, Mathilde, Emilie, et Camille et tous les autres scientifiques et IATOS, Sara, Muriel, Jean François, Thomas, Alejandro, Françoise, Dominique, Elodie, Lénaïs, Clémence, Anne-Claire, Clotilde et Marie-Pierre. Un grand merci aussi à tous les pensionnaires du bâtiment Vallée, et en particulier à Grégory, Mohammed, Amandine, Léa, les Aurélies, Dany, Madeleine, Myriam, Bruno, Sylvain, Karim.

Un grand merci particulier à Matthieu pour ta disponibilité et ta gentillesse dès qu'il s'est agi de m'aider au niveau administratif, mais pas seulement.

Enfin, je tiens à remercier très chaleureusement celle qui m'a soutenu dans tous les moments difficiles comme dans les bons, et qui partage ma vie, un immense merci à toi, Elena.

De même, je pense devoir beaucoup à mes parents, pour avoir guidé mes pas sur la route sinueuse de la recherche, et pour m'avoir toujours soutenu sans détour, dans toutes les décisions prises. Enfin merci à ma petite sœur, Camille, qui elle aussi a été d'un soutien sans faille durant ces 3 années.

Je remercie l'ANSES et le ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt (DGER) pour avoir co-financé cette thèse.

Table des matières

Liste des abréviations 1

Liste des Figures 2

Liste des tableaux 4

1. Introduction Générale 5

1.1 Le parasitisme, un mode de vie particulier 6

1.2 L'origine des tiques et de nos connaissances sur ces ectoparasites 7

1.3 Classification des tiques 9

1.4 Importance médicale et vétérinaire des tiques 11

1.4.1 Impacts sanitaires directs des tiques 11

1.4.2 Impacts sanitaires indirects des tiques 12

1.4.3 Les mécanismes de la transmission d'agents pathogènes 17

1.5 Moyens de lutte contre les tiques 18

1.5.1 Moyens de lutte chimique 18

1.5.2 Moyens de luttes biologique 19

1.5.3 Moyens de lutte écologique 20

1.5.4 Moyens de lutte génétique 21

1.5.5 Les vaccins anti-tiques 21

1.6 La tique *Ixodes ricinus* 25

1.6.1 Morphologie 26

1.6.2 Anatomie d'*I. ricinus* 30

1.6.2.1 L'appareil circulatoire et l'hémolymphe 30

1.6.2.2 Le système respiratoire 31

1.6.2.3 Les tubules de Malpighi 31

1.6.2.4 Le système nerveux 31

1.6.2.5 Les glandes salivaires 31

1.6.2.6 Le système digestif 33

1.6.2.7 Le système reproducteur 33

1.6.3 Le cycle de développement d'*I. ricinus* 34

1.6.3.1 Les stades de développement 34

1.6.3.2 Phases libres et parasitaires 34

1.6.3.3 Notion de préférences trophiques 36

1.6.4 Les principaux agents pathogènes transmis par la tique I*xodes ricinus* 36

1.6.4.1 Les bactéries transmises par I. ricinus 37

1.6.4.2 Les parasites transmis par I. ricinus 39

1.6.4.3 Les virus transmis par I. ricinus 39

1.7 La piqure de tique et l'importance de la salive 40

1.7.1 Mécanismes de la piqure 40

1.7.2 La salive de tique et son rôle dans le gorgement 41

1.7.2.1 Modulation de la douleur chez l'hôte vertébré 41

1.7.2.2 Modulation de l'angiogenèse chez l'hôte vertébré 41

1.7.2.3 Modulation de l'hémostase chez l'hôte vertébré 42

1.7.2.4 Modulation des réactions immunitaires de l'hôte vertébré 43

Réponses immunitaires innées 44

Réponses immunitaires adaptatives 45

1.7.3 Impact sur la transmission et l'acquisition d'agents pathogènes 46

1.8 Importance des inhibiteurs de sérine protéases chez les tiques 46

Revue Bibliographique 48

2. Origine du projet de thèse et résultats antérieurs 73

3. Objectifs de la thèse 76

4. Etudes expérimentales 78

4.1 Chapitre I : Analyse du gène *IrSPI* et de sa structure 79

4.1.1 Introduction 80

4.1.2 Résultats antérieurs 81

4.1.3 Matériels et Méthodes 83

4.1.3.1 Analyses bio-informatiques 83

4.1.3.2 Collecte et élevage de tiques 83

4.1.3.3 Extraction de l'ADN 84

4.1.3.4 Extraction d'ARN totaux et synthèse d'ADNc 84

4.1.3.5 Réaction d'amplification par PCR 85

4.1.3.6 Capture de séquences d'ADN cibles par hybridation à l'aide de billes magnétiques 86

Principe général 86

Synthèse de la sonde monocaténaire et biotinylation 87

Fragmentation de l'ADN 88

Hybridation de la sonde biotinylée et des fragments d'ADN total 88

Isolement des fragments d'ADN d'intérêt via les billes magnétiques 88

4.1.3.7 Clonage dans le vecteur pGEM-T easy et séquençage 89

4.1.4 Résultats 91

4.1.4.1 Analyses in silico de la séquence du gène IrSPI 91

Identification de gènes homologues 91

Prédiction de la structure du gène IrSPI 95

4.1.4.2 Séquençage du gène IrSPI 96

Recherche de la séquence en 3' du gène IrSPI par amplification PCR 96

Capture d'ADN cible à l'aide de billes magnétiques 100

4.1.5 Conclusions et perspectives 104

4.2 Chapitre II : Etude de l'expression et de la fonction d'IrSPI dans la biologie et le gorgement de la tique *I. ricinus* 107

4.2.1 Introduction 108

4.2.2 Article en préparation 110

4.2.3 Etudes complémentaires 161

4.2.3.1 Matériel et Méthodes et Résultats 161

Expression du gène *IrSPI* 161

Détection de la protéine IrSPI par immunohistochimie 161

Analyse Biophysique de la protéine recombinante 163

Détermination des sérines protéases cibles d'IrSPI 165

Mesure de la cytotoxicité d'IrSPI sur les cellules endothéliales HSkMEC 166

Mesure de l'impact d'IrSPI sur les macrophages dérivés de moelle osseuse de souris BALB/cJRj 167

4.2.3.2 Discussion 168

4.2.4 Conclusions et perspectives 171

4.3 Chapitre III : Etude des interactions protéiques d'IrSPI par une approche de criblage double hydride en système levure 174

4.3.1 Introduction 175

4.3.2 Matériels et méthodes 176

4.3.2.1 Principe général de l'expérience de double hybride en système levure 176

4.3.2.3 Banques d'ADNc 177

4.3.2.4 Constructions plasmidiques 177

Principe général du système de clonage Gateway 177

Clonage de IrSPI en système Gateway 178

4.3.2.5 Transformation des levures 180

4.3.2.6 Criblage double hybride 180

4.3.2.7 Analyses des résultats 181

4.3.3 Résultats 182

4.3.3.1 Constructions plasmidiques 182

4.3.3.2 Résultats de la transformtion des bactéries DH5α avec le vecteur pDONR207. 182

4.3.3.3 Réaction de LR 183

4.3.3.4 Test d'auto-induction de l'HIS3 184

4.3.3.5 Criblage double hybride 184

4.3.4 Discussion 188

4.3.5 Conclusions et Perspectives 194

5. Conclusion générale 196

Bibliographie 202

Annexes 220

Liste des abréviations

AD: domaine activateur de la transcription

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARNi : interférence à ARN

ARNm : ARN messager

att : site-specific attachment

DB : domaine de liaison à l'ADN

DDT : dichloro-diphényl-trichloréthane

DO : densité optique

ECDC : Centre européen de prévention et de contrôle des maladies

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

EST : expressed sequence tag

FGF: Fibroblast Growth Factor

FT: facteur tissulaire

HGF : Hépatocyte Growth Factor

IrSPI : *Ixodes ricinus* Serine Protease Inhibitor

ISP : Inhibiteur de sérine protéase

kDa : kiloDalton

OGM : Organisme génétiquement modifié

ORF : Open Reading Frame (cadre de lecture ouvert)

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

pH : potentiel hydrogène

PCR : réaction de polymérisation en chaine (polymerase chain reaction)

qRT-PCR : (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction) réaction de polymérisation en chaine quantitative après reverse transcription

RACE : rapid amplification of cDNA ends

SVF : sérum de veau fœtal

TBEV : Tick Borne encephalitis virus

TBP : Tick borne pathogen

TGF : Transforming Growth Factor

Liste des Figures

Figure 1: Classification systématique des espèces de tiques (selon Camicas et al. 1998). 10

Figure 2: Représentation schématique de l'acquisition et de la transmission d'agents pathogènes par une tique. 17

Figure 3: Carte de répartition d'*I. ricinus* datant de juin 2018. 26

Figure 4*:* Les différents stades évolutifs d'*Ixodes ricinus.* 26

Figure 5: Différences morphologiques entre les tiques dures et les tiques molles femelles. 27

Figure 6: Tégument d'une femelle *Ixodes ricinus* au MEB (X550) et montrant des soies sensorielles. 28

Figure 7: Face ventrale de femelle *I. ricinus* au MEB (X90) 28

Figure 8: Vue face ventrale du rostre de femelle *Ixodes ricinus* au MEB (250x). 29

Figure 9: Anatomie générale d'une tique dure 30

Figure 10: Anatomie et position des glandes salivaires chez la tique *I. ricinus* 32

Figure 11: Cycle de développement triphasique et trixène d'*I. ricinus* 35

Figure 12: Extinction du gène *IrSPI* par ARN interférence et mesure de l'impact de cette extinction sur la quantité de sang prélevée par des tiques *I. ricinus* femelles lors du gorgement, et sur la charge bactérienne dans les glandes salivaires de ces tiques infectées par *B. henselae*. 75

Figure 13: Séquence de l'Isotig FK531922.2 contenant la séquence d'*IrSPI* et positions des amorces utilisées en PCR. 81

Figure 14: Schéma de la structure du gène *IrSPI* avec deux exons et un intron. 82

Figure 15: Séquence connue du gène IrSPI et position des amorces utilisées pour les ampifications PCR. 86

Figure 16: Principe général de l'expérience de capture de séquence d'ADN par l'utilisation de billes magnétique. 86

Figure 17: Structure hypothétique du gène *IrSPI* à l'heure actuelle de nos connaissances. 96

Figure 18: Electrophorèse en gels d'agarose à 2% des produits de PCR obtenus après amplification par les amorces F1-intron- ID23822 et F2-intron-ID23822 de l'ADN d'*I. ricinus*. 97

Figure 19: Electrophorèses sur gel d'agarose à 2% des produits de PCR obtenus après amplification par les amorces F1-intron-R2 et F2-intron-R2 de l'ADN d'*I. ricinus*. 97

Figure 20: Electrophorèses en gel d'agarose 2% des amplifications par PCR touchdown par les amorces F2-intron-R2 et F2-intron- ID23822 sur de l'ADN d'*I. ricinus*. 98

Figure 21: Electrophorèse en gel d'agarose 2% des produits d'amplification de l'ADNc de *I. ricinus* avec les amorces F1 RACE-Adapto primer et F2 RACE-Adapto primer. 99

Figure 22: Electrophorèses sur gel d'agarose des produits d'amplification d'ADN de *I. ricnus* après clonage . 100

Figure 23: Electrophorèse en gel d'agarose 2% des produits d'amplification, après clonage, des fragments d'ADN de *I. ricinus* capturés par la sonde de 183 pb. 101

Figure 24: Electrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification par PCR avec les amorces 3F-4R, 3F-ID23882, 3F-1R à partir de l'éluât de l'expérience utilisant l'ADN doubement digéré par Ase I et Hinc II. 102

Figure 25: Résultats des amplificactions par PCR avec les amorces 3F-4R, 3F-1R et 3F-ID23882._____103

Figure 26: Coupes longitudinales de tiques femelles *I. ricinus* pré-gorgées pendant 5 jours sur lapin après coloration HES et marquages immunohistochimiques par des anticorps drigés contre IrSPI._____ 162

Figure 27: Spectre m/z de la protéine recombinante IrSPI après analyse en MALDI-TOF/TOF.____ 163

Figure 28: Prédictions des structures secondaires de la protéine recombinante IrSPI avec le serveur Bestsel à partir des données de dichroïsme circulaire obtenues avec une production de protéine IrSPI de concentration 0,075mg/ml. _____164

Figure 29: Inhibition de la chymotrypsine, de la trypsine et de l'élastase par la protéine IrSPI non refoldée._____165

Figure 30: Mesure de la viabilité des cellules endothéliales HsKMEC en présence d'IrSPI._____166

Figure 31: Principe général de l'expérience de double hybride en système levure._____ 176

Figure 32: Principe du système de clonage Gateway._____178

Figure 33: Produits d'amplification de PCR à partir du plasmide pET28 contenant l'ADNc d'*IrSPI* avec les amorces spécifiques Gateway._____182

Figure 34: Alignement des séquences obtenues après séquençage des clones DH5a positifs ayant été transformés par le plasmide contenant la séquence d'IrSPI avec son peptide signal (IrSPI-sp-1, IrSPI-sp-2, IrSPI-sp-4) sur la séquence de IrSPI (gène IrSPI)._____ 183

Figure 35: Levures Y2H Gold tranformées avec les plasmides pPC97 contenant les séquences avec et sans peptide signal de l'ORF codant IrSPI en culture sur milieu avec et sans 3-AT._____ 184

Figure 36: Amplification par PCR des inserts portés par les vecteurs pDEST22 contenant un ADNc issu de la banque Humaine._____ 185

Figure 37: Amplification par PCR des inserts portés par les vecteurs pDEST22 contenant un ADNc issu de la banque Bovine._____ 186

Figure 38: Amplification par PCR des inserts portés par les vecteurs pDEST22 contenant un ADNc issu de la banque d'*I. ricinus*._____ 186

Figure 39 (Annexe): Représentation schématique du vecteur de clonage pGEM-T easy (Promega)_222

Liste des tableaux

Tableau 1: Espèces de tiques majoritaires en Europe, les agents pathogènes qu'elles transmettent ainsi que leurs réservoirs animaux associés, et les maladies associées. _____14

Tableau 2: Identification des gènes différentiellement exprimés dans les glandes salaivaires suite à l'infection des tiques *Ixodes ricinus* femelles par *B. henselae*. (D'après Liu et al., 2014b)._____74

Tableau 3: Tableau récapitulatif des résultats antérieurs de séquençage d'IrSPI._____82

Tableau 4: Tableau récapitulatif des séquences d'ADNc homologues d'*IrSPI* retrouvées chez *I. ricinus*_____ 92

Tableau 5: Tableau récapitulatif des séquences d'ADNc orthologues d'*IrSPI* retrouvées chez *I. scapularis*_____ 93

Tableau 6: Tableau récapitulatif des protéines homologues d'*IrSPI* retrouvées dans les banques de données de Vectorbase _____93

Tableau 7: Interacteurs identifiés pour IrSPI suite au criblage par double hybride en système levure de banques humaine, bovine et de tique. _____ 187

Tableau 8: Liste des amorces utilisées lors des PCR du chapitre I. _____220

Tableau 9: Tableau récapitulatif des conditions de PCR utilisées dans le chapitre I_____221

Tableau 10: Résultats des interacteurs identifiés après les criblages double hybride pour les banques humaine, bovine et *I. ricinus*_____ 223

1. Introduction Générale

1.1 Le parasitisme, un mode de vie particulier

A l'origine de la vie sur notre planète, il y a approximativement 3,8 milliards d'années, apparaissaient les premiers êtres vivants microscopiques dans nos océans. Ceux-ci étaient majoritairement hétérotrophes, et donc dépendants d'une source de nourriture externe (acides aminés, minéraux, ions…) pour pouvoir subvenir à leurs besoins, croitre et se multiplier. C'est dans ce qu'Oparin et Haldane ont appelé une « soupe primitive » que ces organismes puisaient les atomes fondamentaux (C-H-O-N-P-S) nécessaires à la composition des molécules du vivant [1]. Devant la croissance exponentielle du nombre d'organismes entrainant la raréfaction de ces composés indispensables, certains ont été contraints de s'adapter et sont devenus autotrophes pour certaines de ces molécules, alors que d'autres, restés hétérotrophes, ont dû trouver de nouvelles sources d'approvisionnement, et donc utiliser la matière organique présente dans d'autres organismes afin de subsister. C'est ainsi que les premières relations inter-individus sont nées. Dès lors, sur terre, la vie animale comme végétale s'est incroyablement diversifiée, et à l'heure actuelle on dénombre environ 1,95 millions d'espèces, dont 1,6 millions d'animaux (taxon des Animalia), et 364 000 plantes (taxon des Plantae) [2].

L'augmentation globale du nombre d'organismes a nécessairement engendré une hausse et une diversification des interactions inter-espèces, et de fait, leur complexification. Ainsi, ces relations inter-spécifiques peuvent être de plusieurs natures. Le mutualisme est une interaction permanente ou transitoire permettant à deux espèces d'être plus aptes à se maintenir dans leur milieu [3]. Chacune d'elle tire un avantage réciproque et égal à interagir. Les Lichens sont par exemple une étroite association mutualiste obligatoire entre une algue et un champignon [4]. Le commensalisme est lui définit par une interaction qui ne bénéficie qu'à un des deux partenaires alors que l'autre n'est pas affecté. Par exemple, le héron garde-bœufs (*Bubulcus ibis*) bénéficie du levé des insectes et des petits mammifères au passage du bétail dans les pâtures pour enrichir et diversifier son alimentation. Parfois les limites entre commensalisme et mutualisme sont assez floues, comme en témoigne l'exemple des interactions développées par les bactéries qui colonisent le tube digestif des vertébrés et souvent qualifiées de « commensales ». Les vertébrés fournissent un habitat adapté à leurs conditions de croissance optimale (pH, anaérobie…), et en échange, ces bactéries participent à la dégradation de nutriments fournissant à l'hôte certaines des vitamines indispensables (vitamines B et K). Ces bactéries permettent également la constitution, le maintien et la stimulation constante du système immunitaire.

Ainsi, et compte tenu de ces aspects immunitaires et nutritionnels, les interactions entre l'hôte et ces bactéries dans le tube digestif seraient à requalifier sous le terme de mutualistes plutôt que de commensales [5]. Enfin, des relations délétères pour une des espèces impliquées existent également. La prédation est une interaction dans laquelle un des deux partenaires va littéralement servir de nourriture à l'autre, comme c'est le cas des lionnes qui chassent puis dévorent le gnou. Contrairement à la prédation où la proie finit par être mangée par le prédateur, le parasitisme est une relation souvent réversible qui fait intervenir un organisme qui vit au dépend d'un autre sans qu'il n'existe d'échange positif. Cette relation implique une co-adaptation liée à l'évolution, l'organisme parasite, pour survivre, n'ayant aucun intérêt à tuer son hôte. On distingue deux types de parasites, les endoparasites qui vivent à l'intérieur de l'hôte (dans les tissus et les fluides) comme *Plasmodium spp.* (agent responsable du paludisme) et les ectoparasites qui eux, vivent à la surface de leur hôte comme les puces par exemple.

Tout comme les puces, les tiques sont des ectoparasites hématophages stricts (elles se nourrissent exclusivement de sang) et dépendent de la présence d'hôtes vertébrés pour survivre. Ce sont donc des parasites obligatoires mais temporaires car leur cycle de vie comporte en alternance des phases dites parasitaires durant lesquelles elles se gorgent sur leurs hôtes, et des phases dites libres dans l'environnement. Les tiques ont co-évolué avec leurs hôtes pour être soit spécialistes et ne se nourrir que sur une espèce d'hôte en particulier (exemple de *Rhipicephalus (boophilus) microplus*), ou alors à l'inverse devenir généralistes et être capables de se gorger sur une variété d'hôtes vertébrés importante (exemple d'*Ixodes scapularis*).

1.2 L'origine des tiques et de nos connaissances sur ces ectoparasites

De récents travaux basés sur une espèce de tique encore vivante mais considérée phylogéntiquement comme une espèce ancestrale tendent à envisager une origine située dans une zone désertique du bassin du Karoo du Gondwana, en Afrique du sud, au Permien moyen (de -260 à -270 millions d'années) [6].

Par ailleurs, d'autres études ont pu montrer grâce au recoupement d'informations déduites des associations entre les tiques et leurs hôtes, et de caractères morphologiques et moléculaires, que, pour ces dernières, la diversification des espèces coïncidait avec la diversification des espèces de vertébrés existantes et à l'apparition de nouvelles espèces de vertébrés (dinosaures, oiseaux et marsupiaux) [7].

Cette diversification d'hôtes fut sans doute l'un des facteurs de la spéciation des espèces de tiques, spéciation qui semble s'être intensifiée à l'ère Tertiaire avec l'apparition des primates et l'explosion des mammifères (-55 Millions d'années) [7]. Très récemment, des tiques conservées dans de l'ambre qui daterait d'environ -99 Millions d'années ont été découvertes en Birmanie, tiques qui parasitaient très probablement les dinosaures à plumes de l'époque [8]. Toutes ces espèces de tiques ont ensuite évoluées indépendamment les unes des autres comblant les niches écologiques vacantes, se nourrissant sur tous les genres de vertébrés terrestres disponibles (oiseaux, reptiles, mammifères, amphibiens), et se déplaçant au grès des mouvements migratoires de leurs hôtes. Ainsi, les combinaisons des habitats, des hôtes et du climat ont été les moteurs de la spéciation et de la diversification des espèces de tiques.

Les premiers écrits rapportant l'existence des tiques remonteraient à l'époque des Egyptiens (-3150 à -30 av. J.C.) où ces arthropodes seraient décrits dans le *Papyrus Ebers* (-1550 avant J.C.) [9]. Plus tard, chez les grecs (-1900 à -30 av. J.C.), Homère raconte le retour d'Ulysse à Ithaque dans son œuvre *l'Odyssée* (environ 800 avant J.C.), dans laquelle son fidèle compagnon, le chien Argos, serait couvert de vermine, faisant alors probablement référence à des tiques [10]. Dans les textes de l'Antiquité, les tiques sont effectivement mentionnées comme parasites du bétail, des oiseaux ou des chiens mais pas de l'homme. De la même façon, E. Littré dans son Dictionnaire de la langue française (1872-1877), mentionne que les tiques s'attachent *« aux chiens, aux bœufs, aux moutons et autres animaux »* mais n'évoque pas l'homme.

Si la découverte, en 1877 par Manson, de la filaire de Bancroft dans un moustique est considérée comme les débuts de l'entomologie médicale en représentant la première implication possible d'un arthropode dans la transmission d'un agent pathogène, cette dernière a été prouvée pour la première fois avec les tiques. C'est en effet entre 1889 et 1893 que les deux chercheurs nord-américains, T. Smith et F. Kilbourne, rapportèrent l'existence d'une transmission du parasite *Babesia bigemina,* par la tique *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* à des bovins [11]. Cette découverte majeure fut à l'origine de l'éradication de la « fièvre du Texas » des bovins aux Etats-Unis dès 1942, par l'éradication des tiques en baignant les bovins dans des piscines d'arsenic.

Aujourd'hui, celui qui est considéré comme le « père fondateur » de la recherche sur les tiques est Harry Hoosgtraal, avec son ouvrage « *Bibliography of ticks and tickborne diseases : from Homer (about 800 B.C.) to 31 December 1986* » [10].

1.3 Classification des tiques

La classification des tiques et la détermination de leur position systématique est un sujet qui a passionné les scientifiques depuis la moitié du XXème siècle. Initialement basée sur l'étude des caractères morphologiques, la répartition géographique et les caractéristiques biologiques, la classification des genres et des espèces de tiques est parfois arrivée à des non-sens évolutifs. Fort heureusement, l'avènement de la biologie moléculaire après la seconde guerre mondiale a permis d'éclaircir un certain nombre de zones d'ombres même si subsistent encore des divergences d'opinion au sein de la communauté scientifique.

Trois grandes écoles de pensée se sont affrontées au sujet de la systématique et la phylogénie des tiques : les écoles russe, anglo-saxonne et française [10, 12, 13] . Ces trois écoles ont eu des divergences d'opinion surtout quant à la phylogénie des tiques molles, mais se sont néanmoins accordées pour classifier les tiques dans l'embranchement des *Arthropoda*, le sous-embranchement des *Chelicerata*, la classe des *Arachnida*, la sous-classe des *Acarida*, le superordre des *Anactinotrichoida* et enfin l'ordre des *Ixodida*. Cet ordre des Ixodida se subdivse en trois sous-ordres : Nuttalliellina, Argasina et Ixodina (Figure 1).

Une seule espèce est actuellement répertoriée au sein du sous-ordre des Nuttalliellina, *Nuttalliella namaqua* identifiée en Afrique. Morphologiquement il semblerait que cette espèce constitue un intermédiaire entre les tiques du sous-ordre des Ixodina et celui des Argasina. Devant le peu d'études qui se limitent à l'observation de quelques nymphes et femelles isolées, ces hypothèses morphologiques restent incertaines. Conséquences du peu de données récoltées sur cette espèce, son biotope, ses préférences d'hôtes, son importance en santé animale et humaine, ainsi que sa distribution ne sont, à l'heure actuelle, pas connus.

Le sous-ordre des Argasina, aussi appelées « tiques molles » à cause de leur tégument pourvu de chitine (polymère azoté de N-acétylglucosamine perméable à l'air et à l'eau) mais non sclérifié, correspond à une seule famille, les Argasidae, subdivisée en deux sous-familles que sont les Argasinae et les Ornithodorinae composées respectivement de trois et huit genres (Figure 1). Biologiquement, les tiques molles se caractérisent par le fait qu'aux stases nymphales et adultes, ces tiques prennent plusieurs repas sanguins relativement courts (de quelques minutes à quelques heures), la femelle effectuant une ponte après chacun de ces repas. Chez les tiques, les différentes étapes de développement larve, nymphe et adulte sont dénommées stases et correspondent à des métamorphoses quand l'appellation stades fait

référence à des mues de croissance successives sans métamorphoses et séparées par la prise d'un repas sanguin. Ainsi, chez les tiques molles les stases nymphales et adultes comportent plusieurs stades.

Les « tiques dures » quant à elles, appartiennent au sous ordre des Ixodina et possèdent un tégument chitinisé et sclérifié. Ce sous-ordre se subdivise en deux grandes familles : les Amblyommidae comprenant 13 genres, et les Ixodidae composés de deux sous familles les Ixodinae et les Eschatocephalinae qui contiennent respectivement un et cinq genres. A la différence des tiques molles, les tiques dures ne prennent qu'un seul long repas sanguin par stase (stades et stases sont donc équivalents chez les tiques dures) avant de muer dans la stase suivante, ou de pondre des œufs pour la femelle. Ces repas, très longs, peuvent aller jusqu'à 10-12 jours pour les adultes de certaines espèces.

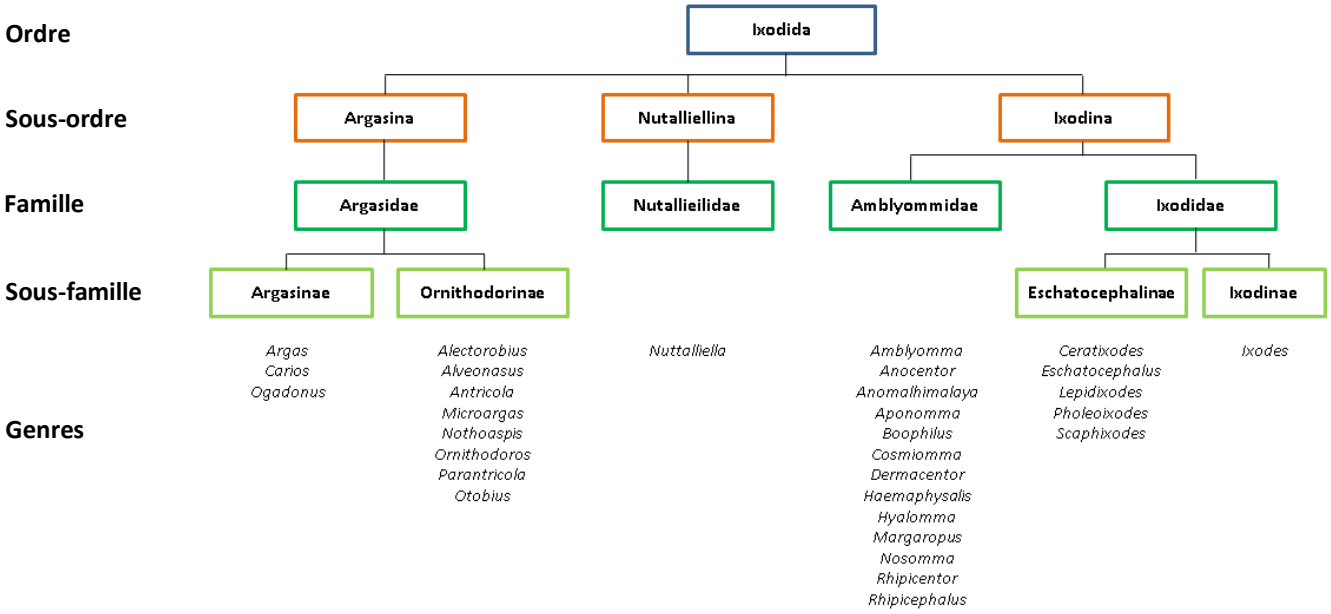


Figure 1: Classification systématique des espèces de tiques (selon Camicas et al. 1998).

Au total 907 espèces de tiques tous genres confondus sont actuellement décrites. Les *Argas* (58 espèces), *Carios* (88 espèces) et *Ornithodoros* (37 espèces) sont les genres les plus représentés chez les « tiques molles ». Quant aux tiques dures, les genres *Amblyomma* (143 espèces), *Dermacentor* (36 espèces), *Haemaphysalis* (166 espèces), *Hyalomma* (27 espèces) et *Ixodes* (249 espèces) comptent le plus grands nombres de représentants [14].

1.4 Importance médicale et vétérinaire des tiques

A travers le monde, et notamment dans les régions tropicales, l'infestation par les tiques constitue une contrainte majeure pour l'élevage et contribue à réduire fortement la production animale [15]. Leur impact sur la santé humaine constitue aussi un problème majeur, notamment dans l'hémisphère nord en raison essentiellement de la Borréliose de Lyme et de l'encéphalite à tiques (TBE pour « Tick-borne Encephalitis » en anglais) [16]. L'émergence ou la ré-émergence de maladies liées aux tiques représente à l'heure actuelle une inquiétude légitime à la fois en santé humaine et en santé animale, l'incidence de ces maladies étant en augmentation dans plusieurs pays européens [17]. Hématophages, les tiques prennent des repas de sang plus ou moins long suivant le stade et l'espèce concernés (de quelques minutes pour des tiques molles à 12 jours pour des tiques dures) sur des hôtes vertébrés domestiques ou sauvages. L'homme, en s'introduisant dans le biotope de ces hôtes, peut alors devenir un hôte accidentel des tiques. Ces dernières ont un impact important en santé animale comme en santé humaine par le biais d'effets à la fois directs en tant qu'ectoparasites hématophages, et indirects en tant que vecteur d'agents pathogènes transmis lors du repas sanguin.

1.4.1 Impacts sanitaires directs des tiques

Du simple fait de leur piqûre, en l'absence de toute transmission d'agents pathogènes, les tiques peuvent représenter un danger pour l'homme mais ont surtout, par ce biais, un impact important en santé animale et peuvent être responsables de pertes économiques conséquentes pour les éleveurs.

Pour se nourrir de sang les tiques doivent dans un premier temps se fixer sur leurs hôtes. Elles insèrent pour cela leurs pièces buccales dans la peau de l'hôte vertébré, perforant et dégradant ainsi la peau de l'animal en rendant difficile la transformation et la vente du cuir par la suite. De plus, une tique peut prélever au cours de son repas sanguin jusqu'à 200 fois son poids en sang pour certaines espèces, ce qui, pour des espèces du genre *Amblyomma* peut représenter par exemple jusqu'à 4 ml de sang. Ainsi, une infestation importante aura pour conséquence un fort affaiblissement de l'hôte à cause de la spoliation sanguine et de l'anémie induite. Un tel affaiblissement aura un impact sur la production de lait et de viande et sur la susceptibilité de l'animal vis-à-vis d'infections diverses. Les piqures de tique, en générant une plaie, peuvent aussi représenter une porte d'entrée pour des microorganismes opportunistes pathogènes, risque accentué par le contexte d'immunodépression locale due à la salive de la

tique. A la suite de piqures de la tique *Amblyomma variegatum* et parce que sa salive crée une dépression immunologique locale très importante, il n'est pas rare par exemple de trouver le développement de microorganismes pathogènes comme *Dermatophilus congolensis* à partir du site de piqure [18].

Par ailleurs, l'injection de salive au cours de la piqûre, peut aussi avoir des effets néfastes à la fois chez l'homme et chez l'animal. Certaines espèces de tiques comme *Dermacentor andersoni, Dermacentor variabilis* et surtout *Ixodes holocyclus* possèdent une salive riche en neurotoxines responsables de la paralysie ascendante à tique, qui intervient suite à une piqûre à proximité d'un trajet nerveux et peut conduire à la mort par arrêt des fonctions cardio-respiratoires [19]. Enfin, des réactions allergiques à la salive de tique peuvent aussi exister et, dans de rares cas, conduire à un choc anaphylactique, notamment concernant des tiques molles du genre *Argas* spp. [20]. Enfin, récemment, un nouveau phénomène allergique vis-à-vis d'un sucre appelé « *alpha*-Galactose » ou « *alpha*-Gal » contenu dans la salive de tique a été mis en évidence [21]. L'homme, qui ne synthétise pas ce sucre, peut être sensibilisé suite à une piqûre de tique et faire ensuite, par réaction croisée, un choc anaphylactique en mangeant de la viande rouge qui en contient [22]. Initialement décrit en Australie, ce phénomène devient de plus en plus préoccupant aux États-Unis et quelques cas ont été rapportés en Europe et en France [21].

1.4.2 Impacts sanitaires indirects des tiques

Outre leur impact direct en tant qu'ectoparasites, les tiques sont d'importants vecteurs d'agents pathogènes comme le sont les moustiques, les puces, les mouches piqueuses ou autres phlébotomes. Au niveau mondial, les tiques sont le deuxième vecteur d'agents pathogènes touchant les humains derrière les moustiques, et le premier vecteur d'agents pathogènes en santé vétérinaire [16, 23]. Ce sont des arthropodes capables de transmettre la plus grande variété d'agents pathogènes incluant des bactéries, des parasites, des virus et des helminthes [24]. Néanmoins, comme l'ensemble des vecteurs, les tiques ne sont pas des « seringues » et chaque espèce va posséder une compétence vectorielle qui lui est propre vis-à-vis de tel ou tel agent pathogène, compétence régit par des facteurs génétiques. La majorité de ces agents pathogènes sont zoonotiques, à savoir qu'ils sont transmissibles de l'animal à l'homme et inversement.

Les tiques sont d'excellents vecteurs d'agents pathogènes en raison de plusieurs de leurs caractéristiques biologiques. En effet, les modalités de gorgement de ces arthropodes impliquent des repas très longs et volumineux pour les tiques dures et des repas fréquents pour

les tiques molles. D'autre part la capacité de beaucoup d'espèces de tiques à se nourrir sur une très large variété de vertébrés permet une excellente circulation des agents pathogènes entre ces espèces. La très grande longévité de ces arthropodes participe également à maintenir les agents pathogènes dans la nature. Enfin, malgré la complexité de leurs cycles biologiques au cours desquels une forte mortalité peut être observée, les populations de tiques se maintiennent dans la nature grâce à un haut potentiel reproducteur, une femelle pouvant pondre des milliers d'œufs [25]. Les principales espèces de tiques d'Europe, leurs répartitions géographiques, les micro-organismes qu'elles sont susceptibles de transmettre, les réservoirs animaux et les maladies associées sont présentés dans le Tableau 1. En Europe, *Ixodes ricinus* est l'espèce la plus abondante avec la répartition géographique la plus large, et représente l'espèce de tique la plus importante en santé humaine [26, 27]. Cette espèce, à même de se nourrir sur plus de 300 espèces d'hôtes différentes, est en effet susceptible de transmettre à l'homme, hôte accidentel, les bactéries responsables de la maladie de Lyme, de rickettsioses et de l'anaplasmose, des virus dont celui de l'encéphalite à tiques (TBEv), ou encore des parasites responsables de la babésiose (ou piroplasmose). Les agents pathogènes les plus importants et les plus fréquemment transmis aux animaux de rente, sont ceux responsables de l'anaplasmose ou de la babésiose. Pour les bovins, les autres espèces de tiques les plus importantes - surtout rencontrées dans le sud de l'Europe - sont *Haemaphysalis punctata*, vecteur de *Babesia major*, *Rhipicephalus annulatus* et *Rhipicephalus bursa*, vecteurs de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* et *Anaplasma marginale*, et *Hyalomma anatolicum excavatum*, vecteur de *Theileria annulata*. En France, pour les équidés ce sont essentiellement *Dermacentor reticulatus* et *Dermacentor marginatus* qui transmettent *Babesia caballi* et *Theileria equi*, responsables de la piroplasmose équine. *I. ricinus*, peut aussi transmettre aux équidés des *Borrelia* spp., *Anaplasma phagocytophilum* ou encore le virus de l'encéphalite infectieuse équine. Pour les chiens, *D. reticulatus*, *I. ricinus* et *Rhipicephalus sanguineus* représentent, les espèces ayant le plus fort impact sanitaire en leur transmettant des *Babesia*, des *Borrelia*, *A. phagocytophilum*, et des *Ehrlichia* [28]. Enfin *Hylomma marginatum*, principal vecteur du virus de la fièvre de Crimée-Congo (CCHF) (Page 230 du présent manuscrit de thèse) déjà présente en Corse, a été récemment identifiée comme une nouvelle espèce de tique établie dans le sud de la France représentant ainsi un potentiel impact en santé humaine important. Ainsi, certaines espèces de tiques peuvent transmettre plusieurs agents pathogènes simultanément, engendrant des phénomènes de co-infection susceptibles d'être à l'origine de problèmes de diagnostic chez l'homme comme chez l'animal.

Tableau 1: Espèces de tiques majoritaires en Europe, les agents pathogènes qu'elles transmettent ainsi que leurs réservoirs animaux associés, et les maladies associées.

Tiques vectrices	Répartition géographique	Agents pathogènes transmis	Réservoirs animaux	Maladies associées
Ixodes ricinus	Europe	*Borrelia sp.,*	Rongeurs, oiseaux, lézards	Maladie de Lyme
		Anaplasma sp.	Rongeurs, Ruminants, Chiens, Chevaux, Oiseaux	Anaplasmose granulocytaire bovine et humaine; anaplasmose erythrocytaire ovine
		Francisella tularensis.	Lagomorphes, Rongeurs	Tularémie
		Rickettsia helvetica	Cervidés ? Rongeurs ? Sangliers ?	Rickettsiose anéruptive
		Bartonella henselae	Chat	« Maladie des griffe du chat »
		Coxiella burnetii	Mammifères	Fièvre Q
		Babesia sp.	Bovins, Canidés, Rongeurs,	Piroplasmose –ou babésiose- bovine, canine, et humaine
		Virus de l'encéphalite à tique (TBEV)	Rongeurs	Encéphalites
		Virus de Louping ill	Ovins	Encéphalites
		Virus Eyach	Mammifères, Lagomorphes, Oiseaux	Encéphalites, troubles neurologiques
Ixodes persulcatus	Nord-est de l'Europe	*Borrelia sp.,*	Rongeurs, oiseaux, lézards	Maladie de Lyme
	Asie	*virus de la fièvre hémorragique d'Omsk*	Rongeurs	Fièvre hémorragique
		Virus de l'encéphalite à tique (TBEV)	Rongeurs	Encéphalites
Ixodes hexagonus	Europe du sud	*Borrelia sp.,*	Rongeurs, Insectivores	Maladie de Lyme
	Afrique du nord	*Babesia microti*	Rongeurs	Piroplasmose humaine
		Rickettsia sp.	Cervidés, Chien?, Rongeurs?, Lagomorphes?	Rickettsioses
		Babesia vulpes sp. nov.	Canidés	Babésiose canine

Dermacentor marginatus	Europe du sud	*Anaplasma ovis,*	Ovins, Caprins, Ruminants sauvages	Anaplasmose erythrocytaire ovine
		Rickettsia sp.,	Chien?	Rickettsioses (TIBOLA)
		Coxiella burnetii	Mammifères	Fièvre Q
		Francisella tularensis	Lagomorphes, rongeurs	Tularémie
		Siberian tick typhus	?	Typhus sibérien
		Babesia sp.	Canidés,	Piroplasmose canine
		Babesia cabalii	Equidés	Piroplasmose équine
		Theileria sp.,	Equidés	Theilériose
Dermacentor reticulatus	Europe du nord et centrale	*Francisella tularensis*	Lagomorphes, rongeurs	Tularémie
		Rickettsia sp.,	Chien?	Rickettsioses (TIBOLA, typhus sibérien)
		Coxiella burnetii.,	Mammifères	Fièvre Q
		Babesia canis,	Chiens	Babésiose canine
		Babesia sp.,	Bovins, Chiens, Rongeurs, Renards	Piroplasmose bovine, canine
		Theileria sp.,	Bovins, Equidés,	Theilériose bovine, équine
		Virus de la fièvre hémorragique d'Omsk	Rongeurs	fièvre hémorragique
Rhipicephalus sanguineus	Europe du sud	*Rickettsia conorii*	Chiens	Fièvre boutonneuse méditerranéenne
		Coxiella burnetii	Mammifères	Fièvre Q
		Ehrlichia canis	Chiens, canidés sauvages	Ehrlichiose monocytaire canine
		A. platys	Chien	Thrombopénie canine
		Hepatozoon canis	Chien	Ehrlichiose monocytaire canine
		Babesia sp.,	Bovins, Chiens, Rongeurs, Renards	Piroplasmose bovine, babésiose canine, babésiose humaine
		Dipetalonema sp	Canidés	Filarioses des canidés
Haemaphysalis concinna	Europe de l'ouest	*Rickettsia sibirica*	*?*	Thyphus sibérien
Rhipicephalus (Boophilus) annulatus	Europe du sud	*Anaplasma marginale*	Bovins, ruminants sauvages	Anaplsmaose érythrocytaire bovine
	Afrique du nord	*Babesia bigemina*		Piroplasmose bovine
		Babesia bovis		Piroplasmose bovine

Rhipicephalus bursa	Europe du sud et centrale	*Anaplasma sp.,*	Ruminants, chiens, chevaux rongeurs oiseaux	Anaplasmose erythrocytaire bovine, canine, ovine, équine
		Theileria equi,	Equidés	Théilériose équine
		Babesia sp.,	Bovins, Chiens, Rongeurs, Renards	Piroplasmose bovine, ovine, babésiose canine
		Virus Bhanja	?	méningo encéphalites, paralysie, troubles neurologiques
		Virus de la fièvre hémorragique de Crimée Congo	Lagomorphes, Hérissons, Rongeurs, Ruminants domestiques, Porcins, Equidés	Fièvre hémorragique et arthro myalgique
Hyalomma marginatum	Europe du sud	*Rickettsia sp.,*	Cervidés, Chien? Rongeurs? Lagomorphes?	Rickettsioses
		Theileria annulata	Bovins	Theilériose bovine
		Virus de la fièvre hémorragique de Crimée Congo	Lagomorphes, Hérissons, Rongeurs, Ruminants domestiques, Porcins, Equidés	Fièvre hémorragique et arthro myalgique
Hyalomma anatolicum excavatum	Europe du sud	*Babesia sp.*	Bovins, Chiens, Rongeurs, Renards	Piroplasmose bovine, ovine, babésiose canine, babésiose humaine
	Nord de l'Afrique	*Theileria annulata*	Bovins	Theilériose bovine
		Theleiria lestoquardi,	Ovins	Theilériose caprine et ovine
		Virus de la fièvre hémorragique de Crimée Congo	Lagomorphes, Hérissons, Rongeurs, Ruminants domestiques, Porcins, Equidés	Fièvre hémorragique et arthro myalgique
Haemaphysalis punctata	Europe du sud	*Babesia sp.,*	Bovins, Chiens, Rongeurs, Renards	Piroplasmose bovine, ovine, babésiose canine, babésiose humaine
	Bassin méditerranéen	*Theileria sp.,*	Bovins, Equidés, Ovins	Théilériose bovine, ovine, équine
		Anaplasma phagocytophilum	Ruminants domestiques, chiens, chevaux, rongeurs, oiseaux	Anaplasmose erythrocytaire bovine
		Babesia major	Bovins	Piroplasmose bovine
		Bhanja virus	?	Méningoencéphalites, paralysie, troubles neurologiques
		Virus de la fièvre hémorragique de Crimée Congo	Lagomorphes, Hérissons, Rongeurs, Ruminants domestiques, Porcins, Equidés	Fièvre hémorragique et arthro myalgique
		Virus de l'encéphalite à tique (TBEV)	Rongeurs	Encéphalites

1.4.3 Les mécanismes de la transmission d'agents pathogènes

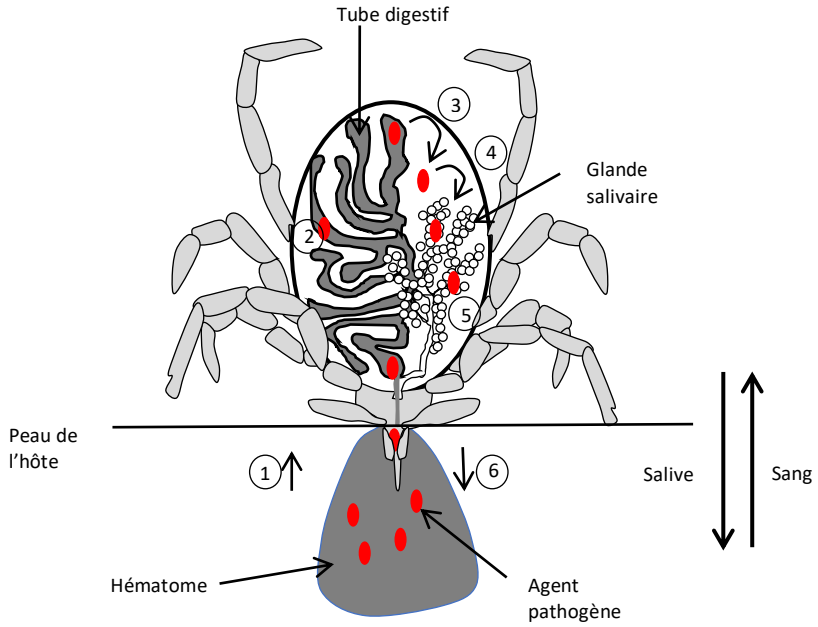


Figure 2: Représentation schématique de l'acquisition et de la transmission d'agents pathogènes par une tique. (1) Les agents pathogènes sont ingérés au cours du repas sanguin et envahissent l'intestin (2), puis en fonction des agents pathogènes, vont rester dans l'intestin ou franchir immédiatement la barrière épithéliale de l'intestin pour se disséminer dans le corps de la tique (3). Les agents pathogènes vont coloniser les glandes salivaires (4) et s'y multiplier (5) pour ensuite être à nouveau transmis lors du prochain repas sanguin via la sécrétion salivaire au site de piqure. D'après Simo et al, 2017.

Les tiques s'infectent toujours suite à un repas sanguin pris sur un hôte infecté. Les agents pathogènes prélevés au cours de ce repas vont ensuite se multiplier et/ou se transformer au sein de la tique et être transmis lors d'un nouveau repas de sang pris par la tique sur un nouvel hôte (Figure 2). Ces agents pathogènes, conservés de stade en stade et retransmis, suivent une transmission trans-stadiale. Certains de ces agents vont par ailleurs être transmis à leur descendance et générer une nouvelle génération de tiques infectées. Par exemple, les protozoaires du genre *Babesia* vont migrer, de l'intestin dans les glandes salivaires afin d'être transmis lors d'une prochaine piqûre, mais aussi dans les ovaires de la tique femelle infectant ainsi par la suite la descendance, il s'agit de la transmission trans-ovarienne.

Certains agents pathogènes vont directement envahir les glandes salivaires peu de temps après avoir colonisé l'intestin de la tique comme les parasites *Babesia* sp. [29], ou le virus de l'encéphalite à tique [30], alors que d'autres comme les bactéries *Bartonella* sp. [31, 32] et *Borrelia* spp. [33] nécessitent le stimulus du repas sanguin pour entamer leur migration de l'intestin vers les glandes salivaires. Ainsi, plus long est le temps de gorgement, plus sont importants les risques liés à la transmission d'agents pathogènes.

La transmission des bactéries par les tiques s'opère, pour la majorité d'entre elles, entre 18h et 24h après la fixation de la tique sur son hôte, pour les parasites la durée est supérieure, avec une transmission à partir de 36h, alors que pour les virus, elle intervient dès les premières minutes après la fixation [34]. Bien entendu ces durées de transmission sont dépendantes des couples agents pathogènes-espèces de tiques considérées.

1.5 Moyens de lutte contre les tiques

1.5.1 Moyens de lutte chimique

Devant l'importance des tiques en santé vétérinaire et humaine, l'usage des acaricides n'est pas récent. Il remonte au début du XIXème siècle, où ils étaient administrés en prophylaxie pour protéger le bétail de l'infestation par les tiques et étaient utilisés sous forme de bains majoritairement composés de solutions de dérivés arsenicaux. Ce fut une méthode très utilisée pendant une cinquantaine d'années, mais devant l'apparition croissante de résistances des tiques vis-à-vis de ce type de pesticides, des molécules de synthèse firent leurs apparitions dès 1946 : les organochlorées (DDT, Lindane, Toxaphène). Cette classe de pesticides, en inhibant le système GABAérgique et dans une moindre mesure le système dopaminergique, perturbe la transmission de l'information nerveuse, conduisant à terme, à la mort de neurones et donc de la tique. Comme les dérivés arsenicaux, ces molécules de synthèse ont rapidement dû être remplacées à cause de l'apparition de résistances et de leurs forts impacts négatifs sur l'environnement. A partir de 1960, d'autres molécules de synthèse, les organophosphorés (Chloropyrifos, coumaphos, diazinon, malathion, ethion, …), ont progressivement remplacé les organochlorés. Ces nouveaux composés agissent au niveau neuronal, en empêchant l'acétylcholinestérase de dégrader l'acétylcholine et donc le retour à un état basal de la cellule conduisant à la mort de cette dernière [35]. Aujourd'hui ils ne sont quasiment plus utilisés à cause des nombreuses résistances observées [36]. Pendant une période, la pyréthrine naturelle issue du chrysanthème a aussi été utilisée dans les bains pour le bétail pour son activité inhibitrice sur les canaux sodium neuronaux perturbant la communication de l'information nerveuse, mais a cependant été rapidement remplacée à cause de l'apparition de résistances et de son faible temps de vie dû à sa photo sensibilité. Des recherches ont alors abouti à la synthèse de pyréthrinoïdes plus sables (deltaméthrine, perméthrine) qui eux aussi inactivent ces canaux sodium et sont davantage exploitables pour les bains d'acaricides [37]. Ils sont encore exploités, mais d'avantage en aspersion à haute concentration sur les animaux de compagnie ou encore le

bétail plutôt qu'en bain [38]. Dans la classe des neurotoxiques, on trouve aussi le fipronil et l'amitraz qui agissent respectivement sur les systèmes GABAergique et onctopaminergique [39].

Malgré une toxicité vis-à-vis des mammifères, ces deux molécules présentent les meilleurs résultats contre la tique du chien *R. sanguineus.* Une autre classe d'inhibiteurs est ensuite apparue, ce sont les inhibiteurs de croissance (fluazuron) qui peuvent bloquer la maturation des stases les plus précoces en perturbant la synthèse de la chitine en inhibant la maturation sexuelle [40]. Enfin, des lactones macrocycliques (éprinomectine, ivermectine, moxidectine…) sont également utilisées. Elles provoquent une atteinte neuro-musculaire par l'inhibition des canaux chlorures glutamate-dépendants spécifiques des cellules neuronales et musculaires. Bien évidemment, devant l'augmentation du nombre des résistances vis à vie de l'ensemble de ces molécules, des cocktails sont parfois testés avec plus ou moins de réussite [41].

Ainsi, la contamination des productions animales (lait et viande) et environnementale combinée à l'émergence de résistances dues aux acaricides, font de ces produits des outils, certes pour certains encore efficaces, mais qui ont montré leurs limites et qui ne sont pas cohérents avec les politiques actuelles de préservation de l'environnement et des espèces non ciblées [42]. D'autres moyens de lutte sont donc envisagés même si leur mise en œuvre et leur efficacité semblent plus complexe à établir.

1.5.2 Moyens de luttes biologique

La tique possède des prédateurs naturels comme par exemple les fourmiliers, ou certaines espèces d'oiseaux. Cependant, il parait difficile de gérer correctement ces animaux dans leurs milieux afin qu'ils centrent leur alimentation exclusivement sur les tiques pour en diminuer les populations.

Les tiques sont aussi, comme d'autres espèces d'arthropodes, susceptibles d'être attaquées par des organismes parasitoïdes, dont certains sont utilisés en lutte biologique. *Ixophagus hookeri* est l'hyménoptère le plus communément retrouvé chez les tiques, et le seul à avoir fait l'objet d'études approfondies dans le cadre d'une lutte biologique. Des expériences de lâchers de grande ampleur ont malheureusement montré l'absence de persistance du parasitoïde au cours du temps, obligeant ainsi à répéter l'opération chaque année pour obtenir une efficacité du dispositif [43].

L'efficacité d'une vingtaine d'espèces de champignons entomopathogènes a été évaluée vis-à-vis de plusieurs espèces de tiques. Les résultats ont montré que la pathogénicité dépend de la stase, du temps de gorgement, de l'espèce et de la saison. *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* sont les deux espèces qui semblent être les plus pathogènes pour les tiques [44, 45]. Leurs conditions de croissance spécifique (faible exposition UV, humidité élevée), entraine cependant un coût de production élevé rendant l'utilisation de ces champignons limitée. De plus, la diffusion dans la nature de champignons entomopathogènes pose question, puisque leurs actions ne sont pas circoncises aux tiques et pourraient atteindre la faune non ciblée.

Des bactéries entomopathogènes utilisées en lutte biologique vis à vis d'autres arthropodes vecteurs comme les moustiques et appartenant au genre *Bacillus*, ont montré une certaine efficacité vis à vis de plusieurs espèces de tiques (*Dermacentor andersoni*, *R. microplus*, *Amblyomma hebraem*) [46]. Cependant, leur utilisation n'est à ce jour pas envisageable en raison de problèmes d'application à grande échelle et au vu de la biologie des tiques. De plus, les mêmes réserves que celles invoquées pour l'utilisation des champignons entomopathogènes, s'appliquent ici.

Des nématodes entomopathogènes atteignant les tiques existent mais les études démontrant leur efficacité restent encore insuffisantes et peu probantes [46].

Comme les insectes, les tiques communiquent notamment via l'émission de phéromones, et bien que les connaissances sur ces molécules chez les tiques soient très limitées, il existe quelques études montrant leur importance et leur possible utilisation dans la lutte contre ces arthropodes. En effet, combinées à des acaricides, dans le but d'attirer (rôle de la phéromone) pour mieux maitriser (rôle des acaricides), leur utilisation augmente significativement la mortalité des tiques en augmentant dans le même temps l'exposition à l'acaricide [47].

1.5.3 Moyens de lutte écologique

Les moyens de lutte écologique sont presque exclusivement basés sur la prévention dans le but de limiter le contact entre hôtes vertébrés et tiques ou en modifiant l'environnement pour le rendre inhospitalier pour les tiques. La gestion des sites de nidification, l'élimination ou la limitation de certaines espèces comme les rongeurs, peut également permettre de réduire les populations de tiques, mais ces mesures restent difficiles à mettre en place à grande échelle et

ne sont clairement pas une solution durable pour l'écosystème. En revanche, bien plus envisageable est la gestion de la végétation, de la litière, des piles de bois dans le but de diminuer les habitats propices aux différents stases de tiques et donc d'engendrer la diminution globale des populations [48]. L'édification de clôtures, en limitant l'introduction des tiques par les animaux sauvages, a aussi montré une efficacité avérée [49].

1.5.4 Moyens de lutte génétique

Les moyens de lutte génétique existent mais sont rares. Ils reposent sur des lâchers de nombreuses tiques génétiquement modifiées, qui doivent prendre le pas sur les populations sauvages. Outre les méthodes classiques de stérilisation par irradiation, il a par exemple été montré que l'extinction de l'expression de la *subolesin* par ARN interférence conduisait à la formation de mâles stériles [50]. Cependant, les difficultés liées à l'élevage des tiques en raison de leurs cycles de développement complexe et long, rendent ce moyen de lutte très difficile à mettre en œuvre. De plus, la problématique liée aux lâchers d'arthropodes OGM dans la nature n'est pas encore clarifiée à ce jour.

1.5.5 Les vaccins anti-tiques

Depuis les années 1980, la recherche d'alternatives plus durables s'est de plus en plus développée, et notamment concernant les vaccins anti-tiques [51]. En ciblant le vecteur, ces vaccins présentent le double avantage de lutter à la fois contre les tiques elles-mêmes, et contre l'ensemble des agents pathogènes potentiellement transmis simultanément. Deux grands types de vaccins contre les tiques sont développés, ceux visant des antigènes non exposés au système immunitaire de l'hôte au cours du gorgement, c'est le cas des antigènes du tube digestif, et ceux au contraire qui sont exposés aux réponses immunes de l'hôte comme les antigènes salivaires [52]. En agissant sur le processus de gorgement, les vaccins dirigés contre ces derniers présentent l'avantage d'agir à la fois sur les populations de tiques mais aussi sur l'acquisition et la transmission d'agents pathogènes. Le volume de sang ingéré étant directement lié au nombre d'œufs pondus, en réduisant significativement l'efficacité du gorgement, les femelles pondront moins d'œufs, entrainant la réduction des populations de tiques. La transmission d'agents pathogènes n'étant pas immédiate pour beaucoup d'entre eux (bactéries et parasites), bloquer rapidement le gorgement permettrait ainsi d'éviter leur transmission. De plus, l'utilisation d'antigènes présents dans la salive de la tique injectée à l'hôte au cours du gorgement permettrait de générer des rappels naturels. Enfin, un certain nombre de molécules

impliquées directement dans la transmission des agents pathogènes ou dans la modulation des réponses de l'hôte à la piqûre de la tique ont été identifiées [53] et pourraient représenter des candidats vaccin contre une telle transmission. L'étape cruciale dans le développement de vaccin anti-tiques est l'identification et la validation du caractère immunogéne et protecteur d'antigènes. Aujourd'hui, à l'heure de l'avènement des technologies de séquençage à haut débit, de plus en plus de données sont disponibles (banques d'ADNc, ESTs, transcriptomes, génomes) permettant l'identification d'antigènes d'intérêt.

Historiquement, ce sont Allen and Humpheys en 1979 qui ont démontré la faisabilité d'une vaccination pour lutter contre les tiques [54], en s'inspirant du phénomène de l'acquisition naturelle de résistance des cobayes après des piqures répétées de tique [55], phénomène également observé au laboratoire chez des lapins avec *I. ricinus*. L'immunisation de cobayes et de bovins avec des antigènes extraits d'organes de tiques femelles *Dermacentor andersoni* pré-gorgées a montré une diminution significative du nombre d'œufs pondus et du taux de gorgement des tiques [54]. De façon similaire, une protection a été également observée chez des bovins (*Bos taurus, Bos indicus*) à la suite de piqures de tiques *R. microplus*, suggérant tout comme chez *D. andersoni,* la possibilité d'identifier des antigènes protecteurs utilisables en lutte vaccinale [56].

Suite à la prometteuse réussite des immunisations réalisées avec des antigènes de tique *D. andersoni*, les recherches se sont intensifiées chez la tique *R. microplus,* notamment en Australie, avec la découverte d'un antigène protecteur exprimé à la surface de l'épithélium de l'intestin des tiques et nommé Bm86 [57]. Ces recherches ont abouti au développement de vaccins dirigés contre Bm86 au début des années 1990 [58]. S'en est suivit alors, la commercialisation en Amérique du sud et en Australie de deux vaccins ciblant cette même protéine, sous les noms de Gavac™ et Tick GARD™ [59, 60]. Ces deux vaccins sont dérivés de protéines recombinantes respectivement exprimées dans la levure *Pischia pastoris* et la bactérie *Escherichia coli*. Leur efficacité sur le gorgement et sur la fertilité des tiques est similaire [58, 61]. Néanmoins, ces vaccins présentent des contraintes importantes en termes de coût car nécessitent des rappels et sont surtout souche spécifique avec des taux de protection variables d'une région à une autre sur son espèce cible : *R. microplus*. Ces taux de protection vont de 0 à 80% selon les populations de tiques, ce qui a notamment entrainé l'arrêt de la commercialisation du vaccin Tick GARD™ en Australie il y a quelques années. Ces vaccins dirigés contre Bm86, constituent les seuls commercialisés à ce jour contre les tiques et ayant apporté des résultats concluant à travers le monde. Un homologue de Bm86, Bm95, a été

identifiée comme ayant des effets protecteurs en réduisant le taux d'infestation, l'efficacité du gorgement, l'oviposition et l'éclosion, dans les régions où Bm86 n'était pas protecteur contre *R. microplus,* mais aussi contre de nombreuses autres souches de cette tique à travers le monde, représentant ainsi un antigène plus universel que Bm86 contre cette espèce [62]. Des essais de vaccination menés avec Bm86 sur des espèces de tiques proches ou plus éloignées de *R. microplus* ont montré des taux de protection très variables mais qui peuvent être très importants dans certains cas contre *R. annulatus* [63-65].

Les recherches se sont donc tournées vers l'identification d'orthologues de Bm86 chez d'autres espèces de tiques afin d'évaluer leur pouvoir vaccinal. Pour *R. annulatus,* la vaccination contre Ba86 a montré un fort impact sur le taux d'infestation des bovins, le gorgement, l'oviposition, et l'éclosion des œufs avec 83% d'efficacité mais ici aussi de façon souche-dépendante [66]. Chez *H. anatolicum*, un autre orthologue de Bm86, Haa86, a montré une protection de 82,3% sur cette espèce et permis la réduction de la transmission de *T. annulata* chez les bovins [67]. Plus récemment, ATAQ, une protéine paralogue à Bm86, a été identifiée comme étant exprimée dans l'intestin et les tubules de Malpighi de l'ensemble des métastriata (genres *Rhipicephalus, Amblyomma, Hyalomma, Dermacentor, Haemaphysalys, Bothriocrotinae*) [68]. Bien qu'aucun essai de vaccination n'ait été encore réalisé, ATAQ apparait comme une protéine prometteuse en raison de son homologie avec Bm86 et de sa conservation au sein de plusieurs genres.

D'autres molécules vaccinales, à même de diminuer l'infestation et les populations de tiques ont été identifiées. La vaccination contre la ferritine, protéine essentielle au transport de l'hème de l'hémoglobine de l'intestin à travers l'hémolymphe, a ainsi montré un impact sur le gorgement, l'oviposition et la fertilité des tiques *I. ricinus, R. microplus* et *R. annulatus* [69, 70].

Outre la recherche d'antigènes à même d'impacter la biologie et donc les populations de tiques comme Bm86, des recherches s'orientent aussi sur des antigènes impliqués directement ou indirectement dans la transmission des agents pathogènes afin de bloquer celle-ci. La Subolesin, homologue de l'Akirin des mammifères et des insectes [71], s'est révélée être un antigène protecteur contre *I. scapularis, A. americanum, R. microplus, R. annulatus, et D. variabilis* [72]. Elle semble être impliquée dans de nombreuses voies métaboliques dont celle de l'immunité innée des tiques, et son importance dans la biologie et le développement de la tique [50, 71, 73], ainsi que dans la transmission d'agents pathogènes tels que *A. phagocytophilum, A. marginale, B. bigemina,* et *B. burgdorferi* [74-76], font de cette protéine

un candidat vaccin idéal. De récents essais dans lesquels sont combinés la vaccination avec la subolesin et l'extinction du gène ont montré des résultats encourageants chez *R. microplus* [75, 77].

Des essais de vaccination utilisant la molécule du cément 64TRP de *R. appendiculatus* ont montré une efficacité croisée contre plusieurs espèces de tiques [78, 79], et contre la transmission du Virus de l'Encéphalite à Tique (TBEv) par *I. ricinus* [80]. Les serpines, protéines essentielles à la biologie des tiques car impliquées dans un nombre important de processus comme la modulation de la coagulation sanguine, la digestion du sang, la régulation de l'inflammation, ou l'immunité des tiques constituent elles aussi d'intéressants candidats vaccinaux [81]. Des essais chez *Haemaphysalis* sp. et *Rhipicephalus* sp. combinant plusieurs serpines ont montré une réduction du taux de gorgement et une augmentation de la mortalité chez ces tiques [82, 83], ainsi qu'une augmentation de la mortalité des tiques infestées par *Theileria parva* [84].

Chez *I. scapularis,* l'inhibition de TROSPA, récepteur intestinal du ligand bactérien OspA de *B. burgdorferi* [85], par des anticorps ou *via* ARNi a montré une diminution de l'adhérence des bactéries à la paroi intestinale des tiques, réduisant leur infection et potentiellement la transmission [85]. Chez cette même espèce de tique, des anticorps dirigés contre le récepteur salivaire de la bactérie, Salp15, ont aussi montré un effet protecteur pour des souris [86]. L'immunisation de souris contre Salp25D a montré une diminution de la capacité des tiques *I. scapularis* à acquérir la bactérie *B. burgdorferi* sur des souris infectées [87]. A l'inverse, une immunisation contre des tHRF a montré une diminution de la transmission de cette bactérie par ces tiques à des souris saines [88]. Un résultat similaire a été récemment obtenu suite à une immunisation de souris avec TSLPI (Tick Salivary Lectin Pathway Inhibitor) en protégeant notamment les bactéries contre l'action du complément [89]. Ces essais vaccinaux qui ont démontré que la transmission n'était pas complétement inhibée suggèrent l'utilisation d'une combinaison de molécules dans l'élaboration de vaccins afin de bloquer totalement la transmission de cette bactérie à l'hôte [90].

Enfin, les tiques hébergent elles aussi un microbiote qui leur est essentiel et qui participe à l'infection et à la transmission d'agents pathogènes par ces vecteurs [91-93]. La manipulation de ce microenvironnement bactérien par le biais d'une vaccination, pourrait ainsi affecter la

compétence vectorielle des tiques et réduire les risques de transmission d'agents pathogènes tout en diminuant leur capacité de gorgement.

A l'exception de Bm86 (pour certaines populations de tiques), aucun antigène de tique n'a, à ce jour, démontré une efficacité totale contre le gorgement des tiques ou la transmission d'agents pathogènes. Ainsi, la mise en place d'une vaccination efficace nécessiterait probablement l'utilisation de plusieurs antigènes responsables d'un blocage partiel du gorgement et/ou de la transmission d'agents pathogènes dans un vaccin « cocktail ». En effet, les protéines de tiques ont des fonctions très souvent redondantes, comme démontré pour la modulation de la coagulation sanguine par exemple [94], et l'utilisation d'un vaccin combinant plusieures protéines pourrait palier à ce phénomène. De plus, de tels vaccins, en utilisant plusieurs antigènes, diminueraient la possibilité de sélectionner des souches de tiques résistantes.

1.6 La tique *Ixodes ricinus*

Comme mentionné précédemment, *I. ricinus* est l'espèce de tique la plus abondante en Europe et celle qui y possède la plus large répartition géographique (Figure 3). Cette répartition est en pleine évolution ces dernières décennies avec des populations de tiques qui remontent vers le nord et que l'on trouve à des altitudes de plus en plus élevées [17, 95, 96]. Cette évolution est multifactorielle et bien que les changements climatiques soient souvent évoqués, ils ne sont pas le seul facteur en cause (voir en annexe l'article publié dans le point Vétérinaire N°385, p224-231). A cela s'ajoutent les changements socio-économiques et environnementaux qui vont, entre autres, impacter très fortement l'abondance et la disponibilité des hôtes [97]. Cette espèce de tique étant très sensible à la dessiccation, elle vit dans les endroits humides dans lesquels les températures ne sont pas trop élevées, comme par exemple les forêts de feuillus [98, 99]. En France, elle présente deux principaux pics d'activité : un au printemps et un second moins important à l'automne [25, 100].

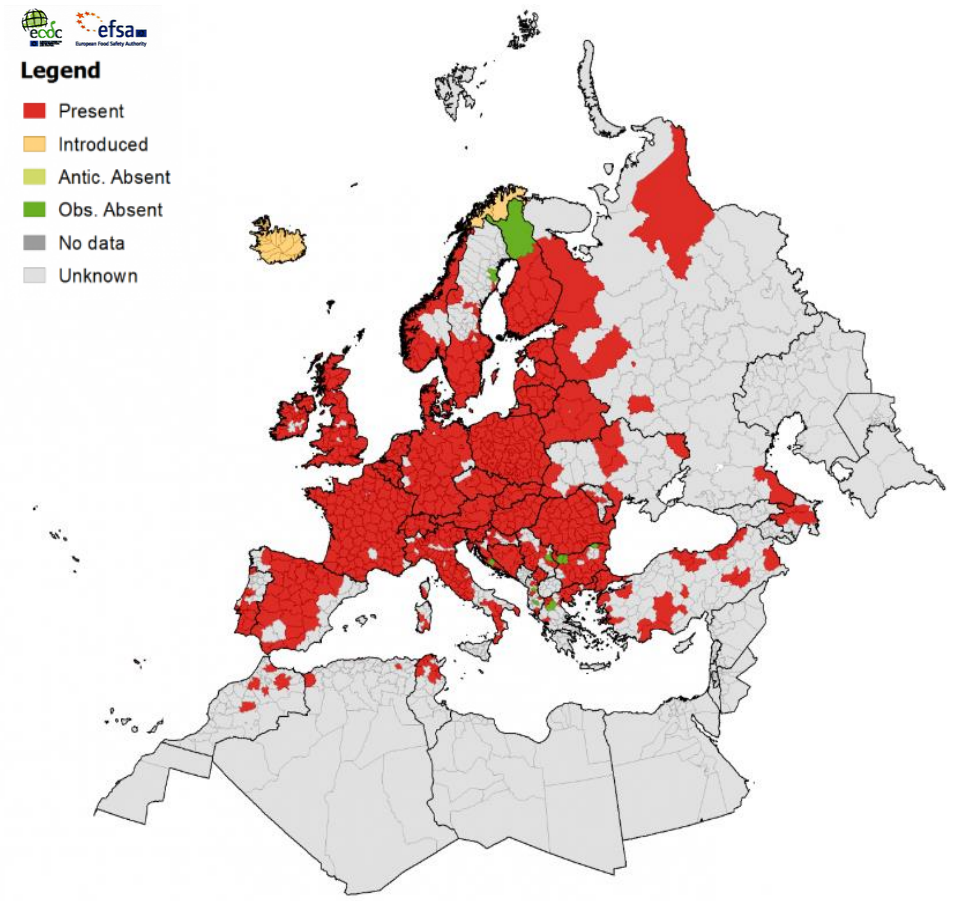


Figure 3: Carte de répartition d'I. ricinus datant de juin 2018. Source ECDC-EFSA.

1.6.1 Morphologie

Figure 4: Les différents stades évolutifs d'Ixodes ricinus*. De gauche à droite : mâle, femelle, nymphe et larve.*

I. ricinus est une tique dure de la famille des Ixodidae. Comme tous les acariens, elle possède quatre paires de pattes (sauf la larve qui n'en a que 3) (Figure 4), et contrairement aux insectes dont le corps est composé de trois segments distincts (tête, thorax et abdomen), son corps n'est pas segmenté et se compose de deux parties : l'idiosome qui porte les pattes et le capitulum (ou gnathosome) qui porte les pièces buccales. Les tiques dures, à l'opposé des tiques molles, ont leur tégument sclérifié, en plus d'avoir des pièces buccales en position apicale plutôt qu'en position ventrale (Figure 5). Ce tégument est recouvert de très nombreuses soies sensorielles (Figure 6).

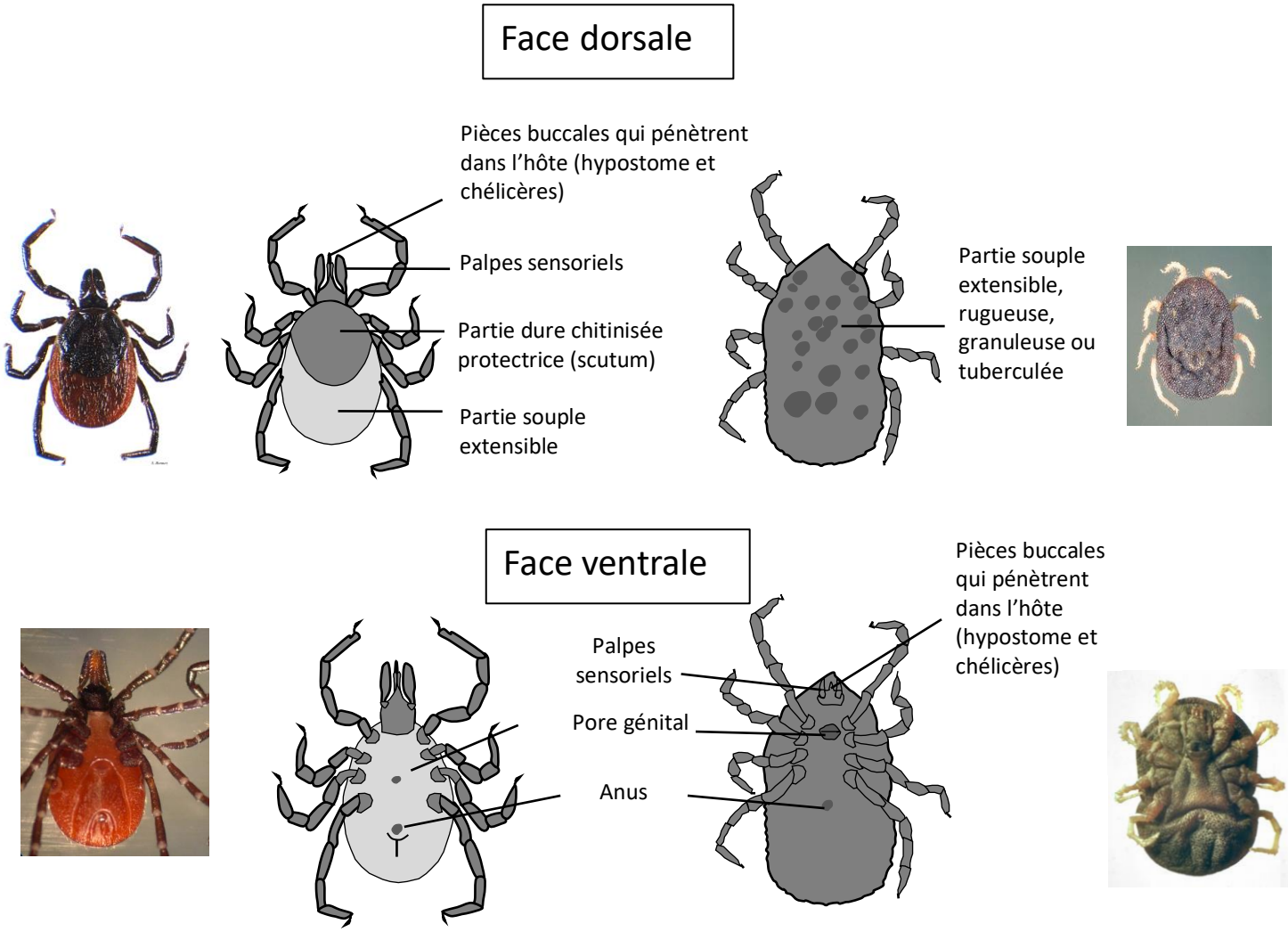


Figure 5 : Différences morphologiques entre les tiques dures et les tiques molles femelles. D'après Bonnet et Boulanger, sous presse.

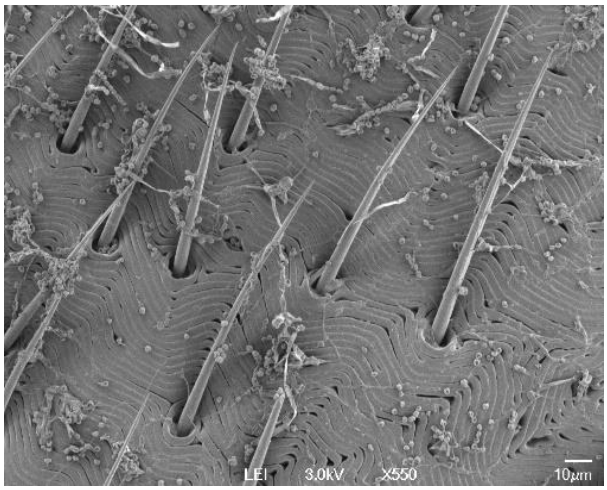


Figure 6: Tégument d'une femelle Ixodes ricinus *prise au MEB (X550) et montrant des soies sensorielles. (Photo T. Blisnick, Unité Biologie cellulaire des Trypanosomes, Institut Pasteur)*

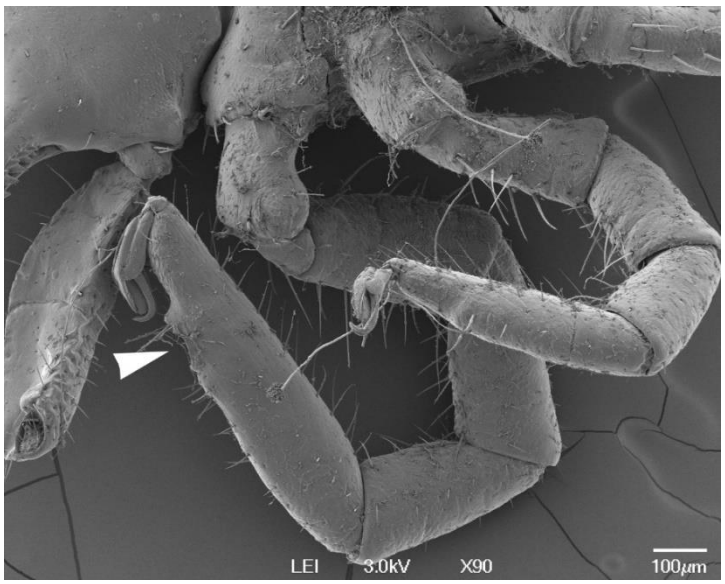


Figure 7: Face ventrale de femelle I. ricinus *au MEB (X90). La flèche désigne l'organe de Haller situé dans une petite dépression sur le côté dorsal de la première patte avant. (Photo T. Blisnick, Unité Biologie cellulaire des Trypanosomes, Institut Pasteur)*

L'idiosome représente la majeure partie du corps de la tique et se subdivise en deux sous-parties. La partie antérieure ou podosome porte les paires de pattes liées via les coxas au corps de la tique, et l'orifice génital. La partie postérieure de l'idiosome ou opisthosome, porte les stigmates et l'anus en face ventrale. Les pattes sont composées de six segments appelés podomères et ce à toutes les stases. Sur la première paire se trouve l'organe de Haller, organe sensoriel permettant à la tique de repérer la présence d'un hôte via les changements de luminosité, l'émission de CO_2 mais aussi les phéromones émises par les autres tiques (Figure7) [101, 102].

L'anus, lui, sert à excréter les métabolites digérés à partir du sang. *I. ricinus* appartenant aux prostriata son sillon anal est en forme d'arche avec un contournement par l'avant alors que chez les métastriata le sillon anal est en U avec un contournement anal par l'arrière (sauf chez les *Boophilus* spp. où le sillon est absent) [103]. Les stigmates permettent la respiration chez les nymphes, les mâles et les femelles, tandis que chez les larves la respiration est transcutanée. Du coté dorsal, l'idiosome est composé d'une partie sclérifiée appelée scutum, qui chez les femelles, les larves et les nymphes ne recouvrent que la partie antérieure, alors que chez les mâles il recouvre l'ensemble de la surface dorsale et est nommé conscutum. *I. ricinus* présente donc un dimorphisme sexuel bien marqué (Figure 4).

La partie antérieure, ou capitulum, porte les pièces buccales, qui chez les tiques dures sont en position apicale. *I. ricinus* possède des pièces buccales longues, on dit qu'elle est longirostre. Ces pièces buccales ont pour base le *basis capituli*, qui porte le rostre qui comprend les chélicères qui permettent à la tique de dilacérer les chairs de son hôte afin d'y faire pénétrer son hypostome qui ressemble très fortement à un harpon (Figure 8). Ce rostre est entouré de pédipalpes qui sont des organes sensoriels de la tique et ne pénètrent pas dans les tissus de l'hôte lors de la piqûre. Sur la partie dorsale de la *basis capituli*, les Ixodidae présentent des aires poreuses, qui secrètent une substance dont la tique enveloppe ses œufs au fur et à mesure de la ponte pour les protéger [25].

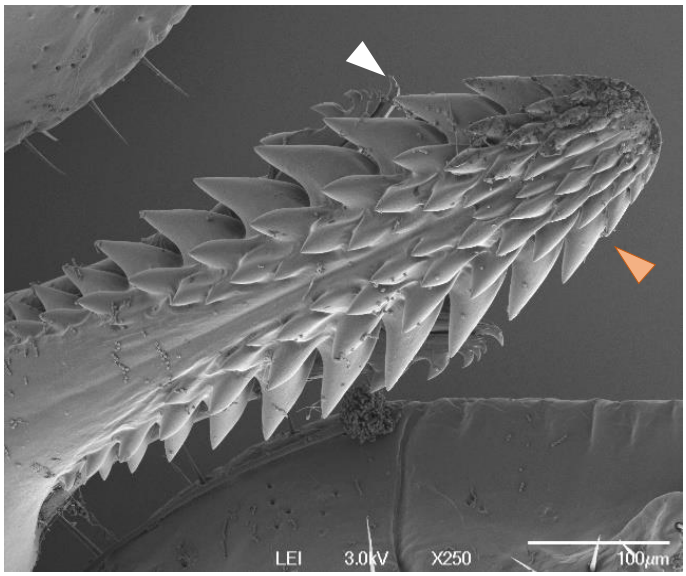


Figure 8:Vue face ventrale du rostre de femelle Ixodes ricinus au MEB (250x). La flèche blanche montre les chélicères et la flèche orange l'hypostome. (Photo T. Blisnick, Unité Biologie cellulaire des Trypanosomes, Institut Pasteur)

1.6.2 Anatomie d'*I. ricinus*

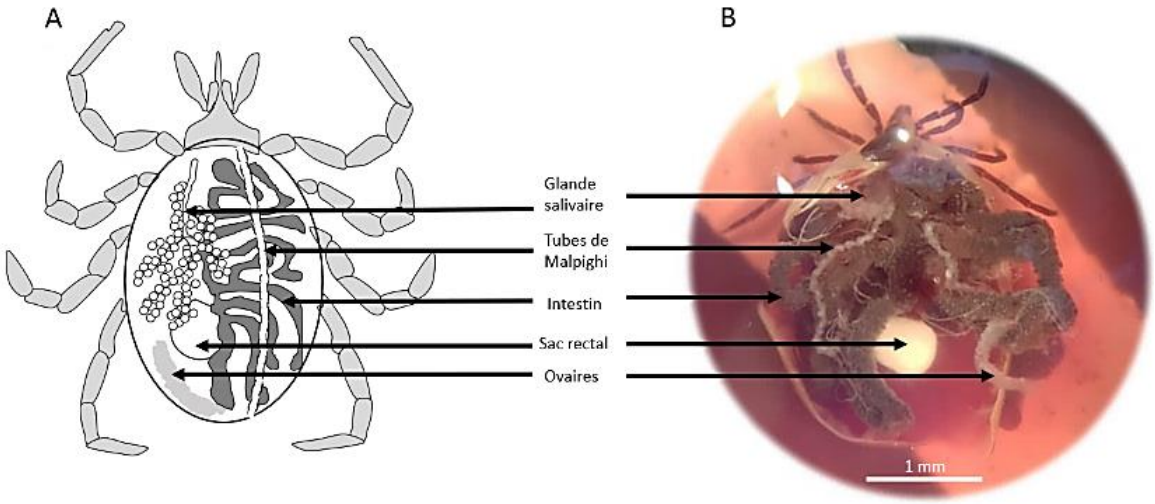


Figure 9: Anatomie générale d'une tique dure. A : représentation schématique ; B : vue au microscope d'une tique I. ricinus femelle après dissection.

1.6.2.1 L'appareil circulatoire et l'hémolymphe

Les tiques possèdent un système circulatoire ouvert dans lequel circule l'hémolymphe qui contient les cellules de l'immunité, les hémocytes. C'est dans ce fluide que baigne l'ensemble des organes. Sa circulation dans le corps de la tique est assurée grâce à un système circulatoire rudimentaire qui s'apparente à une pompe cardiaque située coté dorsal avec des sinus péricardiaques, une aorte, des vaisseaux et des muscles. Cet ensemble cardiaque est en réalité formé d'un tube allongé surmonté de sinus péricardiques et entourés de muscles qui vont assurer l'effet pulsatile afin de créer un mouvement circulatoire pour que l'hémolymphe puisse irriguer l'ensemble des organes de la tique [25]. L'hémolymphe circulante permet, en plus de maintenir les organes de la tique en homéostase, de défendre cet arthropode des menaces que représentent les micro-organismes pathogènes via l'action des hémocytes en tant que cellules de l'immunité innée (équivalent des macrophages chez les vertébrés) [104], également capables de synthétiser nombre de molécules de défense telles des peptides anti microbiens comme les défensines, ou les lectines [105].

1.6.2.2 Le système respiratoire

Le système respiratoire des tiques est commun à toutes les espèces connues, mais n'est présent que chez les stases nymphales et adultes et absent chez les larves. Ce système est constitué d'une paire de stigmates placés ventro-latéralement juste en dessous de la dernière paire de pattes. Ces stigmates sont percés de nombreux petits orifices reliés au réseau trachéolaire qui est ramifié et joint tous les organes. Les échanges gazeux se font donc au niveau des stigmates et des trachées.

1.6.2.3 Les tubules de Malpighi

Chez les tiques, les tubules de Malpighi, sont présents en double, formant une paire (Figure 9). Ils lient le sac rectal et sont composés du même épithélium que celui-ci. Un peu à la manière d'un rein chez l'homme, ces tubules participent à la détoxification en collectant, et en transportant les déchets dans le sac rectal d'où ils sont ensuite éliminés [25].

1.6.2.4 Le système nerveux

Les tiques, à la différence des insectes, n'ont pas de chaine ganglionnaire, le système nerveux chez cet arthropode n'étant composé que d'un ganglion cérébral, ou synganglion [106]. Cet organe est subdivisé en deux parties distinctes à cause de l'œsophage qui le traverse, et définit ainsi la zone supra- et sub-oesophagiale. Le synganglion est composé de plusieurs zones qui semblent remplir des fonctions différentes. On trouve dans un premier temps le cortex, puis dans la région supra-oesophagiale de nombreuses protrusions qui innervent des organes tels que les chélicères, les palpes, les glandes salivaires, le pharynx, l'œsophage et les yeux, alors que la région sub-oesophagiale comporte les ganglions nerveux innervant les pattes et autres organes internes, et enfin un lobe sensoriel qui serait en lien avec les organes de Haller.

1.6.2.5 Les glandes salivaires

Comme chez l'ensemble des tiques, les glandes salivaires de *I. ricinus* sont présentes en position antéro-latérale et par paire (Figure 9 et 10). Elles ressemblent à des grappes, car sont constituées de clusters de structures alvéolaires appelées acini. Les acini d'un même cluster sont liés les uns aux autres par des canaux qui déversent leurs contenus dans un même canal salivaire, le salivarum. Lors de la phase de gorgement, les glandes salivaires, innervées par le synganglion [107], voient leur taille considérablement augmenter afin de produire la quantité de salive nécessaire tout au long du repas sanguin [108]. Elles vont ensuite peu à peu dégénérer pour laisser la place, chez les femelles, aux ovaires dont la taille devient très importante [108].

L'organisation des glandes salivaires chez les *Ixodidae* est plus complexe que chez les *Argasidae* qui ne comptent que deux types d'acini (type I et type II) [25]. En effet chez *I.*

ricinus, quatre types d'acini sont retrouvés. Les acini agranulaires (acini de type I) en nombre restreints, sont concentrés dans la partie antérieure de la glande, sur le canal salivaire et les ramifications principales, et sont composés de quatre types cellulaires différents. Ces acini permettent aux tiques, par la synthèse de composés hygroscopiques, de prélever l'eau présente dans l'atmosphère [109]. Ils sont également impliqués dans la synthèse des composants du cément qui permet à la tique de solidifier le point d'attache sur son hôte. Les acini granulaires (Type II, III et IV), bien plus nombreux, occupent les ramifications secondaires plus étroites et sont liés par un canal lobulaire aux ramifications. Les acini de type IV n'existent que chez les males. Les acini de type II, composés de six types cellulaires différents, sont impliqués dans la sécrétion du cément et de la salive lors du repas sanguin [109]. Enfin, les acini de type III, ne se composent que de trois types cellulaires et sont eux aussi acteurs dans la synthèse du cément et l'homéostasie hydrique et ionique de la tique en participant activement à éliminer les excédents d'eau et de sels acquis lors du repas sanguin ; c'est ce qu'on appelle la transsudation post prandiale qui chez les tiques molles se fait via les glandes coxales et non pas comme ici *via* les glandes salivaires [25].

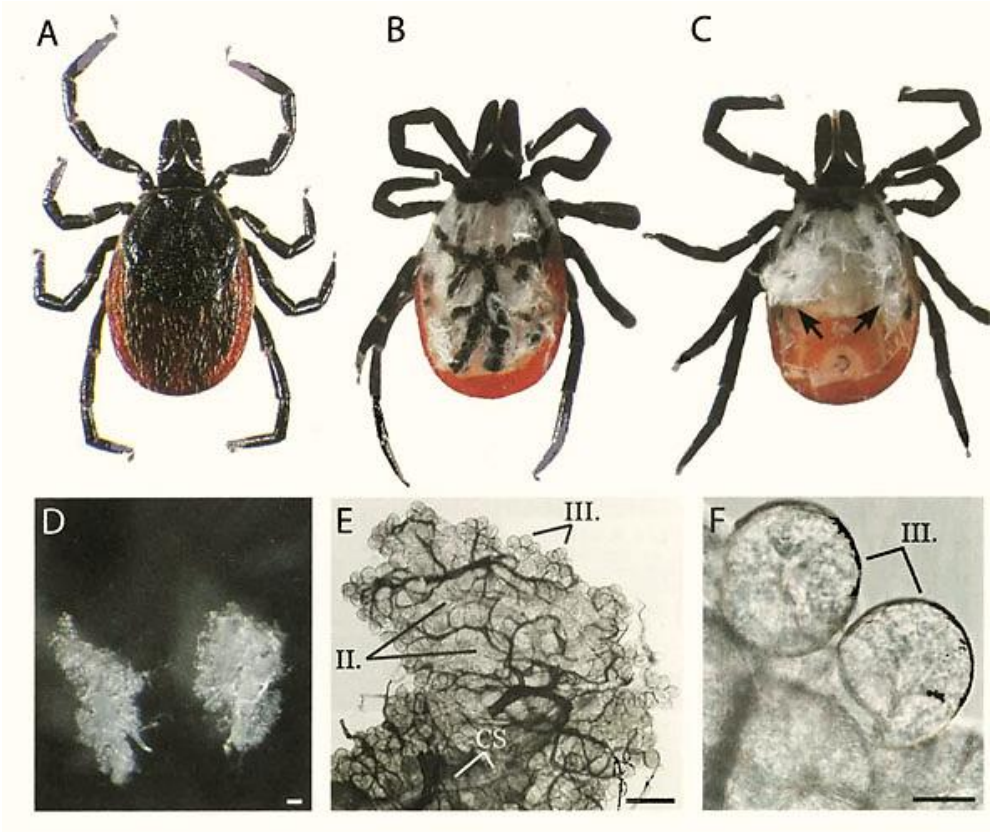


Figure 10: Anatomie et position des glandes salivaires chez la tique I. ricinus*. A :* Ixodes ricinus *femelle. B : vue de la tique après excision de la cuticule dorsale, C : vue après ablation du tube digestif, des ovaires et des trachées (lesflèches montrent les glandes salivaires qui apparaissent blanches et translucides), D : Glandes salivaires après extraction du corps de la tique. E : Glande salivaire vue microscope, CS : conduit salivaire. II : acini type II. III acini type III. F : acini type III vus au microscope. Figure tirée du chapitre n°6 du livre Tiques et maladies à tiques [110].*

1.6.2.6 Le système digestif

Chez les tiques, après le canal pré-oral, l'appareil digestif est divisé en trois parties, avec dans la partie la plus antérieure l'intestin antérieur, puis l'intestin médian et finalement l'intestin postérieur (Figure 9). Les tiques effectuent plusieurs repas sanguins au cours de leur cycle, durant lesquels elles vont ingérer le sang de leur hôte, tout en injectant de la salive à l'endroit de la piqure de manière alternative, et ceci par le même canal. De puissants muscles pharyngés permettent l'influx sanguin dans la tique. Le sang arrive dans l'intestin médian, qui est composé d'un estomac duquel des diverticules se déploient et dans lesquels sera stocké le bol alimentaire pour une digestion ultérieure. Chez les tiques, contrairement aux moustiques par exemple, la digestion du sang s'effectue à l'intérieur des cellules épithéliales et non dans la lumière intestinale [111]. La grande quantité de sang absorbé par les tiques, jusqu'à plus de 100 fois leurs poids à jeun pour certaines espèces, les oblige à réguler l'apport de fluide en concentrant leur bol alimentaire, pour conserver les éléments essentiels et évacuer l'eau et les composés ioniques en excès. Cette transsudation post prandiale, déjà évoquée, se fait chez les tiques dures, *via* les glandes salivaires dans la plaie de l'hôte. Ainsi, des éléments de l'hôte vertébré vont, au cours du repas, passer de l'intestin aux glandes salivaires pour être réinjectés à l'hôte. C'est l'existence de ce trajet qui permet d'envisager des stratégies vaccinales contre les tiques visant des antigènes des glandes salivaires. Les déchets produits lors de la digestion sont quant à eux transportés dans le sac rectal pour être ensuite évacués par l'anus. Les tiques peuvent digérer leur repas de sang durant des mois et vivre plusieurs années sur ces réserves [111].

1.6.2.7 Le système reproducteur

La tique *I. ricinus* possède une reproduction sexuée, et la fécondation a lieu soit dans le milieu extérieur avant le repas sanguin de la femelle, soit sur l'hôte au cours de celui-ci [25]. La rencontre mâles et femelles est notamment permise grâce à l'émission et la reconnaissance de phéromones [112]. Les tiques males possèdent un système reproducteur qui comporte une paire de testicules tubulaires, la *vasa deferentia*, la vésicule séminale, un canal efférent et une glande accessoire. Chez les femelles *Ixodidae*, l'appareil reproducteur n'est composé que d'un seul ovaire en forme de grappe qui se prolonge par deux oviductes qui se rejoignent pour déboucher dans le vagin (Figure 9). Ce dernier débouche, du côté interne, dans le réceptacle séminal utilisé par la femelle pour stocker les spermatozoïdes du mâle, et coté externe sur le pore génital situé à hauteur des coxas portant la 4ème paire de pattes. Lors de l'accouplement le mâle introduit son rostre dans le pore génital de la femelle pour y déposer son spermatophore. La maturation des spermatozoïdes aura lieu dans les voies génitales de la femelle [113] . Une fois fécondée et le gorgement achevé, la femelle va pondre un nombre conséquent d'œufs qui va dépendre

notamment du volume de sang ingéré au cours du repas de sang, en une masse unique, et sur une durée de 5 à 20 jours [113]. Lors de l'expulsion des œufs, l'organe de Géné qui comporte une protrusion externe permet le dépôt d'une substance protectrice sur les œufs qui, additionné à celle secrétée par les aires poreuses, va protéger les œufs afin qu'ils résistent aux contraintes exercées par le milieu extérieur jusqu'à leur éclosion [114]. Chez *I. ricinus*, l'embryogénèse va alors ensuite durer environ 1 mois avant l'éclosion des larves.

1.6.3 Le cycle de développement d'*I. ricinus*

1.6.3.1 Les stades de développement

Comme toutes les tiques dures, *I. ricinus* ne prend qu'un repas sanguin par stase pour se métamorphoser dans la stase suivante. Chaque stase va prendre un repas sanguin sur un hôte vertébré pour, au sol, se métamorphoser en nymphe pour la larve et en adulte mâle ou femelle pour la nymphe [25]. La femelle, quant à elle, pondra ses œufs après son repas et la fécondation, puis mourra. La larve se caractérise, outre par sa petite taille, par l'absence d'une quatrième paire de patte présente chez les nymphes et les adultes. La nymphe se différencie de la femelle par l'absence de pore génital. Comme chez toutes les tiques dures le dimorphisme sexuel est marqué chez *I. ricinus* avec chez les males l'absence de pore génital et un tégument sclarifié qui recouvre l'ensemble du corps (Figure 4).

1.6.3.2 Phases libres et parasitaires

La vie des tiques est rythmée par l'alternance de phases de vie « libres » dans leurs habitats naturels et de phases parasitaires au cours desquelles elles prennent leurs repas de sang sur leurs hôtes vertébrés. Chez les tiques dures, trois grands types de cycles de vie ont été identifiés. Suivant le nombre d'hôtes on distingue, les cycles dits monophasiques, diphasiques et triphasiques, et *I. ricinus* possède un cycle à la fois triphasique et trixène [115]. Cette dernière notion implique que les hôtes sur lesquels chacun des stades se nourrit appartient en général à une espèce de vertébré différente (Figure 11). Dans la nature, les larves *I. ricinus* se gorgent pendant environ 2 à 3 jours, les nymphes environ 5 à 6 jours et les femelles pendant environ 8 à 10 jours. Chez *I. ricinus*, le male ne se gorge pas. Une fois leur repas de sang effectué, chaque stase se laisse tomber au sol pour muer dans le stade suivant qui se remettra en quête d'un nouvel hôte.

A l'opposé des tiques molles (endophiles), la majorité des tiques dures dont *I. ricinus*, vivent dans des habitats ouverts à semi ouvert à la recherche de leurs hôtes, et sont donc qualifiées d'exophiles. Tous les stades d'*I. ricinus* sont exophiles et chassent à l'affut, c'est à dire qu'ils attendent sur la végétation que leurs hôtes passent pour s'y agripper. Néanmoins, très sensible à la dessiccation, elle est régulièrement obligée de redescendre dans la litière pour « recharger » ses batteries en eau.

La durée du cycle dépend d'une combinaison de paramètres dont les plus importants sont météorologiques (hygrométrie et température) mais concernent aussi la disponibilité des hôtes sur lesquels les tiques se gorgent. En effet la rareté des hôtes et des conditions environnementales défavorables vont contribuer à augmenter la durée du cycle biologique [25]. Les tiques passent ainsi la majorité de leur vie au sol en état de diapause, qu'elle soit développementale (métamorphose, ponte, incubation des œufs) ou comportementale (en l'absence de conditions favorables pour la recherche d'un hôte). Le cycle de vie d'*I. ricinus* dure en moyenne 2-3 ans dans la nature.

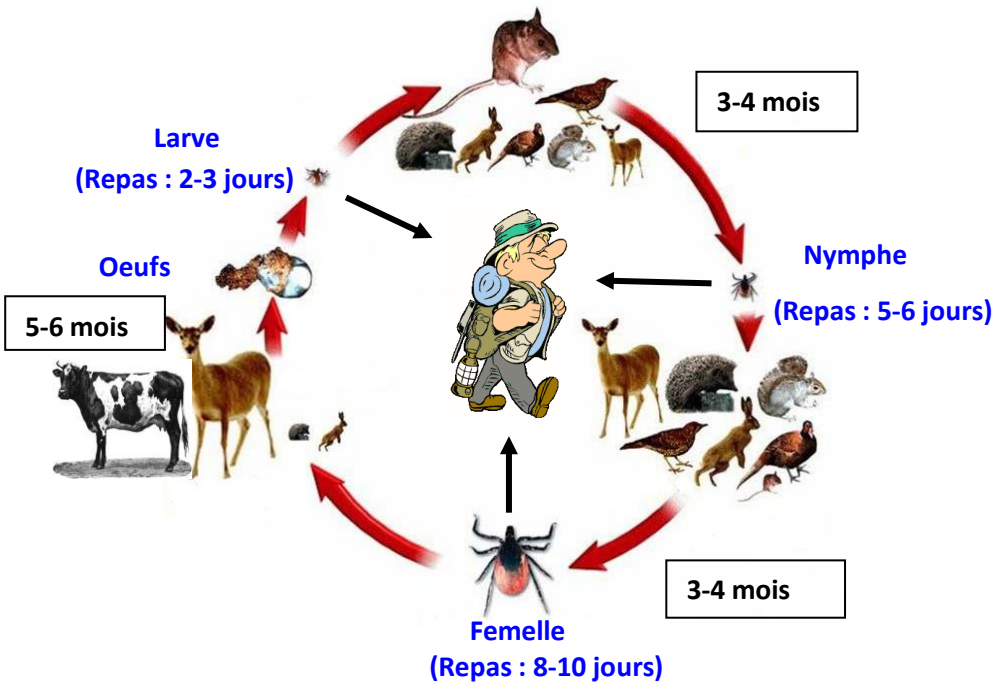


*Figure 11: Cycle de développement triphasique et trixène d'*I. ricinus*. Les larves, les nymphes et les adultes se nourrissent sur des hôtes différents. La larve va se gorger sur un animal vertébré de petite taille pendant 2-3 jours, et un fois gorgée, elle va se laisser tomber et effectuer sa mue au sol. De même la nymphe se gorgera sur un hôte vertébré de taille moyenne pendant 5-6 jours, et une fois gorgée se laissera tomber pour muer au sol et se transformer en adultes mâles ou femelles. Ces adultes s'accoupleront afin que la femelle puisse prendre un repas sanguin conséquent pendant 8-10 jours. Une fois gorgée, elle tombera au sol pour pondre ses œufs. Les encarts noirs indiquent le temps de mue entre les stades. Schéma adapté d'après J. Gray.*

1.6.3.3 Notion de préférences trophiques

La notion de préférences trophiques concerne les espèces animales sur lesquelles les tiques vont préférentiellement se gorger. Ces préférences sont assez marquées notamment chez les tiques du genre Argasidae pour certaines espèces nidicoles comme *Ornithodoros moubata* qui se gorge de manière assez stricte sur les suidès, ou bien chez les Ixodidae, comme *Ixodes arboricola,* qui elle se gorge sur les petits rongeurs et les mésanges charbonnières [116]. A l'opposé, certaines tiques sont dites opportunistes ou non spécialisées avec un spectre d'hôtes large voire très large. C'est le cas d'*I. ricinus* capable de se nourrir sur plus de 300 espèces animales différentes, incluant l'homme. Les larves se gorgent principalement sur de petits vertébrés (rongeurs principalement), les nymphes sur des vertébrés de taille moyenne (lagomorphes, oiseaux), et les femelles sur des vertébrés de grandes tailles comme les cervidés ou les bovins.

Outre qu'elle est dépendante de l'espèce, cette préférence trophique est également dépendante de la stase considérée. En effet, de la sensibilité des stades à la dessiccation va dépendre la hauteur à laquelle elles sont à l'affut sur la végétation et donc les hôtes rencontrés. La larve, plus fragile, montera moins haut dans la végétation pour guetter l'arrivée de son hôte en comparaison d'une adulte, et se retrouvera dans la majorité des cas à parasiter des petits mammifères alors que les adultes pourront, elles, se nourrir sur de plus grands animaux. De même, la longueur de l'hypostome de la stase considérée va aussi jouer sur l'épaisseur de la peau de l'hôte que la tique va devoir traverser et donc sur le choix de celui-ci. Enfin, la quantité de sang disponible chez un hôte (et donc sa taille) va aussi être déterminante en raison des grandes quantités de sang prélevées par la tique, notamment le stade femelle.

1.6.4 Les principaux agents pathogènes transmis par la tique I*xodes ricinus*

I. ricinus est l'espèce de tique la plus importante en Europe, de par son abondance, sa large répartition et le nombre d'agents pathogènes qu'elle peut transmettre à l'homme ou à l'animal [26, 100]. Cette tique dure est capable de transmettre lors de ses longs repas sanguin, bactéries, virus et parasites. L'ensemble des agents pathogènes susceptibles d'être transmis par *I. ricinus* est présenté dans le tableau 1. Nous ne développerons ici que les agents ayant une réelle importance sanitaire.

1.6.4.1 Les bactéries transmises par I. ricinus

En santé humaine, les bactéries spirochètes du groupe *Borrelia burgdorferi* sensu lato représentent les agents étiologiques de la maladie vectorielle la plus importante de l'hémisphère nord : la borréliose ou maladie de Lyme [117]. Ce groupe de bactéries, composé de 20 espèces, sont transmises exclusivement par les tiques dures du genre *Ixodes* dont *I. ricinus* (Europe de l'ouest) et *I. persulcatus* (Europe de l'est) en Europe. Seules 5 espèces d'entre elles sont reconnues comme pathogènes pour l'homme ; *Borrelia burgdorferi* s.s., *Borrelia garinii, Borrelia afzelii, Borrelia spielmanii,* et *Borrelia bavariensis*. Les rongeurs et les oiseaux constituent les réservoirs principaux de ces bactéries. Les cas sont peu documentés chez les animaux, mais les chiens semblent être assez touchés par l'infection et développent de la fièvre, des arthrites et dans les cas les plus graves des atteintes rénales [118]. Chez l'homme, l'infection se manifeste dans 50 à 80% des cas par l'apparition d'un érythème migrant autour du site de piqure de la tique. Si elle n'est pas traitée, cette infection peut évoluer en arthrite avec des douleurs articulaires importantes, générer une atteinte du système nerveux (neuroborréliose), ou engendrer des manifestations cutanées tardives, associées à une fatigue chronique [119]. La diversité des symptômes liés à la maladie rend son diagnostic difficile, d'autant que les techniques de diagnostic biologiques actuelles ne sont basées que sur la détection d'anticorps (ELISA et western blot).

La bactérie à gram négatif, *Bartonella henselae*, bien que transmise de chat à chat par les puces, est également susceptible d'être transmise par *I. ricinus* lors de son repas sanguin [31]. Cette bactérie qui infecte les globules rouges, est responsable, chez l'homme, de la maladie des griffes du chat [120]. La bactérie présente dans les déjections des puces infectées hébergées par le chat, infecte généralement l'homme par voie cutanée lors de griffures. Réservoir de la bactérie, le chat ne présente en général pas de signes cliniques quand, chez l'homme, l'infection se manifeste tout d'abord par des rougeurs ou de petites lésions cutanées en forme de papules qui se transforment en vésicule et éventuellement en ulcère. Associée à des syndromes pseudo grippaux, une adénopathie est ensuite observée entre 2 et 4 semaines après la contamination. Des complications cardiaques, nerveuses ou oculaires, rares mais possibles, peuvent ensuite apparaître avec des troubles cognitifs et moteurs [121, 122].

D'un point de vue santé vétérinaire, les bactéries qui nuisent le plus aux animaux de rente appartiennent au genre *Anaplasma sp* et sont responsables de l'anaplasmose granulocytaire bovine et ovine. *A. phagocytophilum* est par ailleurs responsable d'infections chez l'homme et de l'anaplasmose granulocytaire humaine.

De nombreux animaux sauvages sont réservoirs de ces bactéries dont les cervidés et les rongeurs. Souvent asymptomatique, l'infection peut induire chez les animaux une forte fièvre accompagnée d'une diminution de la production laitière, d'une anorexie et d'un risque d'avortement chez les femelles gestantes [123]. Chez les humains, les patients infectés déclarent un syndrome pseudo grippal accompagné d'hyperthermie, de malaises et de symptômes gastro-intestinaux, avec parfois des manifestations hématologiques comme la leucopénie et l'anémie [124]. Il n'est pas rare que cette maladie entraine une hospitalisation (36% des cas) avec de rares cas mortels (0.6% des cas) [125].

Francisella tularensis est une bactérie zoonotique à gram négatif responsable de la tularémie, qui est retrouvée majoritairement chez les lagomorphes (lapins, lièvres), les rongeurs et les oiseaux galliformes qui en sont les réservoirs [126]. De nombreuses voies de transmission existent dont la piqûre d'une tique infectée (environ 20% des cas en Europe). Cette maladie peut, dans sa forme la plus sévère, provoquer un syndrome pseudo-grippal brutal, associant des signes gastro intestinaux à des céphalées, puis évoluer vers une septicémie avec des marqueurs hématologiques tels que des thromboses ou à l'inverse des hémorragies. La forme ulcéro-ganglionnaire est la forme la plus couramment observée. Deux biovars existent : le biovar *tularensis* américain, le plus virulent (taux de mortalité de 5%), et le biovar *holartica* eurasien (0,1% de mortalité). Les décès sont en général dus à des complications pulmonaires [126].

I. ricinus est également à même de transmettre une autre espèce de bactérie gram négatif intracellulaire obligatoire et zoonotique, *Rickettsia helvetica,* dont les réservoirs sont les cervidés [127]. Chez l'homme, cette bactérie provoque des éruptions cutanées et un syndrome fébrile commun aux rickettsioses mais sans escarres d'inoculation. Des infections du myocarde et du péricarde pouvant entrainer la mort chez des patients dont le système immunitaire est fragile ont par ailleurs été rapportés [128].

Enfin, la bactérie à gram négatif *Coxiella burnetti* responsable de la fièvre Q peut être vectorisée par *I. ricinus* même si ce n'est pas son mode de dissémination préférentiel. Ce bacille est strictement intracellulaire et cible les monocytes/macrophages dans lesquels il niche dans le phagolysosome et s'y multiplie, échappant ainsi à tout traitement antibiotique [129]. Cette bactérie est dans 60% des cas responsable d'infections asymptomatiques chez l'homme mais peut se manifester, chez certains patients, sous la forme d'un syndrome pseudo-grippal, associé à des céphalées intenses, des myalgies, des arthralgies et de la toux. La guérison est en général spontanée mais de rares cas de complications (endocardites, méningites, encéphalites…) ont été rapportés [130]. Dans la forme chronique, une endocardite mortelle peut se déclarer en

l'absence de traitement chez les sujets à risques (femmes enceintes, anomalies vasculaires ou valvulaires, immunodépression) [131].

1.6.4.2 Les parasites transmis par I. ricinus

Outre des bactéries, *I. ricinus* peut transmettre des parasites appartenant au genre *Babesia (Babesia venatorum et Babesia divergens*), qui sont des protozoaires apicomplexa proches de *Plasmodium sp.*, agent du paludisme transmis par des Anophèles. *B. divergens* est responsable de la piroplasmose bovine et peut infecter l'homme. Parasite de cervidés, *B. venatorum* peut aussi infecter l'homme. Ces parasites ont, chez leur vecteur tique, une transmission transovarienne [132]. Etant intra erythrocytaires, ils génèrent chez l'hôte infecté des syndromes hémolytiques concomitant avec une forte anémie, l'émission d'urines rouges, une forte fièvre, des céphalées et myalgies, des douleurs abdominales et un ictère orangé. L'hémoglobinémie importante provoque alors des graves problèmes rénaux avec des complications pulmonaires (œdème pulmonaire). Chez le bétail, on observe alors une chute de la production laitière et un amaigrissement chez les animaux infectés, entrainant de lourdes pertes économiques pour les éleveurs [133]. Chez l'homme, la maladie est en général asymptomatique mais elle peut être mortelle pour des individus immunodéprimés ou splénectomisés, avec une fièvre élevée, une anémie hémolytique, une hémoglobinurie, un ictère et une insuffisance rénale [134].

1.6.4.3 Les virus transmis par I. ricinus

I. ricinus peut aussi transmettre des virus dont la majorité appartient à la famille des *flaviviridae* tels que le virus de l'Encéphalite à tique (TBEV) ou encore le virus du Louping Ill (LIV).

Concernant TBEV, la gravité de la maladie va dépendre du sous-type de virus concerné. Trois sous-types existent : extrême-oriental et sibérien transmis par *I. persulcatus* et européen transmis par *I. ricinus*. Les deux derniers sont les moins virulents (entre 0,5 et 3% de mortalité) quand le sous type extrême-oriental peut provoquer 35% de mortalité [135]. L'infection peut être asymptomatique, mais après une période d'incubation d'environ 1 mois, des symptômes peuvent apparaître avec une forte fièvre, des céphalées, de la fatigue, des myalgies, des nausées et des vomissements, une sensibilité importante à la lumière, et des troubles visuels et sensoriels importants. Les cas graves sont associés à des signes neurologiques avec parésies, paralysies, convulsions et comas.

Le virus Louping Ill infecte principalement les ovins et très rarement l'homme. Lors d'une infection par le virus, les ovins développent des symptômes allant de la légère paralysie avec des tremblements musculaires, des incoordinations, et de l'ataxie, à la mort subite [136]. Rare chez l'homme, l'infection par ce virus se caractérise par un syndrome fébrile avec des céphalées

peu intenses qui peuvent se compliquer avec une augmentation de la fièvre, et l'apparition de signes neurologiques évidents, similaires à ceux retrouvées chez les animaux [137].

1.7 La piqure de tique et l'importance de la salive

1.7.1 Mécanismes de la piqure

Dès lors que la tique est sur son hôte, elle se met à la recherche des zones les plus favorables pour pouvoir piquer. En général, il s'agit de zones où la peau est la plus fine, l'humidité importante, et qui sont difficiles d'accès par l'hôte. Une fois la zone adéquate identifiée, la tique utilise alors ses chélicères pour perforer par cisaillement l'épiderme puis le derme de son hôte et permettre l'entrée passive de l'hypostome. La salive, par l'émission de substances cytolytiques, va participer à la dégradation des tissus et à la pénétration du rostre [109]. C'est la forme en harpon de l'hypostome, couplée à la turgescence des chélicères qui va permettre un ancrage très puissant de la tique dans son hôte. De plus, certaines espèces de tiques, dont *I. ricinus*, sécrètent le cément, fluide qui va progressivement se solidifier et agir en tant que substance adhésive, renforçant ainsi cet ancrage. Le cément servirait également à éviter les pertes de fluides au niveau du site de piqure, et faciliterait la prise du repas de sang en faisant un écran entre les pièces buccales de la tique et les cellules immunitaires de l'hôte [138]. En pénétrant la peau de son hôte par dilacération, la tique provoque des dommages tissulaires importants en rompant notamment les micro-capillaires qui irriguent le derme. Ainsi la piqûre induit la formation d'un micro hématome dans lequel la tique va alors prendre son repas qui comprendra l'ensemble des fluides présents dans ce micro-hématome, c'est pour cela qu'elle est classée parmi les arthropodes telmophages [139]. L'ingestion de sang vers l'intestin de la tique va se faire en alternance avec l'injection de salive dans le micro hématome.

Chez les tiques dures comme *I. ricinus* on distingue classiquement 3 phases dans le processus de gorgement qui dure environ 8 jours chez les femelles [140]. La première phase d'attachement dure entre quelques heures et 2 jours et comprend la phase de recherche de la zone de piqûre, la pénétration des chairs de l'hôte et l'attachement à celui-ci. La seconde phase concerne ce que l'on appelle la « phase lente » d'absorption du sang au cours de laquelle, en 5-6 jours, la tique va prendre environ un tiers de son repas de sang. Au cours de cette phase ont lieu de nombreux remaniements tissulaires notamment au niveau de l'intestin et des glandes salivaires de la tique ainsi que la synthèse des nombreuses enzymes et molécules impliquées dans la digestion du

sang, en particulier dans le traitement de l'hème des molécules d'hémoglobine [139]. Enfin, la dernière phase de gorgement est dite la phase « rapide » qui consiste en l'absorption des deux tiers du sang total prélevé par la tique en seulement 24h-36h. Une fois cette phase achevée, la tique va alors se détacher de son hôte en mettant fin à la turgescence de ses chélicères.

1.7.2 La salive de tique et son rôle dans le gorgement

Comme évoqué précédemment, la salive de tique est sécrétée au cours du repas sanguin par les glandes salivaires et, injectée à l'hôte, se retrouve à l'interface des interactions entre celui-ci et l'acarien. Au vu de la longueur des repas sanguins chez les tiques (de plusieurs minutes à heures pour les tiques molles à plusieurs jours pour les tiques dures), la salive doit donc posséder un solide arsenal moléculaire pour assurer à la tique le pouvoir de prélever la très grande quantité de sang qui lui est nécessaire, et passer inaperçue pour éviter son élimination par l'hôte pendant toute la durée du gorgement. Ainsi, la salive de tique va être à même d'empêcher la sensation de douleur liée à la piqûre, et de moduler à la fois l'angiogenèse, les réponses hémostatiques et immunes, offrant par la même occasion un environnement très propice à la transmission à l'hôte des agents pathogènes.

1.7.2.1 Modulation de la douleur chez l'hôte vertébré

La tique va, par l'action des molécules contenues dans sa salive tels que des peptides, des protéines et des métabolites, réprimer dans un premier temps la douleur liée à la piqure. Certaines des métalloprotéases salivaires hydrolysent ainsi la bradykinine relarguée à la suite du traumatisme de la piqure et impliquée dans le processus de la douleur [141, 142]. Par ailleurs, et outre la douleur, les réactions allergiques sont aussi controlées car tout comme pour la bradykinine, l'histamine est réprimée par des protéines salivaires de la famille des Lipocalines et des anti-histaminiques [143, 144]. De plus, la salive de tique contient des protéines qui inhibent l'activation des voies de synthèse de médiateurs tels que les chimiokines, et empêchent ainsi d'activer les nocicepteurs, permettant à la tique de passer inaperçue [145].

1.7.2.2 Modulation de l'angiogenèse chez l'hôte vertébré

Suite à la dilacération des tissus et la rupture des micro capillaires présents au site de piqûre, la tique inhibe la cicatrisation. Ce processus physiologique est essentiel à l'hôte lors d'une plaie, et comporte 3 phases : l'inflammation, la phase de prolifération et la phase de remodelage tissulaire. L'angiogenèse interviendrait dans la seconde phase, phase de prolifération des

cellules endothéliales, *via* le recrutement des fibroblastes et la synthèse du collagène [146, 147]. La tique, par sa salive, réprime l'angiogenèse en inhibant le recrutement cellulaire et l'adhésion des cellules endothéliales et des fibroblastes à la matrice extracellulaire [148], mais aussi l'inflammation locale. Cette salive possède des molécules se liant directement à de nombreux facteurs de croissance tels que le Transforming Growth Factor (TGF)-β1, le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), le fibroblast growth factor (FGF)-2, ou encore l'Hépatocyte Growth Factor (HGF) entrainant leur séquestration, réduisant leur disponibilité, et donc également leur effect activateur sur la prolifération cellulaire [149-151]. Plusieurs protéines de tique ont ainsi été identifiées comme responsables de cette inhibition de l'angiogenèse comme l'haemangin [152], la Troponin-I like [153] ou certaines metalloprotéases [154].

1.7.2.3 Modulation de l'hémostase chez l'hôte vertébré

L'hémostase est un ensemble de phénomènes physiologiques qui concourent à l'arrêt des saignements extra vasculaires, et inclus la coagulation plasmatique et la fibrinolyse. Dès lors qu'un endothélium vasculaire est endommagé, l'hémostase primaire se déclenche et consiste en la formation d'un clou plaquettaire à l'endroit même où la brèche vasculaire s'est formée grâce à la reconnaissance du collagène et des microfibrilles alors exposées aux les plaquettes. S'en suit alors l'activation des voies hémostatiques secondaires : voie intrinsèque, voie extrinsèque et voie commune de la coagulation pour aboutir à la formation d'un caillot de fibrine [155]. Ces voies sont décrites dans le tableau 1 de la revue bibliographique (page 49). Brièvement, la voie intrinsèque (qui ne semble pas la plus importante), ou voie de contact, est initiée par le contact du sang avec les structures sous endothéliales entrainant la formation d'un premier complexe (kininogen pré-kallikrein et facteur XII) sur le collagène, complexe qui va activer une cascade de facteurs pour aboutir à l'activation du facteur X en Xa. La voie extrinsèque, elle, s'active rapidement à la suite de dommages vasculaires suite à l'expression du facteur tissulaire (FT) dans le milieu extracellulaire. *Via* l'activation de plusieurs facteurs, celui-ci aboutira aussi à l'activation du facteur X. Ce premier facteur de la voie commune permet la formation de la thrombine à partir de la prothombine. Outre un retro contrôle positif sur plusieurs facteurs des trois voies, la thrombine va cliver le fibrinogène en fibres de fibrine qui participeront à la formation du thrombus. Dans cette cascade protéique, la majorité des protéines qui interviennent sont des sérines protéases sous leur forme zymogène (forme non activée) comme les facteurs II, VII, IX, X, XI, la pré-kallikréine et le kininogène de haut poids moléculaire.

Ainsi, une autre réaction importante à laquelle la tique doit faire face lors de son gorgement, est l'action des voies de la coagulation qui s'enclenchent très rapidement lorsque la tique pénètre la peau de son hôte. En effet, la tique doit impérativement agir à l'encontre de la coagulation sanguine afin de maintenir le sang à l'état fluide dans le micro hématome pour pouvoir l'ingérer. De nombreuses études ont permis de montrer que la majorité des inhibiteurs de la coagulation produits par les tiques ciblent le facteur X et la thrombine, sous forme zymogène comme active du fait de leur rôle central dans la coagulation et la formation de fibres de fibrine [94]. Mais bien que ces deux sérine protéases soient des cibles privilégiées, d'autres sérine protéases sont aussi inhibées par la salive de tique. Il s'agit par exemple d'inhibiteurs de la voie extrinsèque, au niveau de la formation du complexe FT/VIIa [156, 157]. Dans la voie intrinsèque, des inhibiteurs de la phase de contact [158, 159] et du complexe kallikreine-kinine [160] ont aussi été identifiés dans la salive ou les glandes salivaires de tique. De plus, P23 identifié chez *I. scapularis*, apparait être un inhibiteur de l'activation du facteur V par le facteur Xa, et augmente donc le temps de coagulation [90, 161].

La cascade de coagulation sanguine aboutissant à la formation d'un caillot de fibrine, sa résorption dépend de la lyse de ce dernier. Ce processus induit par la plasmine à partir du plasminogène, permet de rendre à l'endothélium vasculaire ses propriétés de perméabilité une fois sa reconstruction terminée, c'est la fibrinolyse. Les tiques ne se contentent pas de prévenir la formation du caillot de fibrine, elles possèdent aussi des protéines qui induisent la lyse des molécules de fibrines du caillot. En effet, certaines protéines salivaires dont la Longistatin, vont activer la formation de la plasmine qui dégrade les molécules de fibrine, rendant instable le caillot [162, 163].

1.7.2.4 Modulation des réactions immunitaires de l'hôte vertébré

En plus de lutter contre les réponses cellulaires de l'hôte visant à maintenir l'homéostasie de l'organisme, la tique doit aussi faire face aux réponses multiples du système de défense de l'organisme, le système immunitaire. En premier lieu, lors d'une infection ou d'une agression, une réponse cellulaire s'organise autour des cellules sentinelles circulantes comme les macrophages, les cellules dendritiques, les monocytes, et des cellules résidentes comme les kératinocytes. Ces cellules, par le biais de sécrétion de chémokines et de chimiokines, vont permettre l'activation du système immunitaire avec dans un premier temps un recrutement cellulaire important, puis, dans un second temps, l'activation de cellules effectrices produisant des anticorps. La salive de tique comporte un arsenal visant chaque étape de l'activation de ce

système : certaines protéines vont empêcher le recrutement et la prolifération cellulaire au site de piqure, quand d'autres empêcheront l'activation des cellules, diminueront l'inflammation ou la production de médiateurs [109, 164, 165].

Réponses immunitaires innées

Au site de piqure, la salive de tique empêche le recrutement cellulaire (macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, monocytes, lymphocytes, Mastocytes, Natural Killer (NK)…) via une modulation de l'expression de protéines d'adhésion cellulaire, participant ainsi à réduire à la fois l'action du système immunitaire inné [166] et l'inflammation [167-173]. Cette salive va également diminuer les sécrétions de chémokines (MCP-1-3, MIPs, Eotaxin, RANTES, IL-8, IP10) et chimiokines pro-inflammatoires (IFNγ, IL-6, IL-12, IL-1β, IL-2, TNF-α) par les macrophages et les neutrophiles, et promouvoir la sécrétion des cytokines anti inflammatoires (IL-10, IL-4, IL-13) [174, 175]. Bien que ces cytokines soient classifiées de la sorte, il est important de noter néanmoins que nombreuses sont celles qui peuvent jouer un rôle à la fois pro et anti-inflammatoire, on dit qu'elles sont pléiotropes. C'est le cas par exemple de l'IL-6 qui peut induire à la fois une réponse immune Th2 mais aussi une repression de l'inflammation [176].

De plus, les fonctions de phagocytose des macrophages et des neutrophiles [177-179], ainsi que la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) d'une part [177, 180, 181], et de monoxyde d'azote (NO) [182, 183] d'autre part, sont négativement affectées par la salive de tique. Les cellules NK présentent par ailleurs une cytotoxicité plus faible en présence de salive de tique [184, 185].

De manière similaire, les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles et les mastocytes voient leurs capacités d'adhésion cellulaires et d'infiltration tissulaire diminuées en présence de salive de tique [109]. Principalement chez les neutrophiles et les mastocytes, la capacité à induire une inflammation locale au site de piqure par relargage des composés pro inflammatoires stockés dans leurs granules de sécrétion, est aussi fortement restreinte en présence de salive de tique [177, 186]. Il en est de même pour l'activité de protéases qui participent à l'inflammation, comme la chymase, la tryptase, ou l'élastase et la cathepsine G, respectivement libérées par les mastocytes et les neutrophiles [187-189]. La réponse aux chémokines est, chez les éosinophiles, aussi inhibée par l'action de la salive de tique [167, 190, 191].

La salive de tique bloque également l'activation du complément, système de défense liant immunité innée et adaptative. Ce système peut être activé suivant trois voies distinctes : la voie

classique, la voie alterne, et celle des lectines, qui toutes trois résultent en la formation de deux complexes (les C3 convertases) à même de cliver C3 afin de produire C3b, forme initiatrice du complexe C5 convertase. Ce complexe va alors convertir C5 en C5b qui va se fixer sur un récepteur membranaire et recruter C6, C7, C8 et C9 pour finalement former le complexe d'attaque membranaire (CAM). La voie alterne est la principale voie activée lors d'une infection par un agent pathogène ou suite à une lésion comme la piqûre de tique. Des protéines salivaires de tique ont été identifiées comme modulant l'action du complément en inhibant la formation du complexe C3 convertase [192-194], ou alors l'activation du C5 comme pour certaines lipocalines [195, 196]. Il faut noter que l'activation de C5 provoque la formation, d'une part de C5b qui initie la formation du CAM, et d'autre part de C5a qui est l'une des anaphylatoxines les plus importante chez les vertébrés. Cette dernière est un puissant chimio attractant pour les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes et les lymphocytes T, et entraine la sécrétion de cytokines pro inflammatoires par les macrophages [197]. Un certain nombre de protéines capables d'inhiber à la fois la voie classique mais aussi la voie des lectines du complément a ainsi été identifiées chez *I. ricinus* [198].

Réponses immunitaires adaptatives

Les cellules dendritiques immatures sont, comme les autres cellules du système immunitaire, inhibées dans leur migration au site de piqure via une inhibition de l'expression de récepteurs à certaines cytokines comme CCR5 et CCR7 [199, 200]. En raison de leur rôle prépondérant dans la présentation antigénique initiant la réponse immune adaptative, elles sont également la cible de molécules salivaires de tiques comme certaines prostaglandines [201], qui répriment alors leur activation, leur différentiation, et modulent négativement l'expression de cytokines pro-inflammatoires [202].

Les lymphocytes B et T, en tant que principaux acteurs de la réponse immune adaptative, apparaissent eux aussi comme des cibles privilégiées pour les protéines de la salive de tique. En effet celle-ci promeut une diminution de l'expression de protéines d'adhésion cellulaire restreignant la migration cellulaire de ces cellules au site de piqure [203]. De plus, la salive de tique inhibe l'activation des lymphocytes [204, 205]. En présence de salive, une baisse importante de la réponse lymphocytaire à une stimulation par un agent mitogène (Concanavaline A (ConA), lipopolysaccharide (LPS)) est aussi observée indépendamment de l'espèce de tique considérée [174, 203, 206-211]. La salive de tique engendre également chez les lymphocytes la polarisation des réponses immunitaires vers la voie Th2 plutôt que Th1 ou

Th17, réduisant ainsi l'activité inflammatoire et cytotoxique des cellules immunitaires et permettant la réussite du repas de sang [206, 210, 212-217].

Le ratio de lymphocytes CD4/CD8 est augmenté *in vivo* lors de la pique de la tique par la diminution des populations de LT $CD8^+$, contribuant également à orienter la réponse immune vers la voie Th2 [218].Conséquence de cette polarisation de type Th2, une forte diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IL-12, TNFα, IFNγ) [217, 219] et une augmentation de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-6, IL-10, IL-4) [215, 217, 220] par les lymphocytes sont observées.

1.7.3 Impact sur la transmission et l'acquisition d'agents pathogènes

En créant un environnement immunodéprimé au site de piqure, la salive de tique crée *de facto* un environnement propice à l'acquisition, la transmission et le développement de l'agent pathogène chez l'hôte vertébré [221]. L'impact positif qu'exerce la salive de tique sur l'acquisition et la transmission des agents pathogènes par ces vecteurs a pris, en anglais le nom de SAT pour « Saliva-Assisted Transmission » [222]. Ce phénomène a été mis en évidence pour la première fois avec le virus Thogoto transmis par la tique *R. appendiculatus* [223]. Il a ensuite été démontré que, suite à une immunisation contre des piqûres de tiques, des tiques infectées par *B. burgdorferi* n'étaient plus capable de transmettre cette bactérie à des hôtes de laboratoire [224, 225]. Depuis, des protéines comme la subolesin [74], Salp 16 [226] ou TSLPI [89] ont été identifiées comme participant à l'acquisition par les tiques *d'A. phagocytophilum*, ou à la transmission par leur vecteur de *B. burgdorferi* [227], de *F. tularensis* [228], et du virus de l'encéphalite à tique [229].

1.8 Importance des inhibiteurs de sérine protéases chez les tiques

D'après la littérature, les inhibiteurs de sérine protéases (ISP) apparaissent comme la classe d'inhibiteur de protéases la plus représentée chez les tiques, sans doute en raison des très nombreux rôles qu'ils ont dans la biologie de ces acariens [230, 231].

Les quatre grandes familles d'ISP que sont les serpines, les alpha-macroglobulines, les protéines à domaines kazal et celles à domaines kunitz sont retrouvées chez les tiques quand de rares Trypsin-inhibitor-like (TIL) ont été identifiés. Quand les serpines et les alpha-

macroglobulines inhibent leurs enzymes cibles de façon définitive par liaison covalente en formant un complexe, les protéines à domaines kunitz et kazal inhibent le site actif par des interactions non covalentes et entrainent par conséquent une inhibition réversible. Leurs rôles chez les tiques sont multiples et ils sont indispensables dans nombre de processus biologiques. Ces inhibiteurs sont en effet impliqués dans le système immunitaire de la tique, dans le maintien de l'hémostase, dans la digestion du repas sanguin, et participent également à l'oviposition et au développement et à la maturation des œufs. Enfin, leurs rôles sont primordiaux pour la tique dans la physiologie du gorgement avec notamment une importante implication dans la modulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire innée comme adaptative de l'hôte vertébré. Ils régulent aussi négativement l'ensemble des voies de signalisation qui conduisent à la formation d'un thrombus, via les voies intrinsèque, extrinsèque et commune de la cascade de coagulation et incluant la régulation de la fibrinolyse. Par le biais de ces actions sur l'hôte vertébré, les ISP sont donc aussi indirectement impliqués dans la transmission d'agents pathogènes.

L'ensemble des rôles attribués aux inhibiteurs de sérine protéases et identifiés à ce jour, à la fois dans la physiologie de la tique et dans les interactions avec l'hôte vertébré au moment de la piqûre, est présenté dans la revue suivante publiée en 2017 dans « Frontiers in cellular and infection Microbiology ».

Revue Bibliographique

frontiers in Cellular and Infection Microbiology

REVIEW
published: 22 May 2017
doi: 10.3389/fcimb.2017.00199

Serine Protease Inhibitors in Ticks: An Overview of Their Role in Tick Biology and Tick-Borne Pathogen Transmission

Adrien A. Blisnick[1], *Thierry Foulon*[2] *and Sarah I. Bonnet*[1]*

[1] UMR BIPAR INRA-ENVA-ANSES, Maisons-Alfort, France, [2] Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Biologie Paris-Seine, Biogenèse des Signaux Peptidiques, Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, Paris, France

New tick and tick-borne pathogen control approaches that are both environmentally sustainable and which provide broad protection are urgently needed. Their development, however, will rely on a greater understanding of tick biology, tick-pathogen, and tick-host interactions. The recent advances in new generation technologies to study genomes, transcriptomes, and proteomes has resulted in a plethora of tick biomacromolecular studies. Among these, many enzyme inhibitors have been described, notably serine protease inhibitors (SPIs), whose importance in various tick biological processes is only just beginning to be fully appreciated. Among the multiple active substances secreted during tick feeding, SPIs have been shown to be directly involved in regulation of inflammation, blood clotting, wound healing, vasoconstriction and the modulation of host defense mechanisms. In light of these activities, several SPIs were examined and were experimentally confirmed to facilitate tick pathogen transmission. In addition, to prevent coagulation of the ingested blood meal within the tick alimentary canal, SPIs are also involved in blood digestion and nutrient extraction from the meal. The presence of SPIs in tick hemocytes and their involvement in tick innate immune defenses have also been demonstrated, as well as their implication in hemolymph coagulation and egg development. Considering the involvement of SPIs in multiple crucial aspects of tick-host-pathogen interactions, as well as in various aspects of the tick parasitic lifestyle, these molecules represent highly suitable and attractive targets for the development of effective tick control strategies. Here we review the current knowledge regarding this class of inhibitors in tick biology and tick-borne pathogen transmission, and their potential as targets for future tick control trials.

Keywords: ticks, tick serine protease inhibitors, tick-borne pathogens, tick–host interactions, immune responses

OPEN ACCESS

Edited by:
Brice Rotureau, Institut Pasteur, France

Reviewed by:
Catherine Ayn Brissette, University of North Dakota, United States
Melissa Jo Caimano, University of Connecticut Health Center, United States

***Correspondence:**
Sarah I. Bonnet
sarah.bonnet@vet-alfort.fr

Received: *29 March 2017*
Accepted: *04 May 2017*
Published: *22 May 2017*

Citation:
Blisnick AA, Foulon T and Bonnet SI (2017) Serine Protease Inhibitors in Ticks: An Overview of Their Role in Tick Biology and Tick-Borne Pathogen Transmission. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7:199. doi: 10.3389/fcimb.2017.00199

INTRODUCTION

Ticks are among the most common and important vectors of both human and animal pathogens worldwide including some parasites, bacteria and viruses (Dantas-Torres et al., 2012). These obligate hematophagous arthropods are divided into two main families; soft and hard ticks. Tick developmental stages include larval, nymphal and adult forms, all of which—for most species—require blood meals to complete development and enable reproduction. Compared to

other hematophagous arthropods, hard –or *Ixodidae*- tick feeding is a slow and complex process, taking several days until repletion, and thus necessitates extended control over the vertebrate host's immune response. Whereas the soft—or *Argasidae*—ticks usually complete a blood meal in less than 1 h (Sonenshine and Anderson, 2014). During this feeding process, all ticks inject saliva and absorb blood alternately. Blood cells are lysed in the midgut lumen and, in contrast to other hematophagous arthropods, further digestion of proteins and other blood molecules occurs intracellularly, taking place within midgut epithelial cells.

Current tick control strategies essentially rely on the use of chemical acaricides and repellents. Their widespread deployment however, has a profound environmental impact (Rajput et al., 2006; De Meneghi et al., 2016), and has led to the emergence of resistance in multiple tick species (Rosario-Cruz et al., 2009; Adakal et al., 2013). New environmentally sustainable approaches providing broader protection against current and future tick-borne pathogens (TBP) are thus urgently needed. To investigate new candidate pathways to fight the spread of these pathogens, a complete understanding of tick biology, tick-pathogen and tick-host interactions is essential. Since the beginning of the twenty first century the continual development of cutting-edge high-throughput methods has enabled the study of genomes, transcriptomes, and proteomes, thus facilitating many diverse biomolecular studies (Metzker, 2010). These tools have been essential in the discovery of specific tick biological gene products. The most studied tick species have been those that present significant human and/or livestock disease risk in the northern hemisphere: *Ixodes scapularis* in the USA (deer; black-legged tick); *Ixodes persulcatus* in Asia and Eastern Europe (Taiga tick); and *Ixodes ricinus* in western and central Europe (sheep tick). Additionally, the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cattle tick that causes massive damage in Australia, Africa, Central America, and Asia has also been intensively studied.

Most studies have investigated specific tick organ transcriptomes under a variety of conditions, especially tick salivary glands (SGs) (Santos et al., 2004; Francischetti et al., 2005b; Ribeiro et al., 2006; Garcia et al., 2014; Liu et al., 2014) or midgut (Anderson et al., 2008; Chmelar et al., 2016), occasionally eggs or ovaries (Santos et al., 2004), and less frequently hemocytes (Santos et al., 2004; Kotsyfakis et al., 2015), body fat or synganglia (Bissinger et al., 2011; Egekwu et al., 2014). Several comprehensive protein catalogs describing protein diversity in various tick fluids such as saliva (Madden et al., 2004; Cotté et al., 2014; Radulovic et al., 2014; Tirloni et al., 2014a, 2015) or hemolymph (Gudderra et al., 2002; Stopforth et al., 2010), as well as in midgut during feeding (Schwarz et al., 2014; Oleaga et al., 2015), have been compiled, vital to understanding mechanisms implicated in different biological processes such as tick feeding or tick immunity.

Several studies also reported that TBP can influence gene and protein expression in tick, highlighting evidence of molecular interaction between pathogens and the vector (review in Liu and Bonnet, 2014). These studies focused on specific organs including SGs, midgut, ovaries, or on the whole tick during infections with several different pathogens, and reported differential expression of tick's genes links to pathogen transmission. TBP are imbibed by tick when feeding on a pathogen-infected vertebrate host and, once ingested, they directly or not -depending of the pathogen- escape the midgut and invade the SGs and the ovaries for vertically transmitted pathogens (see Liu and Bonnet, 2014). Then, for most TBP, transmission to a new host occurs via the saliva during blood feeding. During both their transmission and development into the vector, TBP undergo developmental transitions and migrations and suffer population losses, to which tick factors surely contribute. In addition, during the prolonged tick-host attachment period, many proteins injected into the host via tick saliva dampen host defenses, thereby creating a favorable environment for survival and propagation of TBP (Brossard and Wikel, 2004; Nuttall and Labuda, 2004; Ramamoorthi et al., 2005; Wikel, 2013).

Many enzyme activity inhibitors were described among the transcripts or proteins detected in these studies, including multiple protease inhibitors often belonging to serine protease inhibitor families. These inhibitors can vary in molecular weight from less than 10 kDa to almost 100 kDa, and can reversibly or irreversibly inhibit their targets via family-specific domains. Their global tissue expression suggests involvement in various important tick biological pathways, including innate immunity, hemolymph clotting formation, blood uptake, digestion, as well as oviposition and egg laying. In addition, tick serine protease inhibitors (tSPIs) also modulate vertebrate host responses during biting, act on hemostasis, immune responses, or angiogenesis. Their implications in these various processes suggest that tSPIs can indirectly influence tick pathogen transmission, and indeed some have been directly experimentally linked with TBP transmission. The aim of the present review is to summarize current knowledge concerning these tSPIs (detailed in **Table 1**), in order to highlight their role in tick biology, TBP transmission, and to identify putative targets which could contribute to effective tick and TBP control strategies.

THE SERINE PROTEASE INHIBITOR FAMILY

Four groups of serine protease inhibitors have been identified in plants and animals, and can be classified into two main

Abbreviations: α2M, alpha 2-macroglobulin; APC, antigen presenting cells; aPTT, activated partial thromboplastin time; BPTI, bovine pancreatic trypsin inhibitor; BSAP, $BaSO4^{-}$ adsorbing protein; CAMs, chorioalantoic membranes; Efh, EF hand; FCT, fibrinogen clotting time; FRP, follistatin-related-protein; HBE, heparin binding exosite; HMWK, high molecular weight kininogen; hNE, human neutrophil elastase; hTFPI, human tissue factor pathway inhibitor; HuPK, human prekalikrein; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; LICI, limulus intracellular coagulation inhibitor; MA, methyl amine; PAR, proteinase activated receptor; PARP, poly (ADP-r-ribose) polymerase; PDGF, platelet-derived growth factor; PECAM-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1; PPE, porcine pancreatic elastase; PT, prothrombin time; RCL, reactive center loop; RCT, recalcification time assay; RNAi, RNA interference; SGs, salivary glands; STAT 3, signal transducer and activator of transcription 3; STI, soybean trypsin inhibitor; TBP, tick-borne pathogens; TF, tissue factor; TGF-alpha, tissue growth factor alpha; TIL, trypsin inhibitor-like domain; tSPI, tick serine protease inhibitor; TT, thrombin clotting time; VEGF, vascular endothelial growth factor.

TABLE 1 | Tick serine protease inhibitors implicated in both tick biology/physiology and modulation of vertebrate host responses to tick bite, classified according to their inhibitor group (Serpin, Macroglobuline, Kunitz, Kazal), and the corresponding tick species.

Inhibitor name	Molecular weight (kDa)	Inhibitor type	Tick species	Action	References
TICK IMMUNE SYSTEM FACTORS					
TAM	420	α2M	*O. moubata*	Tick immune defense	Kopacek et al., 2000
IrAM	440	α2M	*I. ricinus*	Antimicrobial activity	Buresova et al., 2009
BmCI	6.5	Kunitz	*R. (B.) microplus*	Antimicrobial activity	Lima et al., 2010
DvKPI	62	Kunitz	*D. variabilis*	Antimicrobial activity	Ceraul et al., 2008
Ixodidin	7.1	Trypsin Inhibitor Like (TIL)	*R. (B.) microplus*	Antimicrobial activity	Fogaça et al., 2006
BmSI 6-7	7.4, 7.3	Trypsin Inhibitor Like (TIL)	*R. (B.) microplus*	Antimicrobial activity and tissue preservation	Sasaki et al., 2008
BmTI-A	13.5	Kunitz	*R. (B.) microplus*	Probable antimicrobial activity	Tanaka et al., 1999
HEMOLYMPH CLOTTING FACTORS					
HLS 2	44	Serpin	*H. longicornis*	Hemolymph clot formation	Imamura et al., 2005
HLSG-1	37.7	Serpin	*H. longicornis*	Hemolymph clot formation	Mulenga et al., 2001
RAS 3-4	43.2, 53.9	Serpin	*R. appendiculatus*	Hemolymph clot formation	Mulenga et al., 2003b
BLOOD UPTAKE AND DIGESTION MODULATORS					
HLSG-2	31.2	Serpin	*H. longicornis*	Probable blood digestion helper	Mulenga et al., 2001
HIMKI	12	Kunitz	*H. longicornis*	Probable blood digestion helper	Miyoshi et al., 2010
HLS-1	41	Serpin	*H. longicornis*	Probable blood uptake and digestion helper	Sugino et al., 2003
HIChI	6.7	Kunitz	*H. longicornis*	Probable blood digestion helper	Alim et al., 2012
RAMSP 1-3	32.3, 51.2, 49.5	_	*R. appendiculatus*	Probable blood digestion helper	Mulenga et al., 2003a
RAS-1 and -2	41.9, 42.7	Serpin	*R. appendiculatus*	Probable blood digestion helper	Mulenga et al., 2003b
AAS19	43	Serpin	*A. americanum*	Probable blood digestion helper	Kim et al., 2015
RMS-3 -6 -9 -13 -15 -16 -17 -21 -22	40-55	Serpin	*R. (B.) microplus*	Probable blood digestion helper	Tirloni et al., 2014a,b; Rodriguez-Valle et al., 2015
BmTI-A	13.5	Kunitz	*R. (B.) microplus*	Probable blood digestion helper	Sasaki et al., 2004
BmTI-D	1.6	Kunitz	*R. (B.) microplus*	Probable blood digestion helper	Sasaki et al., 2004
AamS6	42	Serpin	*A. americanum*	Probable blood digestion helper	Chalaire et al., 2011; Mulenga et al., 2013
Ixophilin	54.4	Kunitz	*I. scapularis*	Probable blood digestion helper	Narasimhan et al., 2013
TICK DEVELOPMENT, OVIPOSITION, EGG LAYING, AND MOLTING FACTORS					
BmTIs	6.2-18.4	Kunitz	*R. (B.) microplus*	Tick egg production and development	Tanaka et al., 1999
RMS-3	40	Serpin	*R. (B.) microplus*	Tick reproduction egg production	Rodriguez-Valle et al., 2012
RMS-6	40	Serpin	*R. (B.) microplus*	Probable role in embryogenesis	Rodriguez-Valle et al., 2012
RMS-19	40.7	Serpin	*R. (B.) microplus*	Role in tick development	Rodriguez-Valle et al., 2012
RMS-20	31.1	Serpin	*R. (B.) microplus*	Role in tick development	Rodriguez-Valle et al., 2012
RMS-21	12.5	Serpin	*R. (B.) microplus*	Probable role in embryogenesis	Rodriguez-Valle et al., 2012
RMS-22	10.7	Serpin	*R. (B.) microplus*	Probable role in embryogenesis	Rodriguez-Valle et al., 2012
RmKK	16.7	kunitz	*R. (B.) microplus*	Probable protection of undesired egg proteolysis	Abreu et al., 2014
BmTI-6	33.8	kunitz	*R. (B.) microplus*	Regulation of egg production and proteases in eggs and larvae	Andreotti et al., 2001; Sasaki et al., 2004; Sasaki and Tanaka, 2008
RsTIs	8-18	kunitz	*R. (B.) microplus*	Regulation of egg production and proteases in eggs and larvae	Sant'Anna Azzolini et al., 2003
Tick FRP	32	Kazal	*H. longicornis*	Role in tick oviposition	Zhou et al., 2006
AAS19	43	Serpin	*A. americanum*	Role in tick oviposition	Kim et al., 2016
HOST-EXTRINSIC PATHWAY TICK INHIBITORS					
Ixolaris	15.7	Kunitz	*I. scapularis*	Blocks FVIIa/TF complex activity	Francischetti et al., 2002
Penthalaris	35	Kunitz	*I. scapularis*	Block FVIIa/TF complex activity	Francischetti et al., 2004

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Inhibitor name	Molecular weight (kDa)	Inhibitor type	Tick species	Action	References
BSAP1	9.3	_	*O. savignyi*	Targets tissue factor (TF)	Ehebauer et al., 2002
BSAP2	9.1	_	*O. savignyi*	Targets tissue factor (TF)	Ehebauer et al., 2002
HOST-INTRINSIC PATHWAY TICK INHIBITORS					
IrCPI	9.7	Kunitz	*I. ricinus*	Blocks FXII, FXI, and kallikrein activation	Decrem et al., 2009
BmTI-A	13.5	Kunitz	*R. (B.) microplus*	Blocks plasmin, elastase, and plasma kallikrein	Tanaka et al., 1999
Rhipilin-2	22	Kunitz	*R. (B.) microplus*	Affects APTT test clotting time	Cao et al., 2013
Haemaphysalin	–	Kunitz	*H. longicornis*	Blocks kallikrein-kinin system activation	Kato et al., 2005a,b
DvKPI	62	Kunitz	*D. variabilis*	Affects APTT test clotting time	Ceraul et al., 2008
HOST-FX(a) FACTOR TICK INHIBITORS					
TAP	7	Kunitz	*O. moubata*	Blocks FXa activity	Waxman et al., 1990
FXa inhibitor	7	Kunitz	*O.savignyi*	Blocks FXa activity	Gaspar et al., 1996
	17	_	*H. truncatum*	Blocks FXa activity	Joubert et al., 1995
	15	_	*H. dromaderii*	Blocks FXa activity	Ibrahim et al., 2001b
	65	Serpin	*R. appendiculatus*	Blocks FXa activity	Limo et al., 1991
AAS19	43	Serpin	*A. americanum*	Blocks FXa and plasmin action	Kim et al., 2015, 2016
Amblyomin-X	13.5	Kunitz	*A. cajennense*	Blocks FVIIa/TF complex activity and prothombin conversion	Batista et al., 2010; Branco et al., 2016
HOST-THROMBIN INHIBITING TICK FACTOR					
BmAP	60	_	*R. (B.) microplus*	Thrombin inhibitor	Horn et al., 2000
Microphilin	1.7	_	*R. (B.) microplus*	Thrombin inhibitor	Ciprandi et al., 2006
BmGTI	26	_	*R. (B.) microplus*	Thrombin inhibitor	Ricci et al., 2007
RMS 15	48		*R. (B.) microplus*	Thrombin inhibitor	Rodriguez-Valle et al., 2015; Xu et al., 2016
Boophilin	13.9	Kunitz	*R. (B.) microplus*	Thrombin inhibitor	Macedo-Ribeiro et al., 2008; Assumpço et al., 2016
Ixin	–	_	*I. ricinus*	Thrombin inhibitor	Hoffmann et al., 1991
Iris	43	Serpin	*I. ricinus*	Thrombin inhibitor	Leboulle et al., 2002b
Madanin 1	67	_	*H. longicornis*	Thrombin inhibitor	Iwanaga et al., 2003
Madanin 2	71	_	*H. longicornis*	Thrombin inhibitor	Iwanaga et al., 2003
Chimadanin	7.4	_	*H. longicornis*	Thrombin inhibitor	Nakajima et al., 2006
HLS2	44	Serpin	*H. longicornis*	Weak thrombin inhibitor	Imamura et al., 2005
Hemalin	20	Kunitz	*H. longicornis*	Thrombin inhibitor	Liao et al., 2009
IxSc-1E1	45	Serpin	*I. scapularis*	Thrombin inhibitor	Ibelli et al., 2014
Americanin	12	_	*A. americanum*	Thrombin inhibitor	Zhu et al., 1997
Amblin	17.4	Kunitz	*A. hebraeum*	Thrombin inhibitor	Lai et al., 2004
Variegin	3.7	_	*A. variegatum*	Thrombin inhibitor	Kazimírová et al., 2002
Hyalomin 1-4	8.4, 8.5, 8.2, 7.4	_	*H. marginatum rufipes*	Thrombin inhibitor	Francischetti et al., 2011; Jablonka et al., 2015
NTI 1	3.4	_	*H. dromaderii*	Thrombin inhibitor	Ibrahim et al., 2001a
NTI 2	14.9	_	*H. dromaderii*	Thrombin inhibitor	Ibrahim et al., 2001a
Rhipilin-1	18	Kunitz	*R. haemaphysaloides*	Thrombin inhibitor	Gao et al., 2011
RHS-1	41.9	Serpin	*R. haemaphysaloides*	Thrombin inhibitor	Yu et al., 2013
RHS-2	42.7	Serpin	*R. haemaphysaloides*	Thrombin inhibitor	Yu et al., 2013
Calcaratin	14.5	_	*R. B. calcaratus*	Thrombin inhibitor	Motoyashiki et al., 2003
–		_	*I. holocyclus*	Thrombin inhibitor	Anastopoulos et al., 1991
Ornithodorin	12	Kunitz	*O. moubata*	Thrombin inhibitor	van de Locht et al., 1996
Savignin	12	_	*O. savignyi*	Thrombin inhibitor	Mans et al., 2002
Monobin	15	Kunitz	*A. monolakensis*	Thrombin inhibitor	Mans et al., 2008

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Inhibitor name	Molecular weight (kDa)	Inhibitor type	Tick species	Action	References
HOST-IMMUNE SYSTEM MODULATION BY TICK FACTORS					
BmSI-7	7.3	_	*R. (B.) microplus*	Elastase inhibitor	Sasaki et al., 2008
Lopsins	43-44	Serpin	*A. americanum*	Probable anti-inflammatory action	Mulenga et al., 2007
AamS6	42	Serpin	*A. americanum*	Inhibits elastase, plasmin, and chymase	Chalaire et al., 2011; Syrovets et al., 2012
AAS19	43	Serpin	*A. americanum*	Inhibits plasmin	Syrovets et al., 2012; Kim et al., 2015, 2016
Iris	43	Serpin	*I. ricinus*	Inhibits elastase-like proteases and suppresses pro-inflammatory cytokine secretion	Leboulle et al., 2002a; Prevot et al., 2009
Ipis-1	41.7	Serpin	*I. persulcatus*	Modulates CD14+ cells activation	Toyomane et al., 2016
IRS-2	41.9	Serpin	*I. ricinus*	Modulates T cell differentiation, T17 cell maturation and inhibits chymase and cathepsin G	Chmelar et al., 2011
Tryptogalinin	10.3	Kunitz	*I. scapularis*	Inhibits elastase, tryptase, plasmin, matryptase	Payne and Kam, 2004; Dai et al., 2012; Valdés et al., 2013
Tdpi	11.1	Kunitz	*R. appendiculatus*	Inhibits plasmin and tryptase	Paesen et al., 1999, 2007
RMS-3	40	Serpin	*R. (B.) microplus*	Probable interaction/modulation of B cell action	Rodriguez-Valle et al., 2012
BmTI 2 -3	17,1, 3.1	Kunitz	*R. (B.) microplus*	Inflammatory response modulation	Sasaki et al., 2004
HOST ANGIOGENESIS MODULATION AND APOPTOSE INDUCTION BY TICK FACTORS					
BmCI	6.5	Kunitz	*R. (B.) microplus*	Pro-apoptotic role and inhibits cell proliferation	Lima et al., 2010
Haemangin	14.1	Kunitz	*I. scapularis*	Abolishes angiogenesis and neovascularization	Islam et al., 2009
BmTI-A	13.5	Kunitz	*R. (B.) microplus*	Inhibits plasma kallikrein, plasmin, and elastase, cell proliferation and migration	Soares et al., 2012, 2016
Amblyomin-X	13.5	Kunitz	*A. cajennense*	Tumor cell cycle alteration, proteasome inhibitor, caspase cascade activation, angiogenesis repressor	Chudzinski-Tavassi et al., 2010; Morais et al., 2016
ROLE IN TICK-BORNE PATHOGEN TRANSMISSION AND DEVELOPMENT					
BmTI-A	13.5	Kunitz	*R. (B.) microplus*	Limits *B. bovis* proliferation in ticks	Rachinsky et al., 2007
DvKPI	62	Kunitz	*D. variabilis*	Modulates Rickettsia development	Ceraul et al., 2008
IrSPI	12	Kunitz	*I. ricinus*	Modulates *Bartonella henselae* development	Liu et al., 2014
Ixophilin	54.4	Kunitz	*I. scapularis*	Probable role in *B. burgdorferi* development	Narasimhan et al., 2013
TICK MOLECULES TESTED IN VACCINE PROJECTS					
RAS-1	41.9	Serpin	*R. appendiculatus*	Impacts engorgement and tick viability	Imamura et al., 2006
RAS-2	42.7	Serpin	*R. appendiculatus*	Impacts engorgement and tick viability	Imamura et al., 2006
BmTIs	6.2-18.4	Kunitz	*R. (B.) microplus*	Impacts tick viability and engorged tick weight	Andreotti et al., 2002
HLS-1	41	Serpin	*H. longicornis*	Impacts tick viability and the developmental cycle	Sugino et al., 2003
RmLTI	46	Kunitz	*R. (B.) microplus*	Impacts egg eclosion, viability, and larval hatchability	Andreotti et al., 2012

categories: trapping inhibitors including the serpins and the α2 macroglobulines (α2M); and tight-binding inhibitors including the Kunitz or Kazal domain-containing proteins (**Figure 1**). Trapping inhibition results in proteolytic cleavage, whereas proteases bound to tight-binding inhibitors can be released undamaged, while the inhibitors are liberated in either native

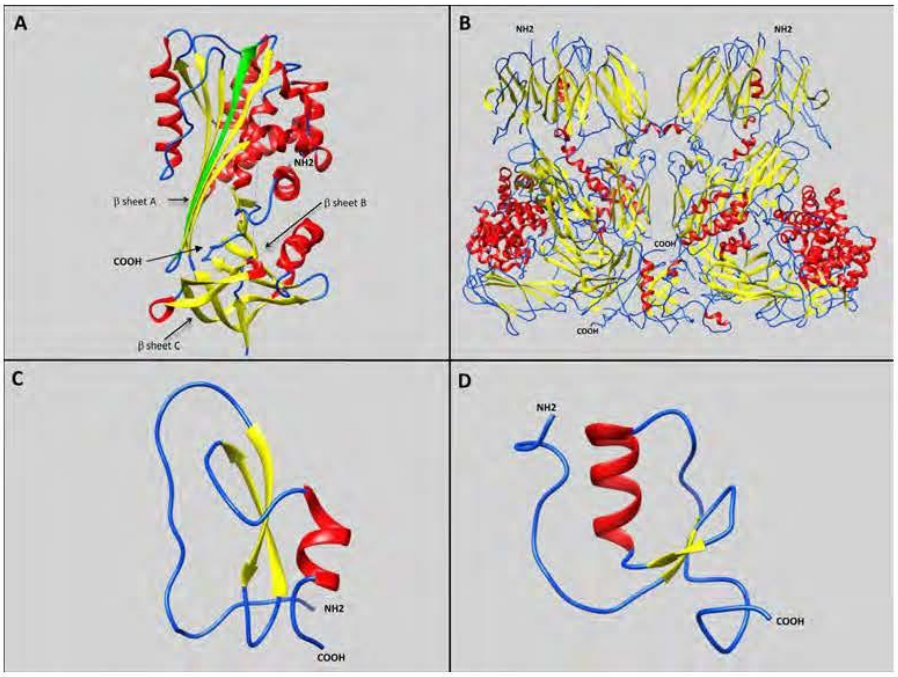


FIGURE 1 | Representative schematic diagrams of secondary structures of the four types of serine protease inhibitors: serpins, α2 macroglobulins, Kunitz-type inhibitors, and Kazal-type inhibitors. Loops, β-sheets, and α-helices are labeled with blue, yellow, and red, respectively. **(A)** IRS 2 serpin from the *I. ricinus* tick showing the three β-sheets A, B, and C (Chmelar et al., 2011; PDB accession number: 3NDA). The green arrow represents the additional strand (s4A) formed after proteolysis, resulting in Reactive Center Loop cleavage, and insertion of the amino-terminal portion into the A β-sheet. **(B)** Human α2 macroglobulin complement component 5 in native homodimer conformation (Fredslund et al., 2008; PDB accession number: 3CU7). **(C)** Kunitz-type inhibitor Tick-Derived Protease Inhibitor (TDPI) from *R. appendiculatus* harboring one Kunitz domain composed of β-sheets and an α-helix stabilized by three highly conserved disulphide bridges (Paesen et al., 2007; PDB accession number: 2UUX). **(D)** Kazal-type inhibitor Dipetalin from blood-sucking insect *Dipetalogaster maximus*. harboring one Kazal domain composed of one α-helix with adjacent β-sheets and loop (Schlott et al., 2002; PDB accession number: 1KMA).

or cleaved forms. Target-protease interaction occurs via the reactive center loop (RCL), which demonstrates a range of different conformations and a high degree of conformational flexibility, with each inhibitor family displaying characteristic serine protease inhibitory mechanisms. Serine protease inhibitors can be classified into two functional groups based on their ability to inhibit either trypsin or chymotrypsin: inhibitors of trypsin-like proteases such as thrombin, or inhibitors of chymotrypsin-like proteases such as elastase.

Trapping Inhibitors

Serpins

Serpins form a large group of homologous proteins that appear to be ubiquitous in multicellular eukaryotes. They are composed of approximately 400 amino acids and are often glycosylated. Serpins fold into an NH_2-terminal helical domain and a COOH-terminal beta-sheet domain (**Figure 1A**). The serpin fold consisting of three beta-sheets (A-C) with eight or nine alpha-helical linkers and an exposed ~20 residue RCL acts as bait for the protease target (Gubb et al., 2010). An unusual aspect of serpins is their native unstable fold, where the RCL is on top and the beta-sheet A is outward. Following proteolysis however, the RCL is cleaved, and the RCL amino-terminal portion inserts into the center of beta-sheet A to form an additional (fourth) strand (s4A), which effectively stabilizes the complex structure (Law et al., 2006). The protease is thus denatured and the serpin/protease complex is targeted for degradation (Huntington et al., 2000). This amino-terminal RCL insertion can either occur upon proteolytic cleavage, or spontaneously (Huntington, 2011). Hence serpins interact with their target via a "suicide-cleavage" mechanism, resulting in the formation of an inactive covalently linked serpin/protease complex. While the majority of serpins inhibit serine proteases, they can also bind to several others such as cysteine proteases, metalloproteases, caspases (Ray et al., 1992), papain-like cysteine proteases (Irving et al., 2002), as well as some non-protease ligands, such as collagen, DNA, or protein Z. Serpins have also been ascribed several additional roles, such as heparin or heparin sulfate co-factor (Khan et al., 2011), as well as rare non-inhibitory functions; as a hormone transporter (Pemberton et al., 1988), molecular chaperone (Nagata, 1996), or tumor suppressor (Zou et al., 1994).

α2-Macroglobulins

Members of α2-macroglobulin (α2M) group have been identified in a broad spectrum of vertebrate and invertebrate species and comprise the C3, C4, and C5 components of the vertebrate complement system (Sottrup-Jensen et al., 1985). α2Ms are considered as early-acting innate immunity components, similar

to opsonin, but their role in the proteolytic attack of invading pathogens remains hypothetical. Most α2Ms are tetramers assembled from pairwise subunits with disulfide-bridges, but monomeric and dimeric forms also exist, the latter more common in invertebrates (**Figure 1B**) (Starkey and Barrett, 1982). Interaction with targeted proteases is initiated by proteolytic cleavage at a defined motif characterized by an exposed and highly flexible 30–40 amino acid residue region (Sottrup-Jensen, 1989). The inhibitory activity of α2Ms is directly due to their thiol-ester bond, which can be abolished by small amines such as methylamine (Larsson and Bjork, 1984). This bait region with multiple cleavage sites inhibits a broad range of proteases including serine-, cysteine-, aspartic- and metallo-proteases (Sottrup-Jensen, 1989). In addition, α2Ms could play a role as hormone transporters (Peslova et al., 2009), and can counteract inhibition from other high molecular weight inhibitors by protecting protease active sites (Armstrong et al., 1985).

Tight-Binding Inhibitors

Kunitz/BPTI Inhibitors

Initially discovered at high concentrations in beans, Kunitz proteins are typically small proteins with a molecular weight close to or less than 20 kDa (Kunitz, 1945). The most well-studied inhibitor from this family is the bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) that gives the family its name (Creighton, 1975). Generally they contain between one to twelve Kunitz domains (Laskowski and Kato, 1980), and each domain encloses disulphide-rich α helices and ß-folds stabilized by three highly-conserved disulphide bridges, leading to a compact and stable molecule (Ranasinghe and McManus, 2013) (**Figure 1C**). Inhibitors of this kind possess a bait region inhibiting targeted proteases that precisely matches the enzyme's catalytic site, thus generating a particularly stable substrate/inhibitor complex (Ram et al., 1954). Through the RCL region, inhibitors block the serine protease active site with a tight non-covalent interaction without any conformational changes -similarly to enzyme-substrate Michaelis complex- forming a ß-sheet between the enzyme and its inhibitor (Ascenzi et al., 2003; Krowarsch et al., 2003; Chand et al., 2004). Despite opening of the bait ring region following proteolysis, the free cut ends tend to maintain the initial fold, so the hydrolysis reaction is likely to be reversible with an equilibrium between cleaved and uncleaved [inhibitor/protease] complexes (Laskowski and Qasim, 2000). The tight-binding exposed RCL loop of Kunitz/BPTI inhibitors is suited to a wide variety of protein folds suggesting a large range of possible protease targets. However, some Kunitz domain-containing proteins with RCL region substitutions have other functions such as ion channel blockers or snake toxins (Grzesiak et al., 2000).

Kazal Inhibitors

Initially identified in vertebrates, Kazal inhibitors have also been identified in several invertebrates (Rimphanitchayakit and Tassanakajon, 2010). They can carry from two to fifteen Kazal domains (Rawlings et al., 2004), which have between 40 and 60 amino acids of variable sequence, except for six well-conserved cysteine residues able to form three disulfide-linked sub-domains (Cerenius et al., 2010; Rimphanitchayakit and Tassanakajon, 2010). These domains comprise one α helix with three adjacent ß sheets and loops, that precisely fit the active sites of targeted proteases and block them stoichiometrically, resulting in a relatively stable protease/inhibitor complex (**Figure 1D**) (Laskowski and Kato, 1980). Although non-covalent binding occurs, Kazal inhibitor and protease association is tight, resulting in strong inhibition (Somprasong et al., 2006; Wang et al., 2009). Interactions between Kazal domains and proteases can occur via multiple different amino acids, thus influencing binding intensity and specificity. This enables the inhibition of several targets including trypsin, plasmin, porcine pancreatic elastase (PPE), human neutrophil elastase (hNE), chymotrypsin, proteinase K, or thrombin (Rimphanitchayakit and Tassanakajon, 2010).

ROLE OF SERINE PROTEASE INHIBITORS IN TICK BIOLOGY

Tick Immune System

It is well known that ticks possess innate immunity that also affects their vector competence (Hajdusek et al., 2013). Although all of the involved mechanisms have not yet been fully clarified, microbe phagocytosis by tick hemocytes seems to be coupled to a primitive complement-like system, a variety of antimicrobial peptides and possibly reactive oxygen species (Kopacek et al., 2010). Studies in both hard and soft ticks have implicated several tSPIs in immune responses against different microbes, mostly identified in hemolymph (**Figure 2**, **Table 2**).

The most studied tick species in this context is *R. (B.) microplus*. Firstly, **Ixodidin**, a tSPI discovered in hemocytes, was reported to have strong inhibitory activity against *Micrococcus luteus* and, to a lesser extent against *Escherichia coli* (Fogaça et al., 2006). In addition to this bacterial clearance role, Ixodidin also possesses inhibitory activity against chymotrypsin and elastase serine proteases (Fogaça et al., 2006). However, it remains unclear whether the antimicrobial activity is due to protease inhibition or directly through peptide effects on bacterial membranes. Two additional inhibitors have been identified from *R. (B.) microplus* eggs: **BmSI 6** and **BmSI 7** (*Boophilus microplus* subtilisin inhibitors), that target Pr1 proteases from *Metarhizium anisopliae*, a fungus used as a biological insecticide (Sasaki et al., 2008). These Pr1 proteases induce host cuticle degradation, enabling hyphae penetration to obtain nutrition (Leger et al., 1987). Only *BmSI 7*—which shares several similarities with Ixodidin—has been well characterized. It harbors disulphide bonds and a trypsin inhibitor-like cysteine-rich domain (TIL), and as it is expressed in adult ovaries, midgut, SGs, hemocytes, body fat, and larvae, it could be involved in tick defense mechanisms, and/or in avoiding tick tissue degradation (Sasaki et al., 2008). Random sequencing of a tick body fat cDNA library enabled the discovery of, **BmCI** (*Boophilus microplus* chymotrypsin inhibitor), a chymotrypsin inhibitor that belongs to the Kunitz/BPTI inhibitor family (Lima et al., 2010).

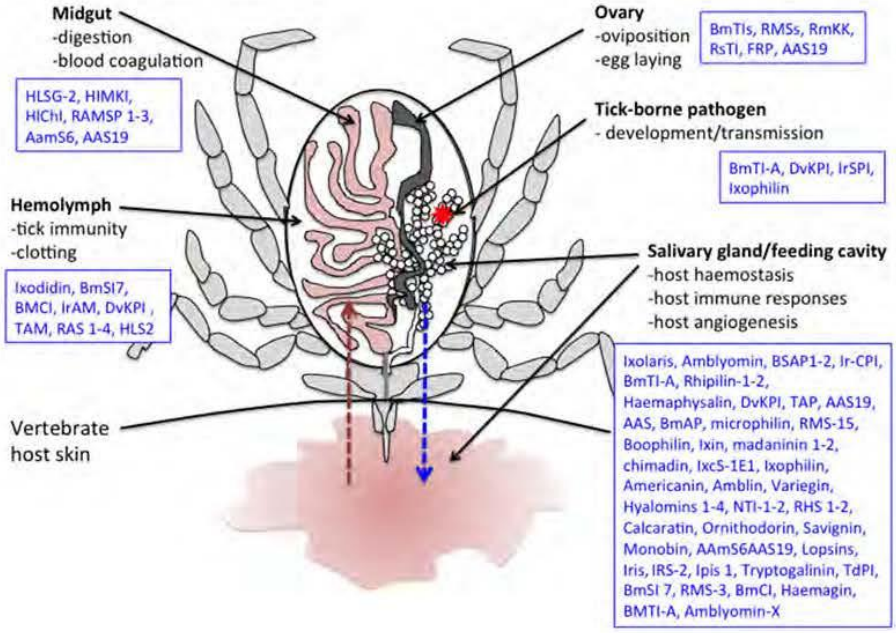


FIGURE 2 | Schematic representation of a tick during feeding. Several tick serine protease inhibitors identified in different tick species and implicated in both tick biology/physiology and modulation of the vertebrate host responses to tick bite are also indicated. The red arrow represents blood absorption. The blue arrow represents saliva injection. The red star corresponds to a tick-borne pathogen. Note that only half of the digestive tract and a single salivary gland and ovary are represented here. *Boophilus microplus* subtilisin inhibitors (BmSI); *Boophilus microplus* Chymotrypsin inhibitor (BmCI); *Ixodes ricinus* alpha macroglobuline (IrAM); *Dermacentor variabilis* Kunitz protease inhibitor (DvKPI); Tick α-Macroglobulin (TAM); *Boophilus microplus* trypsin inhibitor (BmTIs); *R. appendiculatus* Serpins (RAS); *H. longicornis* serine proteinase genes (HLSG); *Haemaphysalis longicornis* midgut Kunitz-type inhibitor (HIMKI); *Haemaphysalis longicornis* serpin (HLS); *Haemaphysalis longicornis* chymotrypsin inhibition (HIChI); *R. appendiculatus* Midgut Serine proteinases (RAMSP); *R.B. microplus* Serpin (RMS); *Amblyomma americanum* serpin 6 (AamS6); *Amblyomma americanum* serpin 19 (AAS19); *R.B. microplus* Kunitz kallikrein inhibitor (RmKK); *I. ricinus* contact phase inhibitor (IrCPI); Tick Anticoagulant Protein (TAP); *Boophilus microplus* Anticoagulant Protein (BmAP); *B. microplus* gut thrombin inhibitor (*BmGTI*); Nymph thrombin inhibitor (NTI); *Rhipicephalus haemaphysaloides* serpin (RHS); *I. ricinus* immunosuppressive (Iris); *I. ricinus* serpin (IRS); *Ixodes persulcatus* immunosuppressive (Ipis); *I. ricinus* serine protease inhibitor (IrSPI); *R. microplus* Larval Trypsin Inhibitor (RmLTI).

BmCI strongly and specifically inhibits chymotrypsin, and also hNE with reduced specificity. *BmCI* gene expression analysis demonstrated higher expression in hemocytes and ovaries than in SGs and body fat. Following infection with *M. anisopliae*, increased BmCI expression was only observed in tick hemocytes clearly suggesting a role in the tick defense system (Lima et al., 2010). Finally, among BmTIs (*Boophilus microplus* trypsin inhibitors) identified in both larvae and eggs (Tanaka et al., 1999), a double Kunitz-containing inhibitor, **BmTI-A**, had increased transcript levels in ovaries following *Babesia bovis* infection (normally transmitted transovarially in ticks), also suggesting a probable role in the tick immune system (Rachinsky et al., 2007).

IrAM (*I. ricinus* alpha macroglobuline), was identified in the hemolymph of *I. ricinus* as a α2M composed of two non-covalently linked subunits (Buresova et al., 2009). Alternative splicing occurring during IrAM synthesis generates seven bait variants, increasing the spectrum of targeted proteases. IrAM transcripts are detected throughout all tick developmental stages. Gene expression was higher in SGs from partially engorged females than in hemocytes or ovaries, even though IrAM protein is only detected in tick hemocytes. RNAi experiments revealed that IrAM is not involved in tick fitness, mortality, or fecundity (Buresova et al., 2009). However, IrAM enhanced phagocytosis and elimination of the bacteria *Chryseobacterium indologenes* due to its active thioester bonds, which was not observed with other bacteria such as *B. burgdorferi* (Buresová et al., 2006; Buresova et al., 2009). IrAM likely interacts with the major *C. indologenes* virulence factor, a metalloprotease, suggesting a role in the tick immune system during phagocytosis of metalloprotease-producing bacteria (Buresova et al., 2009).

Following the discovery of over-expressed genes in *Dermacentor variabilis* tick body fat and midgut in response to *Rickettsia montanensis* infection (Ceraul et al., 2007), several Kunitz/BPTI inhibitors were identified including **DvKPI** (*Dermacentor variabilis* Kunitz protease inhibitor with five Kunitz domains) (Ceraul et al., 2008). DvKPI was up-regulated six-fold in infected ticks that had fed for three days. These results suggested that DvKPI is involved in tick responses to Rickettsia, avoiding massive colonization which would be detrimental to ticks.

TABLE 2 | Antimicrobial activities of serine protease inhibitors of ticks (tSPI).

Targeted microbe	tSPI	Tick species	References
Micrococcus luteus	Ixodidin	*R. (B.) microplus*	Fogaça et al., 2006
Escherichia coli	Ixodidin	*R. (B.) microplus*	Fogaça et al., 2006
Metarhizium anisopliae	BmSI 6, BmSI 7	*R. (B.) microplus*	Sasaki et al., 2008
	BmCI		Lima et al., 2010
Babesia bovis	BmTI-A	*R. (B.) microplus*	Rachinsky et al., 2007
Chryseobacterium indologenes	IrAM	*I. ricinus*	Buresova et al., 2009
Rickettsia montanensis	DvKPI	*D. variabilis*	Ceraul et al., 2007
Bartonella henselae	IrSPI	*I. ricinus*	Liu et al., 2014
Borrelia burgdorferi	Ixophilin	*I. scapularis*	Narasimhan et al., 2013

Several tSPIs have also been identified in *Ornithodoros moubata* soft tick hemolymph, including **TAM**, (tick α-macroglobulin), the second most abundant protein after vitellogenin (Kopacek et al., 2000). TAM is a tetrameric glycosylated protein that displays similar structural features present on IrAM, and exerts inhibitory activity against both trypsin and thermolysin (Kopacek et al., 2000). Comparing the conserved cysteine motifs between human and limulus α2Ms enables the prediction of disulfide bridge patterns which explain the atypical molecular arrangement of the four TAM bait region variants, likely arising from alternate splicing (Saravanan et al., 2003). While TAM was initially detected in tick hemocytes, significant up-regulation has also been reported in SGs and gut after 1 day of feeding (Saravanan et al., 2003). TAM is believed to be involved in tick defense systems, but an additional role as an anti-coagulant has also been postulated (Keller et al., 1993; van de Locht et al., 1996).

Hemolymph Clotting Formation

As for vertebrates, effective clotting is critical in ticks to limit hemolymph loss and to inhibit pathogens from entering into the tick through the wound. Little is known about the proteins involved in tick hemolymph clotting but several tSPIs have been implicated in this defense system due to homology with known proteins (**Figure 2**).

Four *Rhipicephalus appendiculatus* tick serpins have been identified as potential clotting enzymes involved in the hemolymph coagulation cascade: *R. appendiculatus* serpin-1, -2, -3, and -4 (**RAS-1, -2, -3, and -4**) (Mulenga et al., 2003b). All exhibit similarities ranging from 25 to 30% with limulus intracellular coagulation inhibitor type 1 (LICI-1) from the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridendatus.* RAS-3 harbors also amino acids similarities with LICI-2 and is comparably expressed in all tick organs, while RAS-1, -2 and -4 expression was stronger in SGs than in other tick organs (Mulenga et al., 2003b).

HLS2, a serpin from *Haemaphysalis longicornis*, contains an RCL with high sequence similarities to both vertebrate and invertebrate serpins, and may interact with both chymotrypsin and thrombin (Imamura et al., 2005). HLS2 also demonstrates similar molecular features to RAS-3 and LICI, and its mRNA has only been detected in the hemolymph of partially or fully engorged nymphs and females, suggesting a possible role in endogenous hemolymph circulation. In the same tick species, the serpin **HLSG-1** harbors high similarity (32–44%) to Japanese and mangrove horseshoe crab clotting factor C precursors, mouse manan-binding lectin serine protease 1, and rat/mouse hepsin proteins (Mulenga et al., 2001). In partially fed ticks HLSG-1 transcripts were weakly expressed in the midgut and strongly detected in the SGs.

Blood Uptake and Digestion Modulation

As strict haematophagous acari, ticks require blood meals to complete their development and reproduction. These arthropods are pool-feeders and create haemorrhagic pools from which they collect nutritive fluids while biting, and interestingly, some female hard ticks can imbibe enough blood to increase in size by as much as 100 times (Sonenshine and Anderson, 2014). This unique feeding method implies the existence of very effective blood uptake and digestion mechanisms, in which several tSPIs have now been implicated (**Figure 2**).

In 2001, Mulenga et al. identified **HLSG-2** in *H. longicornis* ticks, a serpin with chymotrypsin-like protease selectivity (Mulenga et al., 2001). HLSG-2 transcripts were only detected in partially fed ticks and expression increased in parallel with feeding duration. HLSG-2 expression was strong in midgut and weak in salivary glands, suggesting probable links with blood uptake and digestion processes (Mulenga et al., 2001). In the same tick species, another serpin-1 (**HLS-1**) harboring similarities to the *I. ricinus* SG serpins RAS-2 and RAS-1 (Sugino et al., 2003) was identified. Taking into account additional sequence homologies with other anticoagulation factors, its specific expression in midgut of partially fed ticks, as well as the fact that clotting time can be delayed by HLS-1 in a dose-dependent manner, all indicate that HLS-1 has a probable role in tick blood meal uptake as well as maintaining blood fluidity in the midgut (Sugino et al., 2003). Then in 2010, Miyoshi et al. identified a Kunitz-type tSPI exclusively expressed in the midgut of adult ticks named **HlMKI** (*Haemaphysalis longicornis* midgut Kunitz-type inhibitor) (Miyoshi et al., 2010). Immunofluorescent analysis demonstrated that HlMKI likely interacts with HlSP, a hemolytic serine protease expressed in the tick midgut, and that both proteins harbored similar expression patterns with a 72 h peak during feeding (Miyoshi et al., 2007). HlMKI displayed inhibitory activity against the HlSP protein, and against chymotrypsin and elastase to a lesser extent. Altogether these results suggested that HlMKI can regulate blood digestion in tick midgut via HlSP modulation (Miyoshi et al., 2010). Lastly, another Kunitz-type tSPI was identified in *H. longicornis* hemocytes, and was named **HlChI** because of its chymotrypsin inhibitory profile (Alim et al., 2012). HlChI has strong chymotrypsin inhibitory activity but low trypsin inhibitory activity. The *HlChI*

gene is expressed in larvae, nymphs, and adults during all feeding phases, and transient up-regulation has been clearly detected from feeding initiation to repletion. During feeding, HlChI is mainly localized in hemocytes, though low expression levels were also detected in midgut, salivary glands, ovaries, and the epidermis (Alim et al., 2012). Several HlChI-RNAi-injected ticks died 48 h after feeding, while others ingested significantly smaller and slower blood meals, laid fewer eggs, and demonstrated lower larvae conversion (Alim et al., 2012). During feeding, HlChI expression in hemocytes peaks at 96 h, coinciding with low proteolytic activity and a low homeostasis level maintained by a few principal inhibitors (Franta et al., 2010; Alim et al., 2012). Thus HlChI is likely an indirect but essential actor in both vital blood feeding and tick reproduction processes.

In *R. appendiculatus* ticks, three serine protease inhibitors of chymotrypsin or trypsin and named **RAMSP 1-3** (*R. appendiculatus* midgut serine proteinases 1-3) were identified, and are likely involved in feeding processes or blood digestion (Mulenga et al., 2003a). RAMSP-1 and -2 transcripts have only been detected in partially fed ticks, while RAMSP-3 mRNA was detected in both unfed and partially fed ticks, with stronger signals in the latter. RAMSPs expression is not restricted to the midgut because RAMSP-1 is equivalently expressed in all tick organs, while RAMSP-2 is weakly expressed in both SGs and midgut, and RAMSP-3 is more weakly expressed in SGs than midgut (Mulenga et al., 2003a). Additionally, all three RAMSPs are expressed in tick carcasses (whole tick without SGs and midgut), suggesting widespread distribution of these inhibitors in other tick tissues (Mulenga et al., 2003a). In terms of **RAS** serpins, RAS-1 and RAS-2 mRNAs can be detected at all life stages, as well as in both sexes, with positive detection in 4-day partially fed and fully engorged ticks (Mulenga et al., 2003b). This suggests gene expression both during and after feeding, although they were not expressed in saliva, likely because they do not contain signal peptide sequences (Mulenga et al., 2003b). Indeed, RAS-1 and RAS-2 might be associated with feeding in both SGs and the midgut by modulating blood uptake and digestion. Confirmation occurred when significantly fewer fully engorged nymphs were counted when ticks were fed on vaccinated compared to non-vaccinated cattle (Imamura et al., 2006).

Then in 2014, NGS technologies enabled the identification of 22 **RMS** serpins (RMS-1 to RMS-22) from *R. (B.) microplus* (Tirloni et al., 2014a,b), among which 18 full-length coding sequences were identified (Rodriguez-Valle et al., 2015). While serpin consensus patterns were conserved, these 18 members of the RMS family showed high amino acid sequence variability suggesting a broad spectrum of targeted serine proteases. Transcription levels of RMS-13, -15, -16 in SGs, or RMS-6, -7, -9, -17 in both SGs and the midgut, suggested that they play a role in the blood meal process, either in uptake or during digestion (Rodriguez-Valle et al., 2015). Functionally, RMS-3 strongly inhibits chymotrypsin and elastase, but only weakly trypsin and thrombin. RMS-15 is a strong thrombin inhibitor and RMS-6 a chymotrypsin inhibitor. Finally while RMS-21 and -22 are not secreted, they were detected in the midgut and SGs suggesting a probable role in proteolysis activity during blood digestion (Rodriguez-Valle et al., 2015). Among the previously mentioned *R. (B.) microplus* BMTIs, the Kunitz inhibitors **BmTi A** and **BmTI D** were also believed to play an important role in feeding by inhibiting human prekallikrein (HuPK) implicated in the coagulation cascade (Sasaki et al., 2004), thus facilitating blood fluid uptake.

The serpin **AamS6** was identified in the *Amblyomma americanum* tick (Mulenga et al., 2013). Both AamS6 mRNA and protein are strongly expressed in the SGs and midgut in unfed ticks, as well as during the first 72 h of feeding, before fading at 96 h, suggesting injection into the bite site and a role in tick anchorage to the host (Chalaire et al., 2011). As expected according to its serpin-like sequences, AamS6 interacted clearly and selectively with trypsin, chymotrypsin, elastase, and chymase, but also surprisingly with papain-like cysteine proteases, indicating that it is a cross-class protease inhibitor (Mulenga et al., 2013). In addition, AamS6 seems to transiently interact with fibrin-lysing plasmin. Despite only *in vitro* data providing the proof for plasmin-AamS6 interaction, it was hypothesized that this inhibitor could sustain blood flow to the tick feeding site and prevent clot formation (Mulenga et al., 2013). In this series of experiments, AamS6 only delayed recalcification time (RCT, the time to plasma clotting once calcium ions and blood-clotting co-factor(s) are reintroduced to citrate plasma), and did not inhibit any of the three coagulation pathways (extrinsic, intrinsic, and common, **Figure 3**). Platelet aggregation inhibition was also reported, that, when combined with previous results, bears out AamS6's involvement in inhibiting blood coagulation both in the midgut and via saliva secretion (Mulenga et al., 2013). Later, an *A. americanum* transcriptomic study identified a novel serpin, **AAS19**, which has the most fully conserved RCL among the ixodid ticks (Kim et al., 2015; Porter et al., 2015). The presence of the tripeptide Arg-Gly-Asp which constitutes a "RGD" motif, in the AAS19 sequence suggests a potential relationship between integrin GPIIb-IIIa and AAS19 during platelet aggregation (Nurden, 2014). Additionally, as AAS19 is abundantly and mostly expressed in the midgut at 96 h during feeding, it likely ensures that host blood doesn't clot during feeding (Porter et al., 2015). AAS19 demonstrates inhibitory activity against plasmin, FXa, and FXIa, and at a lower efficacy rate against FXIIa, FIIa (activated thrombin), FIXa, and tryptase, demonstrating its broad activity spectrum. In addition, the three coagulation pathways have delayed clotting in the presence of AAS19, likely due to weak thrombin inhibition. Altogether these results support AAS19 involvement in blood digestion (Kim et al., 2015).

Finally, **Ixophilin** was identified as a Kunitz thrombin inhibitor secreted in the midgut of *I. scapularis* and which shares homology with Hemalin and Boophilin (see below) (Narasimhan et al., 2013). Ixophilin was preferentially expressed in adult and nymphal midgut and was induced upon feeding, consistent with a potential role in preventing blood clotting in the midgut. In addition, Ixophilin mice immunization experiments demonstrated that ixophilin was necessary for efficient engorgement (Narasimhan et al., 2013).

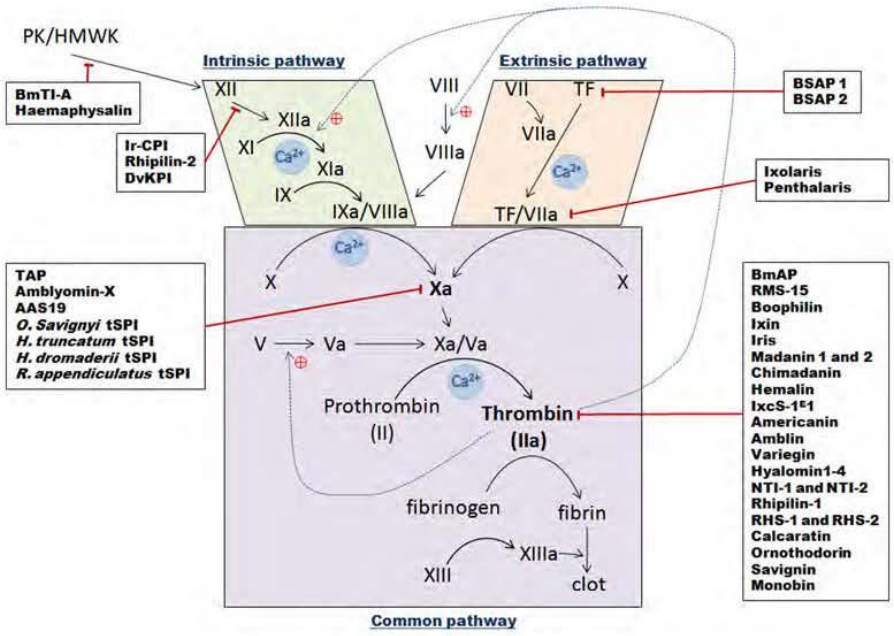


FIGURE 3 | Schematic overview of the three vertebrate blood coagulation cascade pathways, with indicated tick serine protease inhibitors and their targets. The intrinsic pathway is activated following a trauma and when blood comes into contact with subepithelial cells [contact phase with XII, Prekallikrein (PK), and High Molecular Weight Kininogen molecules (HMWK)], which then results in successive activation of factors XII, XI, and IX. The IXa/VIIIa complex then activates transformation of factor X into factor Xa. The extrinsic pathway is initiated following contact between Tissue Factor (TF) from vessels and circulating factor VII. After injury, they form a complex and catalyze the activation of factor X into factor Xa. Once activated by either pathway, factor Xa complexes with its cofactor Va to form the pro-thrombinase complex, which can then convert prothrombin into thrombin. Thrombin then transforms fibrinogen into fibrin to create a plug. Black arrows represent direct activation, dotted blue lines show positive thrombin feedback, red lines correspond to tSPI inhibition targets.

Tick Development, Oviposition, Egg Laying

Tick oviposition and egg laying are essential aspects of the tick life cycle determining tick population expansion. These processes are regulated by many proteins, including tSPIs (**Figure 2**). Inhibitors may be endogenous to certain organs and, for ovaries, it appears that some proteins—including tSPIs—can be captured from the midgut by receptor-mediated endocytosis followed by incorporation into the eggs (Tufail and Takeda, 2009).

Several tSPIs named **BmTIs**, with a similar target spectrum (trypsin, plasmin, and HuPK), have been discovered in the eggs and larvae of *R. (B.) microplus* (Tanaka et al., 1999). However, differing concentrations and inhibitor specificity changes have been reported between egg and larval stages (Andreotti et al., 2001; Sasaki et al., 2004). Andreotti et al. showed a 69.7 and 71.3% reduction in both engorged tick number and egg weight respectively when female ticks were fed on BmTIs-immunized cattle, confirming a crucial role for BmTIs in egg production and development (Andreotti et al., 2002). **BmTI-6**, a Kunitz tSPI identified in ovaries, was also expressed in tick body fat and demonstrated specific inhibitory activity against trypsin and trypsin-like proteases, such as plasmin (Sasaki and Tanaka, 2008). As for other BmTIs, BmTI-6 is suspected to play a role in controlling endogenous proteases in the egg and larval stages (Andreotti et al., 2001; Sasaki et al., 2004).

The **RMS-3** serpin is expressed in the SGs of semi-engorged females, but lower expression levels were also observed in the midgut and ovaries of *R. (B.) microplus* (Rodriguez-Valle et al., 2012). *In vitro* feeding assays showed that both egg weight and larval transformation rates were reduced in female ticks pre-fed on anti-RMS-3 sheep serum, thus implicating RMS-3 in reproduction and egg development (Rodriguez-Valle et al., 2012). An additional Kunitz serine protease inhibitor with trypsin and kallikrein inhibitory activities named **RmKK** was recently discovered in *R. (B.) microplus* eggs (Abreu et al., 2014). Although the native protein was obtained from eggs, the RmKK transcript was only detected in the midgut, suggesting possible midgut expression and subsequent transport to the ovaries and egg incorporation. Interestingly, kallikrein inhibitors were thought to protect against undesired egg proteolysis (Willadsen and Riding, 1980). Lastly, four other serpins were also recently implicated in tick embryogenesis regulation or vitellogenesis: **RMS-19** and **RMS-20**, which are expressed in all tissues and at all stages, **RMS-6** which is only detected in ovaries, and **RMS-21 and -22** which are only detected in eggs (Rodriguez-Valle et al., 2015).

Studies on the dog tick *Rhipicephalus sanguineus* identified a group of proteins belonging to the Kunitz/BPTI tSPI family, called **RsTIs** in larval stages (Sant'Anna Azzolini et al., 2003). Three of which—**RsTIQ2, RsTIQ7** and **RsTIS5**—inhibit trypsin,

neutrophil elastase, and human plasmin. RsTIQ2, and to a lesser extent RsTIQ7, also inhibit HuPK (Sant'Anna Azzolini et al., 2003). Because RsTIs are similar in structure and inhibitory activity to previously described tSPIs from *R. (B.) microplus,* a similar role in egg production has been hypothesized.

A human follistatin-related-protein (**FRP**) homolog was also identified in *H. longicornis* ticks, and is implicated in tick oviposition (Zhou et al., 2006). This protein harbors three distinct domains, a follistatin-like domain, a Kazal domain and two EFh calcium–binding motifs. Polyclonal antibodies revealed FRP presence in tick salivary glands, midgut, body fat, hemocytes, and a strong expression in ovaries (Zhou et al., 2006). RNAi experiments silencing FRP in adult rabbit-fed ticks as well as the use of anti-FRP antibodies showed significant negative effects on tick oviposition while no differences were observed in feeding duration, engorgement weight, and survival (Zhou et al., 2006).

Finally, when the aforementioned *A. americanum* **AAS19** gene was RNAi silenced, ticks imbibed much less blood and presented curious body deformities compared to controls, likely due to deficiencies in hemostasis regulation (Kim et al., 2016). In addition, ticks that fed on rAAS19-immunized rabbits took smaller blood meals and detached prematurely. Following a second round of infestation on these rabbits, ticks also failed to lay eggs, suggesting an important role for AAS19 in both tick homeostasis and reproduction (Kim et al., 2016).

ROLES OF SERINE PROTEASE INHIBITORS IN MODULATING VERTEBRATE HOST RESPONSES

The long feeding period of ticks necessitates extended control over the vertebrate host's haemostasis and immunity. During this feeding process, ticks alternatively inject saliva into and then absorb fluids from the bite wound. To enable the feeding process and avoid tick rejection, several salivary components are thought to control host responses, including several tSPIs (**Figure 2**).

Anti-Hemostatic Effects of Tick Serine Protease Inhibitors

Hemostasis in vertebrates is a tightly regulated process to avoid blood leakage following injury (Aird, 2003). Many biochemical mechanisms are involved in blood clot formation with a central enzymatic cascade that can be activated by three different pathways (**Figure 3**). When the vessel epithelium is damaged, tissue factors (TF) expressed by epithelium cells initiate clot cascades, leading to activation of extrinsic blood coagulation pathways. Displaying TF triggers factor VII activation thus forming TF/VIIa complexes which then activate central factor X. The second intrinsic pathway is activated by contact factors—XII, prekallikrein (PK) and high molecular weight kininogen (HMWK)—that cause successive activation of intermediate factors (factors XI, IX), and IXa/VIIIa complex formation, which also activates factor X. Thus intrinsic and extrinsic coagulation pathways merge in order to activate Factor X to Xa. Then in the "common pathway," activated factor Xa interacts with its co-factor Va and forms the pro-thrombinase complex. This complex then processes pro-thrombin (factor II) into thrombin (factor IIa) that converts fibrinogen into fibrin which then polymerizes to constitute a clot. Ticks prevent clot formation in the host, in the micro hematoma at the bite site, but also, in tick mouthparts and midgut. They inject numerous proteins via their saliva into the blood bowl, mostly tSPIs that affect serine proteases or their zymogens (Factors II, VII, IX, X, XI, XII, and prekallikrein) implicated in clot formation (Tatchell, 1969; Ribeiro et al., 1985). As anticoagulant factors, these inhibitors are essential in allowing ticks to take their blood meal, and concomitantly ingest and transmit pathogens. In addition, during the long feeding period, the blood in the tick midgut is maintained in a fluid state until repletion. To retain blood fluidity, anticoagulants are secreted from the tick midgut epithelium to the midgut lumen. Coagulation inhibitors secreted into the midgut mostly inhibit thrombin whereas anticoagulants secreted from SGs mainly inhibit FXa.

Extrinsic Pathway Tick Inhibitors

I. scapularis was intensively studied in order to understand tick saliva anticoagulant properties, leading to the discovery of multiple anticoagulant molecules, the first being **Ixolaris** from the SGs (Francischetti et al., 2002). This inhibitor, similar to human hTFPI (tissue factor pathway inhibitor), contains two Kunitz domains. Ixolaris, like hTFPI, either blocks FVIIa/TF complex activity through direct interaction with the active site, or sterically via the formation of a tight complex [FVIIa/TF/Ixolaris/FX(a)], resulting in effective extrinsic pathway inhibition (Francischetti et al., 2002). Ixolaris, reaching high concentrations only in the feeding cavity *in vivo*, behaves as a fast ligand of the FX and FXa heparin binding exosite (HBE)—a site distinct from the FXa reactive site—presumably via its second atypical Kunitz domain (Monteiro et al., 2005). The prothrombinase complex could be resistant to physiological concentrations of Ixolaris due to competition with its prothrombin substrate, as reported for hTFPI (Mast and Broze, 1996). Ixolaris' mechanism of action was then proposed to be competitive and concentration dependent (Monteiro et al., 2005). Further analyses of an SG cDNA library enabled the discovery of another Kunitz domain protein implicated in coagulation inhibition, **Penthalaris** (Francischetti et al., 2004). This inhibitor harbors five tandem Kunitz domains and like Ixolaris, inhibits FVIIa/TF-induced FX activation at high concentrations by binding to the HBE of both FX and FXa.

Finally, two *Ornithodoros savignyi* saliva anti-coagulants have been identified: **BSAP1** and **BSAP2** (Ehebauer et al., 2002). These proteins do not inhibit the intrinsic pathway, whereas the extrinsic pathway appeared to have delayed clot formation. Therefore, these proteins may only target TF, as FVII does not seem to be inhibited. It may be the first time a direct TF-interacting protein has been reported, because until now the majority of known extrinsic pathway inhibitors target other factors forming complexes with TF.

Intrinsic Pathway Inhibitors

The Kunitz protein **Ir-CPI** was identified in *I. ricinus* SGs and binds to contact phase factors, FXII, FXI, and kallikrein

(Decrem et al., 2009). *In vitro* experiments showed that Ir-CPI considerably prolonged aPTT, without modifying the extrinsic pathway, whereas experiments on both venous and arterial thrombus formation in animal models showed that Ir-CPI mainly inhibits clot propagation and thrombin generation (Decrem et al., 2009). Like Ixolaris, Ir-CPI does not block amidolytic activity of targeted proteases by binding to the catalytic site as is usual for Kunitz-type inhibitors, but likely acts by binding to an exosite, thereby preventing enzyme activity with high affinity steric hindrance (Laskowski and Kato, 1980).

Among the BmTIs from *R. (B.) microplus* tick eggs and larvae, **BmTI-A** strongly inhibits trypsin, hNE, plasmin and HuPK (Tanaka et al., 1999). It was initially described with two Kunitz domains, the first implicated in trypsin and HuPK inhibition and the second inhibiting hNE (Tanaka et al., 1999; Guerrero et al., 2005). Subsequently, a further five Kunitz-BPTI domains were identified (Soares et al., 2016). BmTI-A transcripts are mainly expressed in the tick midgut, and are weakly expressed in SGs and ovaries (Tanaka et al., 1999). It is possible that the inhibitor is transferred from ovaries to the larval stage where it could be important for controlling blood coagulation, inflammation, and angiogenesis during the larval feeding process, by inhibiting plasma kallikrein, neutrophil elastase, and plasmin (Tanaka et al., 1999; Soares et al., 2016).

Another Kunitz-type tSPI with a unique Kunitz domain named **Rhipilin-2** was identified in *Rhipicephalus hemaphysaloides*, and is highly similar to members of the TFPI mammalian protein family (Cao et al., 2013). Rhipilin-2 does not prolong recalcification time in PT assays, but increases coagulation time of citrated rabbit plasma in aPTT assays. It inhibits approximately 60% of trypsin activity but does not inhibit thrombin. Rhipilin-2 gene expression was only detected in SGs and the midgut of fed ticks (Cao et al., 2013). One-day-fed ticks presented the highest expression that gradually faded until total engorgement, suggesting probable injection via saliva into the host during feeding to restrict blood clotting at the wound site (Cao et al., 2013).

Haemaphysalin, a Kunitz-type inhibitor from the hard tick *H. longicornis* also inhibits intrinsic coagulation pathways by blocking kallikrein-kinin system activation (Kato et al., 2005a,b). Its acts via its two Kunitz domains, and does not affect the amidolytic activities of intrinsic coagulation factors. Direct binding assays demonstrated binding of the COOH-terminal domain to both high molecular weight kininogen (HMWK) and factor XII (Kato et al., 2005a,b). The COOH-terminal domain may then inhibit factor XII and HMWK association on the cell surface, and hence inhibits kallikrein-kinin system activation by interfering with prekallikrein and factor XII reciprocal activation. Zn^{2+} ions appear to be involved in interactions between haemaphysalin and its targets, suggesting that these cations induce conformational changes which enable haemaphysalin's inhibitory effect (Kato et al., 2005a,b).

Previously mentioned studies of **DvKPI** highlighted its ability to inhibit the coagulation cascade as revealed by both delayed aPTT assays and robust antitrypsin activity. Although DvKPI expression was detected in both body fat and SGs, the highest expression was in the midgut and which increased upon feeding, demonstrating that its anticoagulant activity in the midgut is essential (Ceraul et al., 2008).

FX(a) Factor Inhibitors

Tick anticoagulant protein **TAP**, the first tSPI to specifically inhibit FX(a) factor was identified in the soft tick *Ornithodoros moubata* as a Kunitz inhibitor (Waxman et al., 1990). Whereas Kunitz inhibitors are generally highly basic, TAP is acidic, and was classified as a slow, tight-binding inhibitor, because it requires at least 15-min pre-incubation for maximal FX(a) inhibition.

Amblyomin-X was initially discovered following SG transcriptome sequencing of the *Amblyomma cajennense* Cayenne tick (Batista et al., 2010). This protein harbors one Kunitz-type domain, and is observed in monomeric, dimeric, trimeric, and tetrameric conformations. Amblyomin-X inhibits FXa in a non-competitive manner but also increases PT and aPTT, suggesting an effect on prothrombin conversion (Batista et al., 2010; Branco et al., 2016). Four hypotheses have been proposed to explain the FXa inhibitory mechanism of Amblyomin-X. Firstly, as Amblyomin-X shares amino acid sequence similarities with TAP, it could bind FXA as a slow, tight-binding inhibitor. The second is that the strongly negatively charged COOH-terminal domain of Amblyomin-X could bind to positively charged FXa exosites. Thirdly, an additional binding of the Amblyomin-X NH_2-terminus to the FXa active site could exist. Lastly, Lys30 from the characteristic Kunitz domain loop could bind to the FXa active site (Batista et al., 2010).

The aforementioned **AAS19** serpin from *A. americanum* also appears to be injected into the host during feeding, and enhances feeding success by inhibiting trypsin-like proteases including Fxa, hemostasis, and host immune-defenses (Kim et al., 2015, 2016).

Lastly, and despite not being fully characterized, several other FX(a) inhibitors from different tick species have been reported. Amongst these is an SG protein from the soft tick *O. savignyi*, with an approximate 7 kDa molecular weight and six cysteine residues suggesting a single Kunitz domain. FXa inhibition appears specific, although thrombin was also very weakly inhibited (Gaspar et al., 1996). In *Hyalomma truncatum*, the bont-legged tick, several SG proteins inhibiting both extrinsic and intrinsic coagulation pathways were detected (Joubert et al., 1995). Of these, one 17 kDa nameless protein possesses Factor Xa inhibitory activity and was only identified in females pre-fed for 5–7 days, suggesting involvement in tick feeding process. This FXa inhibition appeared to be non-competitive, in contrast to TAP from *O. moubata*, but similar to another 15 kDa tSPI identified in nymphs of the camel tick, *Hyalomma dromedarii*. This last tSPI totally inhibits FXa but only partially inhibits thrombin activity (30% inhibition). Extremely efficient FXa inhibition could be explained by the presence of two binding sites on the inhibitor (Ibrahim et al., 2001b). Finally, a 65 kDa FXa inhibitor from *R. appendiculatus* was also isolated from SG extracts (Limo et al., 1991). No complexes between FXa and this inhibitor were identified, and it was established that inhibition may occur via exosite binding.

Thrombin Inhibitors

Crude saliva of *R. (B.) microplus* was initially investigated because of its effective bovine plasma coagulation inhibiting properties, and subsequently several thrombin inhibitors were identified. **BmAP** was described as a non-tight binding thrombin inhibitor, possibly dimerized, and which interacts with both thrombin active sites and subsites (Horn et al., 2000). Two **microphilin** isoforms were then discovered, and which are the smallest non-tight binding thrombin inhibitors identified thus far (Ciprandi et al., 2006). Microphilin only interacts with thrombin at exosite I, the crucial site for both fibrinogen and platelet thrombin receptor interactions. **BmGTI**, from the *R. (B.) microplus* midgut, was reported to inhibit fibrinogen cleavage by thrombin (Ricci et al., 2007), via interaction with thrombin's positively charged exosite I (Monteiro, 2005). The serpin **RMS-15** was identified as the highest affinity thrombin inhibitor (Rodriguez-Valle et al., 2015; Xu et al., 2016). RCT assays showed that plasma clotting time is delayed in the presence of RMS-15, in a dose-dependent manner. The elevated RMS-15 IgG titres found in bovine sera after prolonged exposure to tick infestation, and the presence of RMS-15 transcript in SGs and midgut (Rodriguez-Valle et al., 2015), suggest a likely secretion of this serpin into the tick-feeding site, which then acts on host coagulation (Xu et al., 2016). Lastly, a Kunitz-type serine-protease inhibitor harboring two Kunitz domains was isolated from the tick midgut and named **Boophilin** (Macedo-Ribeiro et al., 2008). Boophilin greatly increases TT (Assumpção et al., 2016), significantly affects PT, and increases aPTT, albeit weakly (Macedo-Ribeiro et al., 2008). Boophilin displayed partial effects on plasma kallikrein and weak inhibitory effects on FVIIa, showing probable, but limited, implication in both extrinsic and intrinsic pathways. In addition, boophilin can block amidolytic activity of other trypsin-like serine proteases, most notably trypsin and plasmin (Macedo-Ribeiro et al., 2008). Boophilin is a strong thrombin inhibitor forming a stable thrombin/boophilin complex in a non-canonical manner (Macedo-Ribeiro et al., 2008). The proximal interaction between boophilin and meizothrombin (MzT) suggests that boophilin may not only target circulating thrombin but also the MzT intermediate. When boophilin and MzT are complexed, the boophilin NH_2 terminus remains effectively available and able to bind proximal coagulation factors including FXa.

At the end of the nineteenth century it was demonstrated that *I. ricinus* saliva also contains anticoagulant molecules (Sabbatini, 1899). **Ixin**, a specific thrombin inhibitor, was isolated from adult saliva in 1991 (Hoffmann et al., 1991), and the serpin **Iris**—for "*I. ricinus* immunosuppressor"—was identified in 2002 (Leboulle et al., 2002b). Iris expression is induced in SGs while ticks feed, peaking at day four, coinciding with the period when the *I. ricinus* female ingests the most amount of blood. Iris demonstrates dose-dependent FXa inhibition and inhibits close to 30% of thrombin. Its inhibitory activity arises from the RCL domain where the P1 residue plays a key role, which was confirmed with Iris structural model interactions (Prevot, 2006). Iris hampers fibrinolysis by inhibiting both tissue plasminogen activator (t-PA) and elastase released by leukocytes. It also acts as a hypo-fibrinolytic factor by targeting serine proteases, especially elastase-like proteins, and appears to prevent platelet adhesion via a mechanism independent of its enzyme inhibitory activity (Prevot, 2006). However, even if Iris inhibits several serine proteases in coagulation pathways, it does not appear to be a powerful anticoagulant (Prevot, 2006).

Madanin 1 and 2 have also been identified from SGs of *H. longicornis*, as inhibiting both the intrinsic and extrinsic coagulation pathways (Iwanaga et al., 2003). Madanin proteins do not exhibit any sequence similarities with any other previously identified proteins, do harbor a signal peptide sequence, and interact with thrombin, but not with factor Xa (Iwanaga et al., 2003). Thrombin inhibition by madanins probably involves competitive binding to thrombin's fibrinogen-binding site (anion-binding exosite 1), and not via binding to the active site. They inhibit blood coagulation at an early stage by inhibiting thrombin activation of factors V and VIII, and thus likely contribute considerably to tick blood feeding success (Iwanaga et al., 2003). Another thrombin inhibitor named **Chimadanin** was identified in *H. longicornis* SGs with very weak expression. It was also detected in the hemolymph during nymphal and adult stages from the third day of blood feeding and declines until extinction on the 6th day (Nakajima et al., 2006). Lastly, **Hemalin** with two Kunitz domains, was identified in larval, nymphal, and adult stages, and exhibited highest expression levels during the rapid blood meal sucking period during all tick life stages (Liao et al., 2009). In addition to its role as a thrombin inhibitor, Hemalin also inhibits trypsin activity. Initially discovered in the midgut, Hemalin is also expressed in major tissues of the female tick including SGs, ovaries, hemolymph, and body fat.

In 2014, Ibelli et al. reported the presence of a new tSPI from *I. scapularis* saliva belonging to the serpin family, **IxcS-1E1** (Ibelli et al., 2014). IxcS-1E1 transcript was detected both in SGs and in the midgut of ticks with a dichotomous temporal expression pattern. In SGs, expression is up-regulated from the 24 first hours of feeding, while midgut expression was down-regulated in response to feeding activity (Ibelli et al., 2014). During feeding, IxcS-1E1 is injected into the host and likely prevents platelet aggregation, as it extends clotting time both in aPTT and PT *in vitro* assays. It inhibits thrombin and trypsin activities by forming stable complexes, and also probably inhibits cathepsin G and factor Xa enzymatic activities. Therefore IxcS-1E1 appears to be one of the most important *I. scapularis* saliva proteins mediating tick evasion from the host's hemostatic defense system (Ibelli et al., 2014).

In the *Amblyomma* genus, the **Americanin** protein was isolated from the SGs of *A. americanum*, and was shown to be a slow reversible tight-binding-type thrombin inhibitor (Zhu et al., 1997). Similar to Ixolaris and boophilin, **Amblin** was isolated from the synganglia of engorged *A. hebraeum* females, from where the protein is exported into the hemolymph where it can also be detected (Lai et al., 2004). Without a signal peptide and composed of two Kunitz-like domains, amblin specifically inhibits the thrombin enzyme via an unknown inhibitory mechanism. Crude SG extracts from *A. variegatum*, the tropical bont tick, also exhibited potent anticoagulant activity in the three TT, PT, and aPTT coagulation assays, thus inhibiting at least one factor implicated in the two coagulation pathways (Koh et al., 2007). The TT assay demonstrated the most significant results,

indicating that the major targeted factor is thrombin. **Variegin** was then identified as a protein without any similarities to other tSPIs (Kazimírová et al., 2002). Nevertheless, its NH_2-terminal sequence appears to be a fast competitive tight-binding inhibitor of thrombin. Following HPLC purification, another inhibitor with anti-thrombin effects on human blood platelets and with hirudin-like activity, was also identified from the saliva of *A. variegatum*, but has not been further characterized (Kazimírová et al., 2002).

Hard tick *Hyalomma marginatum rufipes* SG transcriptome investigations unearthed four peptide-encoding sequences, named **hyalomins-1-4**, that showed weak similarity to madanin 1 and 2 from *H. longicornis* (Francischetti et al., 2011). The central core of these polypeptides contains a weakly conserved acidic region that forms a putative serine protease cleavage site. Hyalomin-1 appears to be a specific thrombin inhibitor and noncompetitively binds to its active site, as well as an exosite I, thus significantly extending fibrin clot formation time in whole plasma (Jablonka et al., 2015). It also blocks thrombin activation of coagulation factor XI and factor V. In addition, hyalomin-1 also impedes platelet aggregation by inhibiting thrombin activation of platelet proteinase activated receptor (PAR).

Two thrombin inhibitors from *H. dromedarii* nymphs were also described and named **NTI-1** and **NTI-2** (Ibrahim et al., 2001a). Inhibition assays revealed that NTI-1 inhibits 13% of FXa activity and 65% of thrombin activity, whereas NTI-2 inhibits 100% of FXa activity and 58% of thrombin activity, but with higher affinity for this enzyme than NTI-1. In addition, thrombin inhibition by NTI-1 and NTI-2 is non-competitive and competitive, respectively.

Rhipilin-1, identified in the hard tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*, shares a similar conformation—a unique Kunitz domain—with other thrombin inhibitors such as boophillin, amblin, and hemalin (Gao et al., 2011). The protein, tested on rabbit citrated plasma, has the capacity to extend both RCT and aPTT in a dose-dependent manner. Both tick attachment and engorgement processes require *rhipilin-1* expression, which is consistent with specific gene expression only in fed ticks (Gao et al., 2011). Two other thrombin inhibiting serpins were also identified in this tick species, **serpin-1 (RHS-1)** and **serpin-2 (RHS-2)** (Yu et al., 2013). They share similarities with other tSPIs described in this review including: RHS-1 with lopsins 1 and 2; and RHS-2 with lopsin 7 and RAS-2. Functional characterization indicated that RHS-1 is expressed in SGs of fed ticks and secreted at the tick-host interface during feeding, whereas RHS-2 is only expressed in fed tick midgut (Yu et al., 2013). Inhibition assays showed that both RHS-1 and RHS-2 mostly inhibit chymotrypsin but they also have thrombin inhibitory activity, with maximum inhibition rates of 65.5 and 20%, respectively (Yu et al., 2013). For both, weak FXa inhibition was observed, and neither trypsin nor elastase was inhibited. Anticoagulation assays revealed that aPTT was prolonged in the presence of RHS-1 but not RHS-2. RNAi assays implicated both proteins in tick attachment and engorgement rates, but not in repletion time or average body weight, confirming the role of RHS-1 and RHS-2 in tick blood feeding by blocking blood coagulation (Yu et al., 2013).

Calcaratin was identified from *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *calcaratus* and was able to delay coagulation time in all tests (aPTT, TT, and FCT), via an unknown thrombin inhibition mechanism (Motoyashiki et al., 2003).

Concerning soft ticks, ornithodorin was described from *O. moubata* as a thrombin inhibitor harboring two Kunitz domains (van de Locht et al., 1996). Interactions with thrombin implicate its active and exosite: the NH_2-terminal domain appears to be responsible for the majority of thrombin interaction with two van-der-Waals contacts and hydrogen bonds, whereas the COOH-terminal domain has mostly electrostatic interactions with thrombin (Klingler and Friedrich, 1997). An ornithodorin ortholog was identified in *O. savignyi* SGs, named savignin (Mans et al., 2002). Its NH_2-terminal region seems to be implicated in binding to the thrombin active site, whereas the COOH-terminal domain helix binds to the fibrinogen-recognition exosite domain. Savignin was then described as a slow competitive tight-binding inhibitor that binds to thrombin's fibrinogen-binding exosite for inhibition. It carries a signal peptide substantiating likely secretion during blood feeding (Mans et al., 2002). Lastly, the **monobin**, a slow specific tight-binding thrombin inhibitor, and an ornithodorin and savignin ortholog belonging to the Kunitz family, was also identified in *Argas monolakensis* (Mans et al., 2008). These three tSPIs harbor a non-canonical mechanism of action as inhibition results when their NH_2-terminal residues are inserted into the enzyme active site instead of their active Kunitz loops (van de Locht et al., 1996).

Lastly, studies on salivary gland extracts from *Ixodes holocyclus*, the Australian paralysis tick, showed that thrombin was the main enzyme targeted by salivary anticoagulant molecules, with an uncharacterized mechanism (Anastopoulos et al., 1991).

Vertebrate Host-Immune Modulation by Tick Serine Protease Inhibitors

Because ticks are blood-feeding arthropods requiring hours to weeks to complete their blood meal, they have developed several mechanisms to evade host rejection during this long feeding period (Ribeiro, 1995; Francischetti et al., 2009; Kazimirova and Stibraniova, 2013; Kotal et al., 2015). Their saliva injected into the wound site carries many components able to manipulate vertebrate host responses, including anti-inflammatory compounds as well as immunomodulators acting on both innate and acquired immunity, and among which are included several tSPIs.

In *A. americanum*, the aforementioned anticoagulants **AamS6** and **AAS19** can also target plasmin, known for its role in pro-inflammatory cytokine release, monocyte and dendritic cell chemotaxis, neutrophil attraction, tissue remodeling, and wound healing, suggesting involvement in the regulation of monocyte, macrophage, and dendritic cell functions, and in inflammatory responses (Syrovets et al., 2012). In addition, 17 different serpins called **lopsins** (L1-L17) were found to be expressed in various organs such as SGs, midguts, ovaries, and the carcasses of partially fed *A. americanum* ticks (Mulenga et al., 2007). Sequence analysis revealed the presence of glycosaminoglycan

binding sites on all lopsins, similar to several other proteins involved in the modulation of blood coagulation, inflammatory responses, or immune cell migration (Munoz and Linhardt, 2004). However, further investigations are required to identify their inhibitory targets and to decrypt mechanisms governing lopsins' likely immunomodulatory activities.

Iris from *I. ricinus* is also a powerful immunosuppressive molecule (Leboulle et al., 2002a). It is secreted at the tick-bite site and strongly inhibits elastase-like proteases (leukocyte elastase and pancreatic elastase) with rapid kinetics, thus repressing host inflammation (Prevot, 2006). Iris regulates innate immune mechanisms by suppressing T lymphocyte proliferation and inducing Th2-type immune responses with increased IL-4 and by inhibiting typical Th1 molecule production (IL2, IFN-γ) (Leboulle et al., 2002a). **IRS-2**, another serpin exhibiting specific anti-chymotrypsin activity, was identified from *I. ricinus* SGs (Chmelar et al., 2011). In SGs, IRS-2 is highly expressed at 2 days with maximum expression 6 days after attachment, suggesting a role in the early stage of feeding. IRS-2 inhibits both tissue swelling and neutrophil migration into inflamed tissue, modulates T cell differentiation, and decreases IL-6 production at both protein and mRNA levels in spleen dendritic cells activated by *B. burgdorferi* (Chmelar et al., 2011). In addition, by decreasing STAT-3 signaling molecule phosphorylation, IRS-2 impairs Th17 cell development (Páleníková et al., 2015). IRS-2 is also the only known serpin that targets both cathepsin G and chymase. Both of these proteases are secreted following neutrophil (cathepsin G) and mast cell (chymase) activation, and are involved in a huge range of physiological processes associated with the acute inflammatory response, particularly in crosstalk between neutrophils and platelets (Zarbock et al., 2007). IRS-2 also affects thrombin-induced platelet aggregation, thus likely playing multiple roles in inflammation and hemostasis particularly through the modulation of PAR activation (Chmelar et al., 2011).

The serpin **Ipis-1**, which shares 95.5% sequence identity with Iris, was isolated from SGs of fed *Ixodes persulcatus* and may be associated with immunomodulatory effects on both innate and acquired immune responses (Toyomane et al., 2016). Ipis-1 may directly interact with and inhibit T cells and $CD14^+$ cells (mainly macrophages, neutrophils, and dendritic cells), with an as yet unidentified inhibitory mechanism. Similarly, Ipis-1 affects cytokine and chemokine activity via currently unknown mechanisms (Toyomane et al., 2016).

Based on previous *I. scapularis* sialome exploration (Ribeiro et al., 2006), a salivary Kunitz inhibitor with unusual structure was characterized and named **tryptogalinin** (Dai et al., 2012; Valdés et al., 2013). Tryptogalinin has a broad spectrum (potentially explained by the presence of three intrinsic disordered regions) and a high affinity for serine proteases playing an important role in inflammation and host immune responses (Heutinck et al., 2010). In fact, tryptogalinin inhibits trypsin, α-chymotrypsin, plasmin, matriptase, elastase, and especially human skin β tryptase found in mast cells (Valdés et al., 2013). Mast cell β-tryptase has a key role in host-inflammatory responses by stimulating chemoattractant release, such as IL-8, and by inducing IL-1β mRNA expression (Caughey, 2007). Tryptogalinin causes excitation of sensory neurons and has anti-inflammatory activity by repressing tryptase-PAR type 2 activation which normally mobilizes intracellular calcium stores to increase intracellular Ca^{2+} concentrations (Payne and Kam, 2004).

The glycosylated Kunitz inhibitor, **TdPI** (tick-derived protease inhibitor), was isolated from SGs of *R. appendiculatus* adult females (Paesen et al., 2007). *TdPI* is only expressed during the four first hours of feeding and manipulates host-immune defenses during the tick feeding process. TdPI potently inhibits trypsin and moderately affects human plasmin and human tryptase activity (Paesen et al., 2007). Mast cells and eosinophils initiate and/or amplify inflammation at the tick feeding site, mostly via the production and degranulation of several pro-inflammatory molecules such as histamine and tryptase. Accordingly, TdPI transcription coincides with that of RaHBPs (*R. appendiculatus* Histamine-Binding Proteins) known to sequester histamine in ticks (Paesen et al., 1999), thus highlighting a probable role for TdPI as a human tryptase inhibitor via complex formation (Paesen et al., 2007). In addition, TdPI may bind to tryptase inside mast cells, and may suppress its autocatalytic activation step (Sakai et al., 1996).

In *R. (B.) microplus*, **BmSI 7** inhibitor regulates bovine neutrophil elastase pro-inflammation activity, due to its strong elastase inhibitory activity. Thus by reducing inflammation and/or avoiding tick tissue degradation, it enables the tick to thwart the host immune system (Sasaki et al., 2008). Similarly, **RMS-3** is likely secreted into tick saliva during feeding, and carries a B-Lymphocyte epitope, highlighting a probable role in host-immune response modulation (Rodriguez-Valle et al., 2012). Finally, 12 further proteins have been extracted from *R. (B.) microplus* larvae, initially **BmTI A-F**, then **BmTI 1-7**, among which only **BmTI 2** and **BmTI 3** were further characterized as follows (Sasaki et al., 2004). Both BmTIs were classified into the BPTI-Kunitz family as they are suspected to have two Kunitz domains. Both inhibit trypsin and hNE, BmTI 2 demonstrating greater trypsin inhibition, and BmTI 3 stronger hNE inhibition, suggesting a role inhibiting the host's inflammatory response (Sasaki et al., 2004).

Host Angiogenesis and Apoptosis Induction

While ticks are biting, they must control and limit wound neovascularization and cell proliferation responses to enable blood meal uptake. Thus, they inject salivary proteins to favor apoptosis and slow down neovascularization as reported for *I. scapularis* (Francischetti et al., 2005a), and interestingly, tSPIs have also been implicated in this role.

Significant similarities are shared between **BmCI** from *R.(B.) microplus* (Lima et al., 2010) and dendrotoxins. Dendrotoxins are non-inhibitory Kunitz proteins able to block different ion channels (Na^+, K^+, Ca^+) involved in both cell proliferation (Lang et al., 2005) and apoptosis (Nutt et al., 2002). BmCI appears to be highly cytotoxic and causes fibroblast cell death via pro-apoptotic activity, without affecting cell cycle integrity, likely by Ca^+ channel activity regulation (Lima et al., 2010).

Haemangin was identified as a salivary Kunitz inhibitor from *H. longicornis* carrying one single Kunitz domain, which is up-regulated during blood feeding (Islam et al., 2009). It strongly inhibits trypsin and chymotrypsin, poorly inhibits elastase, and is able to efficiently stimulate degradation of both heavy and light plasmin chains during fibrinolysis, therefore strongly supporting plasmin-dependent fibrinolysis inhibition (Islam et al., 2009). Haemangin also inhibits chick aortic explant angiogenesis; human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) differentiation, proliferation, and tube formation; and chick ChorioAlantoic Membrane (CAMs) neovascularization, demonstrating that it can impede with both pre-existing vessel angiogenesis and neovascularization (Islam et al., 2009). Haemangin also significantly induces apoptosis in HUVECs (Nagata, 2000), and affects wound healing in an artificially wounded HUVEC monolayer (Islam et al., 2009). Anti-haemangin RNAi experiments showed that ticks completely failed to make blood pools by 72 h and achieved significantly diminished engorgement by 144 h, while control ticks become engorged by 120 h, with the simultaneous increase of neovascularization in knockdown ticks (Islam et al., 2009). High-throughput studies also indicated that Haemangin can utilize multiple intracellular signaling pathways to negatively regulate angiogenesis, and angiogenesis-dependent wound healing (Islam et al., 2009). Interestingly, it was noticed that soft ticks—which are fast blood-feeders compared to hard tick—lack Haemangin homologs, thereby highlighting the importance of these molecules during the long blood feeding processes of hard ticks (Francischetti et al., 2005a).

BmTI-A from *R. (B.) microplus* also strongly inhibits neovascularization, and prevents new vessel formation *in vitro* by inhibiting plasma kallikrein, plasmin, and elastase (Soares et al., 2016). In addition, BmTI-A inhibits endothelial cell viability and proliferation through kallikrein inhibition (Lang et al., 2005), leading to an absence of bradykinin release, which normally stimulates cell growth and survival (Andoh et al., 2010). The inhibition of plasma kallikrein and plasmin by BmTI-A prevents angiogenic growth factor release during tick infestation, thereby averting cell adhesion mechanisms (Soares et al., 2016). Neutrophil elastase degrades a broad spectrum of extracellular matrix and cell surface proteins, and the release of growth factors such as TGF-β, PDGF, and VEGF, induces cell proliferation and migration. By inhibiting neutrophil elastase, BmTI-A could also inhibit angiogenesis (Wada et al., 2007). BmTI-A is also believed to have an inhibitory action on both vessel formation and wound healing, thus enabling *R. (B.) microplus* to continue feeding (Soares et al., 2012).

Finally, the anticoagulant **Amblyomin-X** from *A. cajennense* can also act as a proteasome inhibitor (Chudzinski-Tavassi et al., 2010). Amblyomin-X demonstrates cytotoxicity in different tumor cells lines, but not in healthy human fibroblast cells (Chudzinski-Tavassi et al., 2010; Morais et al., 2016). In human tumor cells, Amblyomin-X alters the expression of several genes related to the cell cycle (related to the G0/G1 phase, as supported by observed G0/G1 alterations), causes endoplasmic reticulum stress marker accumulation, slightly modulates intracellular calcium concentration [$Ca2^{+}$], causes mitochondrial dysfunction, cytochrome C release, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage, and activates the caspase cascade (Chudzinski-Tavassi et al., 2010; Morais et al., 2016). Additional *in vitro* assays on endothelial cells showed that Amblyomin-X delays the cell cycle, inhibits cell proliferation and adhesion, tube formation, and membrane expression of the platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) (Drewes et al., 2012). *In vivo*, Amblyomin-X reduces tumoral mass in a murine melanoma model, decreases the number of metastatic events (Chudzinski-Tavassi et al., 2010), and also inhibits VEGF-A-induced angiogenesis in the dorsal subcutaneous tissue in mice (Drewes et al., 2012). Similar effects were observed in chicken chorioallantoic membrane (CAM). These investigations confirm the anti-tumorigenic and anti-angiogenic properties of Amblyomin-X.

SERINE PROTEASE INHIBITORS INVOLVED IN TICK-BORNE PATHOGEN DEVELOPMENT AND TRANSMISSION

During tick feeding, all the above-mentioned molecules modulating host immune responses and homeostasis create an environment conducive to pathogen transmission and host infection (Brossard and Wikel, 2004; Nuttall and Labuda, 2004; Ramamoorthi et al., 2005; Wikel, 2013). Several tick molecules directly implicated in pathogen transmission have also been identified. They either facilitate pathogen development in the tick vector, or enhance pathogen transmission to the vertebrate host (Liu and Bonnet, 2014). Among them, a few tSPIs have been shown to affect pathogen development and/or transmission (**Figure 2**, **Table 2**) but, in all cases, the precise mechanisms involved remain unknown.

Two-dimensional electrophoresis of total proteins from fully engorged *R. (B.) microplus* adults revealed **BmTI-A** up-regulation in *B. bovis*-infected ticks. This differential expression suggests a putative role for this protein in the tick's immune system, to either limit the potentially detrimental proliferation of the parasite in the vector, or as a molecule required for parasite development and/or colonization of tick tissues (Rachinsky et al., 2007). It is noticeable that the expression of BmTI-A in tick ovaries is coherent with the vertically transmission that occurs for this parasite from the female to the next generation.

DvKPI from *D. variabilis* reduces burden of the obligate intracellular bacteria *R. montanensis* at 24 h post-infection in L929 mouse fibroblasts *in vitro* (Ceraul et al., 2008), and associations between the inhibitor and the bacteria have been reported, thus it was hypothesized that bacteria may express trypsin-like proteases on their outer surface (Ceraul et al., 2011). Alternatively, DvKPI may be implicated in recruiting host factors, such as plasminogen activation system factors facilitating midgut epithelium transmigration, as has been demonstrated for *B. burgdorferi* (Coleman et al., 1997). Therefore DvKPI might be involved in both the tick immune system and in *Rickettsia* development (Walker et al., 1984).

In *I. ricinus*, a comparison of *Bartonella henselae*-infected or non-infected SG transcriptomes led to the discovery of **IrSPI**

(*Ixodes ricinus* serine protease inhibitor), a Kunitz inhibitor with the highest expression following bacterial infection (Liu et al., 2014). It was demonstrated that *B. henselae*, a facultative intracellular bacterium responsible for cat-scratch disease, can be transmitted by *I. ricinus* through the injection of saliva (Cotté et al., 2008). RNAi experiments showed that when *IrSPI* expression was significantly knocked down, both the weight of engorged ticks and *B. henselae* SG load were significantly decreased, suggesting IrSPI involvement in blood feeding, as well as in SG bacterial development (Liu et al., 2014).

Lastly, Lyme disease caused by bacteria from the *Borrelia* genus is unquestionably the predominant concern for the Northern latitude (Dantas-Torres et al., 2012) and several studies concern their transmission by tick from the *Ixodes* genus. **Ixophilin**-immunized mouse assays showed that despite no effects on *Borrelia burgdorferi* burden in *I. scapularis* tick midgut, significantly increased *B. burgdorferi* burden in the skin, heart, and bladder of immunized mice was observed, suggesting a probable role in *B. burgdorferi* transmission to and/or development in the host (Narasimhan et al., 2013).

APPLICATIONS IN TICK CONTROL

To date, acaricides are mainly used to control ticks. But their use has several detrimental effects, including a negative impact on the environment and non-targeted species, as well as an associated rise in resistant tick strains. Thus new effective control measures are urgently required, such as anti-tick vaccines. Vaccines that target important molecules implicated in tick feeding processes and physiology could decrease tick populations and limit transmission of a vast number of pathogens. This is the manner in which the only two commercially-available anti-tick vaccines—based on an *R. (B.) microplus* midgut protein—are believed to function (Kemp et al., 1989). By targeting tick molecules implicated in pathogen establishment, development and transmission, vaccines could also completely impair pathogen transmission.

Several tSPIs have been investigated as possible targets to create anti-tick vaccines. First, a combination of **RAS-1 and -2** *R. appendiculatus* serpins was tested on cattle (Imamura et al., 2006). Results showed that the cumulative number of engorged nymphs and adults fed on vaccinated cattle was significantly lower compared to controls, tick mortality rates were significantly higher, and eggs masses from females were lower. But for ticks that did feed, feeding duration as well as engorgement weight did not differ between the two tick groups.

BmTIs from *R. (B.) microplus* have also been used in cattle immunization assays. A reduction in the total number of engorged ticks was observed (72.8%), as well as reduced engorged female weight in vaccinated animals comparing to controls (Andreotti et al., 2002).

The Serpin-1 (**HLS-1**) from *H. longicornis* was also evaluated as a vaccine candidate against tick infestation (Sugino et al., 2003). No differences in feeding duration or engorgement weight between vaccinated rabbits and controls groups were observed, but a significant increase in tick mortality rates was reported for ticks fed on vaccinated animals. As rabbit anti-tick immunity compromised tick physiology of both nymphs and adults, these promising results support HLS-1 as a vaccine cocktail component, along with other previously characterized antigens (Mulenga et al., 1999; Tsuda et al., 2001).

Another trypsin inhibitor from *R. (B). microplus* was recently identified due to its homology with BmTI. Named **RmLTI**—for *R. (B.) microplus* larval trypsin inhibitor—it belongs to the Kunitz inhibitor family (Guerrero et al., 2005; Andreotti et al., 2012). RmLTI's role is completely unknown, but due to encouraging results reported for BmTIs, RmLTI's potential as a vaccine antigen was also tested in cattle. Vaccination with recombinant RmLTI showed that the average weight of engorged ticks was significantly lower after feeding on vaccinated cattle for up to 9 days after vaccination, but then remained equivalent from days 9–13, probably due to declining antibody levels (Andreotti et al., 2012). However, ticks detaching from RmLTI-immunized cattle still appeared to be affected at day 13, and while no differences were observed in egg laying, significant effects were observed on egg viability, eclosion rate, as well as larval hatchability (Andreotti et al., 2012).

CONCLUSION

The goal of this review was to comprehensively describe the varied roles of tSPIs in both tick physiology and vertebrate host response modulation following tick bite, emphasizing their vital roles in tick-host-pathogen interactions. tSPIs are thus involved in essential processes such as tick's innate immune system and hemolymph clotting. In addition, some tSPIs expressed in ovaries and eggs are essential for tick development, oviposition and egg laying. Some ovary-expressed inhibitors are also utilized by eggs to avoid self-proteolysis and protection against foreign micro-organisms. Ticks have been obligatory blood feeding arthropods for more than 90 million years, as such, they've developed and adapted appropriate molecules to facilitate their extremely efficient feeding processes. Several tSPIs are implicated in blood uptake and digestion in the tick midgut, SGs, and at the wound feeding pool on the host. In addition to immunomodulation and angiogenesis suppression, most tSPIs inhibit blood coagulation, often via FXa and thrombin targeting, enabling effective blood intake. Some tSPIs have also been reported to be involved in direct pathogen establishment and/or transmission, and also by creating opportune conditions to facilitate pathogen transmission from ticks to hosts. Such a wide spectrum of actions ensures that tSPIs are attractive and promising target candidates in anti-tick vaccine strategies to block tick feeding and/or TBP transmission.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AB and SB conducted the literature research and prepared the figures and tables. SB, AB, and TF wrote the paper, provided critical review, and revisions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank members of the "Tiques et Maladies à Tiques" group (REID-Réseau Ecologie des Interactions Durables) for fruitful discussions.

REFERENCES

Abreu, P. A., Soares, T. S., Buarque, D. S., Torquato, R. S., and Tanaka, A. S. (2014). RmKK, a tissue kallikrein inhibitor from *Rhipicephalus microplus* eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 449, 69–73. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.154

Adakal, H., Stachurski, F., and Chevillon, C. (2013). Tick control practices in Burkina Faso and acaricide resistance survey in Rhipicephalus (Boophilus) geigyi (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 59, 483–491. doi: 10.1007/s10493-012-9610-5

Aird, W. C. (2003). Hemostasis and irreducible complexity. *J. Thromb. Haemost.* 1, 227–230. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00062.x

Alim, M. A., Islam, M. K., Anisuzzaman, Miyoshi, T., Hatta, T., Yamaji, K., et al. (2012). A hemocyte-derived Kunitz–BPTI-type chymotrypsin inhibitor, HlChI, from the Ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, plays regulatory functions in tick blood-feeding processes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 925–934. doi: 10.1016/j.ibmb.2012.09.005

Anastopoulos, P., Thurn, M. J., and Broady, K. W. (1991). Anticoagulant in the tick *Ixodes holocyclus*. *Aust. Vet. J.* 68, 366–367. doi: 10.1111/j.1751-0813.1991.tb00740.x

Anderson, J. M., Sonenshine, D. E., and Valenzuela, J. G. (2008). Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC Genomics* 9:552. doi: 10.1186/1471-2164-9-552

Andoh, T., Akira, A., Saiki, I., and Kuraishi, Y. (2010). Bradykinin increases the secretion and expression of endothelin-1 through kinin B2 receptors in melanoma cells. *Peptides* 31, 238–241. doi: 10.1016/j.peptides.2009.12.003

Andreotti, R., Cunha, R. C., Soares, M. A., Guerrero, F. D., Leivas Leite, F. P., and Pérez de León, A. A. (2012). Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine* 30, 6678–6685. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.08.066

Andreotti, R., Gomes, A., Malavazi-Piza, K. C., Sasaki, S. D., Sampaio, C. A., and Tanaka, A. S. (2002). BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *Int. Immunopharmacol.* 2, 557–563. doi: 10.1016/S1567-5769(01)00203-X

Andreotti, R., Malavazi-Piza, K. C., Sasaki, S. D., Torquato, R. J., Gomes, A., and Tanaka, A. S. (2001). Serine proteinase inhibitors from eggs and larvae of tick *Boophilus microplus*: purification and biochemical characterization. *J. Protein Chem.* 20, 337–343. doi: 10.1023/A:1012242817869

Armstrong, P. B., Rossner, M. T., and Quigley, J. P. (1985). An alpha 2-macroglobulinlike activity in the blood of chelicerate and mandibulate arthropods. *J. Exp. Zool.* 236, 1–9. doi: 10.1002/jez.1402360102

Ascenzi, P., Bocedi, A., Bolognesi, M., Spallarossa, A., Coletta, M., De Cristofaro, R., et al. (2003). The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4, 231–251. doi: 10.2174/1389203033487180

Assumpção, T. C., Ma, D., Mizurini, D. M., Kini, R. M., Ribeiro, J. M. C., Kotsyfakis, M., et al. (2016). *In vitro* mode of action and anti-thrombotic activity of boophilin, a multifunctional kunitz protease inhibitor from the midgut of a tick vector of Babesiosis, *Rhipicephalus microplus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004298. doi: 10.1371/journal.pntd.0004298

Batista, I. F., Ramos, O. H., Ventura, J. S., Junqueira-de-Azevedo, I. L., Ho, P. L., and Chudzinski-Tavassi, A. M. (2010). A new factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Arch. Biochem. Biophys.* 493, 151–156. doi: 10.1016/j.abb.2009.10.009

Bissinger, B. W., Donohue, K. V., Khalil, S. M., Grozinger, C. M., Sonenshine, D. E., Zhu, J., et al. (2011). Synganglion transcriptome and developmental global gene expression in adult females of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Insect Mol. Biol.* 20, 465–491. doi: 10.1111/j.1365-2583.2011.01086.x

Branco, V. G., Iqbal, A., Alvarez-Flores, M. P., Sciani, J. M., de Andrade, S. A., Iwai, L. K., et al. (2016). Amblyomin-X having a Kunitz-type homologous domain, is a noncompetitive inhibitor of FXa and induces anticoagulation *in vitro* and *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 1864, 1428–1435. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.07.011

Brossard, M., and Wikel, S. K. (2004). Tick immunobiology. *Parasitology* 129(Suppl.), S161–S176. doi: 10.1017/S0031182004004834

Buresová, V., Franta, Z., and Kopácek, P. (2006). A comparison of *Chryseobacterium indologenes* pathogenicity to the soft tick *Ornithodoros moubata* and hard tick *Ixodes ricinus*. *J. Invertebr. Pathol.* 93, 96–104. doi: 10.1016/j.jip.2006.05.006

Buresova, V., Hajdusek, O., Franta, Z., Sojka, D., and Kopacek, P. (2009). IrAM—an α2-macroglobulin from the hard tick *Ixodes ricinus*: characterization and function in phagocytosis of a potential pathogen *Chryseobacterium indologenes*. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 489–498. doi: 10.1016/j.dci.2008.09.011

Cao, J., Shi, L., Zhou, Y., Gao, X., Zhang, H., Gong, H., et al. (2013). Characterization of a new Kunitz-type serine protease inhibitor from the hard tick *Rhipicephalus hemaphysaloides*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 84, 104–113. doi: 10.1002/arch.21118

Caughey, G. H. (2007). Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol. Rev.* 217, 141–154. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00509.x

Ceraul, S. M., Chung, A., Sears, K. T., Popov, V. L., Beier-Sexton, M., Rahman, M. S., et al. (2011). A Kunitz protease inhibitor from *Dermacentor variabilis*, a vector for spotted fever group rickettsiae, limits *Rickettsia montanensis* invasion. *Infect. Immun.* 79, 321–329. doi: 10.1128/IAI.00362-10

Ceraul, S. M., Dreher-Lesnick, S. M., Gillespie, J. J., Rahman, M. S., and Azad, A. F. (2007). New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge. *Infect. Immun.* 75, 1973–1983. doi: 10.1128/IAI.01815-06

Ceraul, S. M., Dreher-Lesnick, S. M., Mulenga, A., Rahman, M. S., and Azad, A. F. (2008). Functional characterization and novel rickettsiostatic effects of a Kunitz-type serine protease inhibitor from the tick *Dermacentor variabilis*. *Infect. Immun.* 76, 5429–5435. doi: 10.1128/IAI.00866-08

Cerenius, L., Liu, H., Zhang, Y., Rimphanitchayakit, V., Tassanakajon, A., Gunnar Andersson, M., et al. (2010). High sequence variability among hemocyte-specific Kazal-type proteinase inhibitors in decapod crustaceans. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 69–75. doi: 10.1016/j.dci.2009.08.005

Chalaire, K. C., Kim, T. K., Garcia-Rodriguez, H., and Mulenga, A. (2011). *Amblyomma americanum* (L.) (Acari: Ixodidae) tick salivary gland serine protease inhibitor (serpin) 6 is secreted into tick saliva during tick feeding. *J. Exp. Biol.* 214, 665–673. doi: 10.1242/jeb.052076

Chand, H. S., Schmidt, A. E., Bajaj, S. P., and Kisiel, W. (2004). Structure-function analysis of the reactive site in the first Kunitz-type domain of human tissue factor pathway inhibitor-2. *J. Biol. Chem.* 279, 17500–17507. doi: 10.1074/jbc.M400802200

Chmelar, J., Kotal, J., Karim, S., Kopacek, P., Francischetti, I. M., Pedra, J. H., et al. (2016). Sialomes and mialomes: a systems-biology view of tick tissues and tick-host interactions. *Trends Parasitol.* 32, 242–254. doi: 10.1016/j.pt.2015.10.002

Chmelar, J., Oliveira, C. J., Rezacova, P., Francischetti, I. M. B., Kovarova, Z., Pejler, G., et al. (2011). A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood* 117, 736–744. doi: 10.1182/blood-2010-06-293241

Chudzinski-Tavassi, A. M., De-Sá-Júnior, P. L., Simons, S. M., Maria, D. A., de Souza Ventura, J., de Fátima Correia Batista, I., et al. (2010). A new tick Kunitz-type inhibitor, amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. *Toxicon* 56, 1145–1154. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.04.019

Ciprandi, A., de Oliveira, S. K., Masuda, A., Horn, F., and Termignoni, C. (2006). *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Exp. Parasitol.* 114, 40–46. doi: 10.1016/j.exppara.2006.02.010

Coleman, J. L., Gebbia, J. A., Piesman, J., Degen, J. L., Bugge, T. H., and Benach, J. L. (1997). Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell* 89, 1111–1119. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80298-6

Cotté, V., Bonnet, S., Le Rhun, D., Le Naour, E., Chauvin, A., Boulouis, H. J., et al. (2008). Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerging Infect. Dis.* 14, 1074–1080. doi: 10.3201/eid1407.071110

Cotté, V., Sabatier, L., Schnell, G., Carmi-Leroy, A., Rousselle, J. C., Arsene-Ploetze, F., et al. (2014). Differential expression of *Ixodes ricinus* salivary gland proteins in the presence of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. *J. Proteomics* 96, 29–43. doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.033

Creighton, T. E. (1975). The two-disulphide intermediates and the folding pathway of reduced pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* 95, 167–199. doi: 10.1016/0022-2836(75)90389-7

Dai, S.-X., Zhang, A.-D., and Huang, J.-F. (2012). Evolution, expansion and expression of the Kunitz/BPTI gene family associated with long-term blood feeding in *Ixodes scapularis*. *BMC Evol. Biol.* 12:4. doi: 10.1186/1471-2148-12-4

Dantas-Torres, F., Chomel, B. B., and Otranto, D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol.* 28, 437–446. doi: 10.1016/j.pt.2012.07.003

Decrem, Y., Rath, G., Blasioli, V., Cauchie, P., Robert, S., Beaufays, J., et al. (2009). Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis. *J. Exp. Med.* 206, 2381–2395. doi: 10.1084/jem.20091007

De Meneghi, D., Stachurski, F., and Adakal, H. (2016). Experiences in tick control by Acaricide in the traditional cattle sector in Zambia and Burkina Faso: possible environmental and public health implications. *Front Public Health* 4:239. doi: 10.3389/fpubh.2016.00239

Drewes, C. C., Dias, R. Y. S., Hebeda, C. B., Simons, S. M., Barreto, S. A., Ferreira, J. M., et al. (2012). Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. *Toxicon* 60, 333–340. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.04.349

Egekwu, N., Sonenshine, D. E., Bissinger, B. W., and Roe, R. M. (2014). Transcriptome of the female synganglion of the black-legged tick *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with comparison between Illumina and 454 systems. *PLoS ONE* 9:e102667. doi: 10.1371/journal.pone.0102667

Ehebauer, M. T., Mans, B. J., Gaspar, A. R., and Neitz, A. W. (2002). Identification of extrinsic blood coagulation pathway inhibitors from the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp. Parasitol.* 101, 138–148. doi: 10.1016/S0014-4894(02)00102-9

Fogaça, A. C., Almeida, I. C., Eberlin, M. N., Tanaka, A. S., Bulet, P., and Daffre, S. (2006). Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides* 27, 667–674. doi: 10.1016/j.peptides.2005.07.013

Francischetti, I. M. B., Anderson, J. M., Manoukis, N., Pham, V. M., and Ribeiro, J. M. C. (2011). An insight into the sialotranscriptome and proteome of the coarse bontlegged tick, *Hyalomma marginatum* rufipes. *J. Proteomics* 74, 2892–2908. doi: 10.1016/j.jprot.2011.07.015

Francischetti, I. M. B., Mather, T. N., and Ribeiro, J. M. C. (2005a). Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Thromb. Haemost.* 94, 167. doi: 1160/th04-09-0566

Francischetti, I. M., Mather, T. N., and Ribeiro, J. M. (2004). Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thromb. Haemost.* 91, 886–898. doi: 10.1160/TH03-11-0715

Francischetti, I. M., My Pham, V., Mans, B. J., Andersen, J. F., Mather, T. N., Lane, R. S., et al. (2005b). The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 1142–1161. doi: 10.1016/j.ibmb.2005.05.007

Francischetti, I. M., Sa-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M., and Ribeiro, J. M. (2009). The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* 14, 2051–2088. doi: 10.2741/3363

Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G., Andersen, J. F., Mather, T. N., and Ribeiro, J. M. (2002). Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 99, 3602–3612. doi: 10.1182/blood-2001-12-0237

Franta, Z., Frantova, H., Konvickova, J., Horn, M., Sojka, D., Mares, M., et al. (2010). Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasit. Vectors* 3:119. doi: 10.1186/1756-3305-3-119

Fredslund, F., Laursen, N. S., Roversi, P., Jenner, L., Oliveira, C. L., Pedersen, J. S., et al. (2008). Structure of and influence of a tick complement inhibitor on human complement component 5. *Nat. Immunol.* 9, 753–760. doi: 10.1038/ni.1625

Gao, X., Shi, L., Zhou, Y., Cao, J., Zhang, H., and Zhou, J. (2011). Characterization of the anticoagulant protein Rhipilin-1 from the *Rhipicephalus haemaphysaloides* tick. *J. Insect Physiol.* 57, 339–343. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.12.001

Garcia, G. R., Gardinassi, L. G., Ribeiro, J. M., Anatriello, E., Ferreira, B. R., Moreira, H. N., et al. (2014). The sialotranscriptome of Amblyomma triste, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. *Parasit. Vectors* 7:430. doi: 10.1186/1756-3305-7-430

Gaspar, A., Joubert, A. M., Crause, J. C., and Neitz, A. W. H. (1996). Isolation and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp. Appl. Acarol.* 20, 583–598.

Grzesiak, A., Helland, R., Smalas, A. O., Krowarsch, D., Dadlez, M., and Otlewski, J. (2000). Substitutions at the P(1) position in BPTI strongly affect the association energy with serine proteinases. *J. Mol. Biol.* 301, 205–217. doi: 10.1006/jmbi.2000.3935

Gubb, D., Sanz-Parra, A., Barcena, L., Troxler, L., and Fullaondo, A. (2010). Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. *Biochimie* 92, 1749–1759. doi: 10.1016/j.biochi.2010.09.004

Gudderra, N. P., Sonenshine, D. E., Apperson, C. S., and Roe, R. M. (2002). Hemolymph proteins in ticks. *J. Insect Physiol.* 48, 269–278. doi: 10.1016/S0022-1910(02)00050-1

Guerrero, F. D., Miller, R. J., Rousseau, M. E., Sunkara, S., Quackenbush, J., Lee, Y., et al. (2005). BmiGI: a database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 585–595. doi: 10.1016/j.ibmb.2005.01.020

Hajdusek, O., Sima, R., Ayllon, N., Jalovecka, M., Perner, J., de la Fuente, J., et al. (2013). Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:26. doi: 10.3389/fcimb.2013.00026

Heutinck, K. M., ten Berge, I. J. M., Hack, C. E., Hamann, J., and Rowshani, A. T. (2010). Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Mol. Immunol.* 47, 1943–1955. doi: 10.1016/j.molimm.2010.04.020

Hoffmann, A., Walsmann, P., Riesener, G., Paintz, M., and Markwardt, F. (1991). Isolation and characterization of a thrombin inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*. *Pharmazie* 46, 209–212.

Horn, F., Coutinho dos Santos, P. C., and Termignoni, C. (2000). *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 68–73. doi: 10.1006/abbi.2000.2076

Huntington, J. A. (2011). Serpin structure, function and dysfunction. *J. Thromb. Haemost.* 9(Suppl. 1), 26–34. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04360.x

Huntington, J. A., Read, R. J., and Carrell, R. W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 407, 923–926. doi: 10.1038/35038119

Ibelli, A. M. G., Kim, T. K., Hill, C. C., Lewis, L. A., Bakshi, M., Miller, S., et al. (2014). A blood meal-induced *Ixodes scapularis* tick saliva serpin inhibits trypsin and thrombin, and interferes with platelet aggregation and blood clotting. *Int. J. Parasitol.* 44, 369–379. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.01.010

Ibrahim, M. A., Ghazy, A.-H., Maharem, T., and Khalil, M. (2001a). Isolation and properties of two forms of thrombin inhibitor from the nymphs of the camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 25, 675–698. doi: 10.1023/A:1016136207308

Ibrahim, M. A., Ghazy, A. H., Maharem, T. M., and Khalil, M. I. (2001b). Factor Xa (FXa) inhibitor from the nymphs of the camel tick *Hyalomma dromedarii*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 130, 501–512. doi: 10.1016/S1096-4959(01)00459-6

Imamura, S., da Silva Vaz Junior, I., Sugino, M., Ohashi, K., and Onuma, M. (2005). A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine* 23, 1301–1311. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.08.041

Imamura, S., Namangala, B., Tajima, T., Tembo, M. E., Yasuda, J., Ohashi, K., et al. (2006). Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vaccine* 24, 2230–2237. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.10.055

Irving, J. A., Pike, R. N., Dai, W., Bromme, D., Worrall, D. M., Silverman, G. A., et al. (2002). Evidence that serpin architecture intrinsically supports papain-like cysteine protease inhibition: engineering alpha(1)-antitrypsin to inhibit cathepsin proteases. *Biochemistry* 41, 4998–5004. doi: 10.1021/bi0159985

Islam, M. K., Tsuji, N., Miyoshi, T., Alim, M. A., Huang, X., Hatta, T., et al. (2009). The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick blood-feeding success. *PLoS Pathog.* 5:e1000497. doi: 10.1371/journal.ppat.1000497

Iwanaga, S., Okada, M., Isawa, H., Morita, A., Yuda, M., and Chinzei, Y. (2003). Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Eur. J. Biochem.* 270, 1926–1934. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03560.x

Jablonka, W., Kotsyfakis, M., Mizurini, D. M., Monteiro, R. Q., Lukszo, J., Drake, S. K., et al. (2015). Identification and mechanistic analysis of a novel tick-derived inhibitor of thrombin. *PLoS ONE* 10:e0133991. doi: 10.1371/journal.pone.0133991

Joubert, A. M., Crause, J. C., Gaspar, A., Clarke, F. C., Spickett, A. M., and Neitz, A. W. H. (1995). Isolation and characterization of an anticoagulant present in

the salivary glands of the bont-legged tick, *Hyalomma truncatum*. *Exp. Appl. Acarol.* 19, 79–92. doi: 10.1007/BF00052548

Kato, N., Iwanaga, S., Okayama, T., Isawa, H., Yuda, M., and Chinzei, Y. (2005a). Identification and characterization of the plasma kallikrein-kinin system inhibitor, haemaphysalin, from hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Thromb. Haemost.* 93, 359–367. doi: 10.1160/TH04-05-0319

Kato, N., Okayama, T., Isawa, H., Yuda, M., Chinzei, Y., and Iwanaga, S. (2005b). Contribution of the N-terminal and C-terminal domains of haemaphysalin to inhibition of activation of plasma kallikrein-kinin system. *J. Biochem.* 138, 225–235. doi: 10.1093/jb/mvi123

Kazimírová, M., Jancinová, V., Petríková, M., Takác, P., Labuda, M., and Nosál, R. (2002). An inhibitor of thrombin-stimulated blood platelet aggregation from the salivary glands of the hard tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 28, 97–105. doi: 10.1023/A:1025398100044

Kazimirova, M., and Stibraniova, I. (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:43. doi: 10.3389/fcimb.2013.00043

Keller, P. M., Waxman, L., Arnold, B. A., Schultz, L. D., Condra, C., and Connolly, T. M. (1993). Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* 268, 5450–5456.

Kemp, D. H., Pearson, R. D., Gough, J. M., and Willadsen, P. (1989). Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. *Exp. Appl. Acarol.* 7, 43–58. doi: 10.1007/BF01200452

Khan, M. S., Singh, P., Azhar, A., Naseem, A., Rashid, Q., Kabir, M. A., et al. (2011). Serpin inhibition mechanism: a delicate balance between native metastable state and polymerization. *J. Amino Acids* 2011:606797. doi: 10.4061/2011/606797

Kim, T. K., Radulovic, Z., and Mulenga, A. (2016). Target validation of highly conserved *Amblyomma americanum* tick saliva serine protease inhibitor 19. *Ticks Tick Borne Dis.* 7, 405–414. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.12.017

Kim, T. K., Tirloni, L., Radulovic, Z., Lewis, L., Bakshi, M., Hill, C., et al. (2015). Conserved *Amblyomma americanum* tick Serpin19, an inhibitor of blood clotting factors Xa and XIa, trypsin and plasmin, has anti-haemostatic functions. *Int. J. Parasitol.* 45, 613–627. doi: 10.1016/j.ijpara.2015.03.009

Klingler, J., and Friedrich, T. (1997). Site-specific interaction of thrombin and inhibitors observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* 73, 2195. doi: 10.1016/S0006-3495(97)78251-1

Koh, C. Y., Kazimirova, M., Trimnell, A., Takac, P., Labuda, M., Nuttall, P. A., et al. (2007). Variegin, a novel fast and tight binding thrombin inhibitor from the tropical bont tick. *J. Biol. Chem.* 282, 29101–29113. doi: 10.1074/jbc.M705600200

Kopacek, P., Hajdusek, O., Buresova, V., and Daffre, S. (2010). Tick innate immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 708, 137–162. doi: 10.1007/978-1-4419-8059-5_8

Kopacek, P., Weise, C., Saravanan, T., Vitova, K., and Grubhoffer, L. (2000). Characterization of an alpha-macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Eur. J. Biochem.* 267, 465–475. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01020.x

Kotal, J., Langhansova, H., Lieskovska, J., Andersen, J. F., Francischetti, I. M., Chavakis, T., et al. (2015). Modulation of host immunity by tick saliva. *J. Proteomics* 128, 58–68. doi: 10.1016/j.jprot.2015.07.005

Kotsyfakis, M., Kopacek, P., Franta, Z., Pedra, J. H., and Ribeiro, J. M. (2015). Deep sequencing analysis of the *Ixodes ricinus* haemocytome. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9:e0003754. doi: 10.1371/journal.pntd.0003754

Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F., and Otlewski, J. (2003). Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2427–2444. doi: 10.1007/s00018-003-3120-x

Kunitz, M. (1945). Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science* 101, 668–669. doi: 10.1126/science.101.2635.668

Lai, R., Takeuchi, H., Jonczy, J., Rees, H. H., and Turner, P. C. (2004). A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Gene* 342, 243–249. doi: 10.1016/j.gene.2004.07.012

Lang, F., Föller, M., Lang, K. S., Lang, P. A., Ritter, M., Gulbins, E., et al. (2005). Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J. Membr. Biol.* 205, 147–157. doi: 10.1007/s00232-005-0780-5

Larsson, L. J., and Bjork, I. (1984). Kinetics of appearance of sulfhydryl groups in alpha 2-macroglobulin on reaction of the inhibitor with amines. *Biochemistry* 23, 2802–2807. doi: 10.1021/bi00307a041

Laskowski, M. Jr., and Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 593–626. doi: 10.1146/annurev.bi.49.070180.003113

Laskowski, M., and Qasim, M. A. (2000). What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 324–337. doi: 10.1016/S0167-4838(99)00284-8

Law, R. H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., Wong, W., et al. (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* 7:216. doi: 10.1186/gb-2006-7-5-216

Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., et al. (2002a). Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *J. Biol. Chem.* 277, 10083–10089. doi: 10.1074/jbc.M111391200

Leboulle, G., Rochez, C., Louahed, J., Ruti, B., Brossard, M., Bollen, A., et al. (2002b). Isolation of *Ixodes ricinus* salivary gland mRNA encoding factors induced during blood feeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 225–233. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.225

Leger, R. J. S., Charnley, A. K., and Cooper, R. M. (1987). Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 253, 221–232. doi: 10.1016/0003-9861(87)90655-2

Liao, M., Zhou, J., Gong, H., Boldbaatar, D., Shirafuji, R., Battur, B., et al. (2009). Hemalin, a thrombin inhibitor isolated from a midgut cDNA library from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *J. Insect Physiol.* 55, 165–174. doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.11.004

Lima, C. A., Torquato, R. J. S., Sasaki, S. D., Justo, G. Z., and Tanaka, A. S. (2010). Biochemical characterization of a Kunitz-type inhibitor similar to dendrotoxins produced by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) hemocytes. *Vet. Parasitol.* 167, 279–287. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.030

Limo, M. K., Voigt, W. P., Tumbo-Oeri, A. G., Njogu, R. M., and Ole-MoiYoi, O. K. (1991). Purification and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus*. *Exp. Parasitol.* 72, 418–429. doi: 10.1016/0014-4894(91)90088-E

Liu, X. Y., and Bonnet, S. I. (2014). Hard tick factors implicated in pathogen transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e2566. doi: 10.1371/journal.pntd.0002566

Liu, X. Y., de la Fuente, J., Cote, M., Galindo, R. C., Moutailler, S., Vayssier-Taussat, M., et al. (2014). IrSPI, a tick serine protease inhibitor involved in tick feeding and *Bartonella henselae* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e2993. doi: 10.1371/journal.pntd.0002993

Macedo-Ribeiro, S., Almeida, C., Calisto, B. M., Friedrich, T., Mentele, R., Stürzebecher, J., et al. (2008). Isolation, cloning and structural characterisation of Boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS ONE* 3:e1624. doi: 10.1371/journal.pone.0001624

Madden, R. D., Sauer, J. R., and Dillwith, J. W. (2004). A proteomics approach to characterizing tick salivary secretions. *Exp. Appl. Acarol.* 32, 77–87. doi: 10.1023/B:APPA.0000018316.80224.54

Mans, B. J., Andersen, J. F., Schwan, T. G., and Ribeiro, J. M. C. (2008). Characterization of anti-hemostatic factors in the argasid, *Argas monolakensis*: implications for the evolution of blood-feeding in the soft tick family. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 22–41. doi: 10.1016/j.ibmb.2007.09.002

Mans, B. J., Louw, A. I., and Neitz, A. W. H. (2002). Amino acid sequence and structure modeling of savignin, a thrombin inhibitor from the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 821–828. doi: 10.1016/S0965-1748(01)00169-2

Mast, A. E., and Broze, G. J. Jr. (1996). Physiological concentrations of tissue factor pathway inhibitor do not inhibit prothrombinase. *Blood* 87, 1845–1850.

Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31–46. doi: 10.1038/nrg2626

Miyoshi, T., Tsuji, N., Islam, M. K., Alim, M. A., Hatta, T., Yamaji, K., et al. (2010). A Kunitz-type proteinase inhibitor from the midgut of the Ixodid tick, *Haemaphysalis longicornis*, and its endogenous target serine proteinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 170, 112–115. doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.12.005

Miyoshi, T., Tsuji, N., Khyrul Islam, M., Huang, X., Motobu, M., Abdul Alim, M., et al. (2007). Molecular and reverse genetic characterization of serine proteinase-induced hemolysis in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *J. Insect Physiol.* 53, 195–203. doi: 10.1016/j.jinsphys.2006.12.001

Monteiro, R. Q. (2005). Targeting exosites on blood coagulation proteases. *Anais Acad. Brasil. Ciênc.* 77, 275–280. doi: 10.1590/S0001-37652005000200007

Monteiro, R. Q., Rezaie, A. R., Ribeiro, J. M. C., and Francischetti, I. M. B. (2005). Ixolaris: a factor Xa heparin-binding exosite inhibitor. *Biochem. J.* 387, 871–877. doi: 10.1042/BJ20041738

Morais, K. L. P., Pacheco, M. T. F., Berra, C. M., Bosch, R. V., Sciani, J. M., Chammas, R., et al. (2016). Amblyomin-X induces ER stress, mitochondrial dysfunction, and caspase activation in human melanoma and pancreatic tumor cell. *Mol. Cell. Biochem.* 415, 119–131. doi: 10.1007/s11010-016-2683-4

Motoyashiki, T., Tu, A. T., Azimov, D. A., and Ibragim, K. (2003). Isolation of anticoagulant from the venom of tick, *Boophilus calcaratus*, from Uzbekistan. *Thromb. Res.* 110, 235–241. doi: 10.1016/S0049-3848(03)00409-2

Mulenga, A., Khumthong, R., and Blandon, M. A. (2007). Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma americanum* tick Lospins. *J. Exp. Biol.* 210, 3188–3198. doi: 10.1242/jeb.006494

Mulenga, A., Kim, T., and Ibelli, A. M. (2013). Amblyomma americanum tick saliva serine protease inhibitor 6 is a cross-class inhibitor of serine proteases and papain-like cysteine proteases that delays plasma clotting and inhibits platelet aggregation. *Insect Mol. Biol.* 22, 306–319. doi: 10.1111/imb.12024

Mulenga, A., Misao, O., and Sugimoto, C. (2003a). Three serine proteinases from midguts of the hard tick *Rhipicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. *Exp. Appl. Acarol.* 29, 151–164. doi: 10.1023/A:1024278402288

Mulenga, A., Sugimoto, C., Ingram, G., Ohashi, K., and Misao, O. (2001). Characterization of two cDNAs encoding serine proteinases from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 817–825. doi: 10.1016/S0965-1748(00)00187-9

Mulenga, A., Sugimoto, C., Sako, Y., Ohashi, K., Musoke, A., Shubash, M., et al. (1999). Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Infect. Immun.* 67, 1652–1658.

Mulenga, A., Tsuda, A., Onuma, M., and Sugimoto, C. (2003b). Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, *Rhiphicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 267–276. doi: 10.1016/S0965-1748(02)00240-0

Munoz, E. M., and Linhardt, R. J. (2004). Heparin-binding domains in vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1549–1557. doi: 10.1161/01.ATV.0000137189.22999.3f

Nagata, K. (1996). Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone. *Trends Biochem. Sci.* 21, 22–26. doi: 10.1016/S0968-0004(06)80023-X

Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 256, 12–18. doi: 10.1006/excr.2000.4834

Nakajima, C., Imamura, S., Konnai, S., Yamada, S., Nishikado, H., Ohashi, K., et al. (2006). A novel gene encoding a thrombin inhibitory protein in a cDNA library from *Haemaphysalis longicornis* salivary gland. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 447–452. doi: 10.1292/jvms.68.447

Narasimhan, S., Perez, O., Mootien, S., DePonte, K., Koski, R. A., Fikrig, E., et al. (2013). Characterization of Ixophilin, a thrombin inhibitor from the gut of *Ixodes scapularis*. *PLoS ONE* 8:e68012. doi: 10.1371/journal.pone.0068012

Nurden, A. T. (2014). Platelet membrane glycoproteins: a historical review. *Semin. Thromb. Hemost.* 40, 577–584. doi: 10.1055/s-0034-1383826

Nutt, L. K., Pataer, A., Pahler, J., Fang, B., Roth, J., McConkey, D. J., et al. (2002). Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca^{2+} stores. *J. Biol. Chem.* 277, 9219–9225. doi: 10.1074/jbc.M106817200

Nuttall, P. A., and Labuda, M. (2004). Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology* 129(Suppl.), S177–S189. doi: 10.1017/S0031182004005633

Oleaga, A., Obolo-Mvoulouga, P., Manzano-Roman, R., and Perez-Sanchez, R. (2015). Midgut proteome of an argasid tick, *Ornithodoros erraticus*: a comparison between unfed and engorged females. *Parasit. Vectors* 8, 525. doi: 10.1186/s13071-015-1148-z

Paesen, G. C., Adams, P. L., Harlos, K., Nuttall, P. A., and Stuart, D. I. (1999). Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Mol. Cell* 3, 661–671. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80359-7

Paesen, G. C., Siebold, C., Harlos, K., Peacey, M. F., Nuttall, P. A., and Stuart, D. I. (2007). A tick protein with a modified Kunitz fold inhibits human tryptase. *J. Mol. Biol.* 368, 1172–1186. doi: 10.1016/j.jmb.2007.03.011

Páleníková, J., Lieskovská, J., Langhansová, H., Kotsyfakis, M., Chmelař, J., and Kopecký, J. (2015). *Ixodes ricinus* salivary serpin IRS-2 affects Th17 differentiation via inhibition of the interleukin-6/STAT-3 signaling pathway. *Infect. Immun.* 83, 1949–1956. doi: 10.1128/IAI.03065-14

Payne, V., and Kam, P. C. (2004). Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia* 59, 695–703. doi: 10.1111/j.1365-2044.2004.03757.x

Pemberton, P. A., Stein, P. E., Pepys, M. B., Potter, J. M., and Carrell, R. W. (1988). Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation. *Nature* 336, 257–258. doi: 10.1038/336257a0

Peslova, G., Petrak, J., Kuzelova, K., Hrdy, I., Halada, P., Kuchel, P. W., et al. (2009). Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood* 113, 6225–6236. doi: 10.1182/blood-2009-01-201590

Porter, L., Radulovic, Z., Kim, T., Braz, G. R., Da Silva Vaz, I. Jr., and Mulenga, A. (2015). Bioinformatic analyses of male and female *Amblyomma americanum* tick expressed serine protease inhibitors (serpins). *Ticks Tick Borne Dis.* 6, 16–30. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.08.002

Prevot, P. P. (2006). Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *J. Biol. Chem.* 281, 26361–26369. doi: 10.1074/jbc.M604197200

Prevot, P.-P., Beschin, A., Lins, L., Beaufays, J., Grosjean, A., Bruys, L., et al. (2009). Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS J.* 276, 3235–3246. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07038.x

Rachinsky, A., Guerrero, F. D., and Scoles, G. A. (2007). Differential protein expression in ovaries of uninfected and Babesia-infected southern cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1291–1308. doi: 10.1016/j.ibmb.2007.08.001

Radulovic, Z. M., Kim, T. K., Porter, L. M., Sze, S. H., Lewis, L., and Mulenga, A. (2014). A 24-48 h fed *Amblyomma americanum* tick saliva immuno-proteome. *BMC Genomics* 15:518. doi: 10.1186/1471-2164-15-518

Rajput, Z. I., Hu, S. H., Chen, W. J., Arijo, A. G., and Xiao, C. W. (2006). Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 7, 912–921. doi: 10.1631/jzus.2006.B0912

Ram, J. S., Terminiello, L., Bier, M., and Nord, F. F. (1954). On the mechanism of enzyme action. LVII. Interaction between trypsin and ovomucoid. *Arch. Biochem. Biophys.* 52, 451–463. doi: 10.1016/0003-9861(54)90145-9

Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X. F., Fish, D., et al. (2005). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* 436, 573–577. doi: 10.1038/nature03812

Ranasinghe, S., and McManus, D. P. (2013). Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 219–227. doi: 10.1016/j.dci.2012.10.005

Rawlings, N. D., Tolle, D. P., and Barrett, A. J. (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 378, 705–716. doi: 10.1042/bj20031825

Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., Salvesen, G. S., et al. (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69, 597–604. doi: 10.1016/0092-8674(92)90223-Y

Ribeiro, J. M. (1995). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.* 4, 143–152.

Ribeiro, J. M., Alarcon-Chaidez, F., Francischetti, I. M., Mans, B. J., Mather, T. N., Valenzuela, J. G., et al. (2006). An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 111–129. doi: 10.1016/j.ibmb.2005.11.005

Ribeiro, J. M., Makoul, G. T., Levine, J., Robinson, D. R., and Spielman, A. (1985). Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J. Exp. Med.* 161, 332–344. doi: 10.1084/jem.161.2.332

Ricci, C. G., Pinto, A. F. M., Berger, M., and Termignoni, C. (2007). A thrombin inhibitor from the gut of *Boophilus microplus* ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 42, 291–300. doi: 10.1007/s10493-007-9097-7

Rimphanitchayakit, V., and Tassanakajon, A. (2010). Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 377–386. doi: 10.1016/j.dci.2009.12.004

Rodriguez-Valle, M., Vance, M., Moolhuijzen, P. M., Tao, X., and Lew-Tabor, A. E. (2012). Differential recognition by tick-resistant cattle of the recombinantly

expressed *Rhipicephalus microplus* serine protease inhibitor-3 (RMS-3). *Ticks Tick Borne Dis.* 3, 159–169. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.03.002

Rodriguez-Valle, M., Xu, T., Kurscheid, S., and Lew-Tabor, A. E. (2015). *Rhipicephalus microplus* serine protease inhibitor family: annotation, expression and functional characterisation assessment. *Parasit. Vectors* 8, 7. doi: 10.1186/s13071-014-0605-4

Rosario-Cruz, R., Almazan, C., Miller, R. J., Dominguez-Garcia, D. I., Hernandez-Ortiz, R., and de la Fuente, J. (2009). Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 14, 2657–2665. doi: 10.2741/3403

Sabbatini (1899). Fermento anticoagulente del l'Ixodes ricinus. *Ach. Ital. Biol.* 31, 37–53.

Sakai, K., Long, S. D., Pettit, D. A. D., Cabral, G. A., and Schwartz, L. B. (1996). Expression and purification of recombinant human tryptase in a baculovirus system. *Protein Expr. Purif.* 7, 67–73. doi: 10.1006/prep.1996.0010

Sant'Anna Azzolini, S., Sasaki, S. D., Torquato, R. J., Andreotti, R., Andreotti, E., and Tanaka, A. S. (2003). *Rhipicephalus sanguineus* trypsin inhibitors present in the tick larvae: isolation, characterization, and partial primary structure determination. *Arch. Biochem. Biophys.* 417, 176–182. doi: 10.1016/S0003-9861(03)00344-8

Santos, I. K., Valenzuela, J. G., Ribeiro, J. M., de Castro, M., Costa, J. N., Costa, A. M., et al. (2004). Gene discovery in *Boophilus microplus*, the cattle tick: the transcriptomes of ovaries, salivary glands, and hemocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026, 242–246. doi: 10.1196/annals.1307.037

Saravanan, T., Weise, C., Sojka, D., and Kopácek, P. (2003). Molecular cloning, structure and bait region splice variants of alpha2-macroglobulin from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 841–851. doi: 10.1016/S0965-1748(03)00083-3

Sasaki, S. D., Azzolini, S. S., Hirata, I. Y., Andreotti, R., and Tanaka, A. S. (2004). *Boophilus microplus* tick larvae, a rich source of Kunitz-type serine proteinase inhibitors. *Biochimie* 86, 643–649. doi: 10.1016/j.biochi.2004.09.010

Sasaki, S. D., de Lima, C. A., Lovato, D. V., Juliano, M. A., Torquato, R. J. S., and Tanaka, A. S. (2008). BmSI-7, a novel subtilisin inhibitor from *Boophilus microplus*, with activity toward Pr1 proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Exp. Parasitol.* 118, 214–220. doi: 10.1016/j.exppara.2007.08.003

Sasaki, S. D., and Tanaka, A. S. (2008). rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick *Boophilus microplus*, its cloning, expression and biochemical characterization. *Vet. Parasitol.* 155, 133–141. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.03.031

Schlott, B., Wohnert, J., Icke, C., Hartmann, M., Ramachandran, R., Guhrs, K. H., et al. (2002). Interaction of Kazal-type inhibitor domains with serine proteinases: biochemical and structural studies. *J. Mol. Biol.* 318, 533–546. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00014-1

Schwarz, A., Tenzer, S., Hackenberg, M., Erhart, J., Gerhold-Ay, A., Mazur, J., et al. (2014). A systems level analysis reveals transcriptomic and proteomic complexity in *Ixodes ricinus* midgut and salivary glands during early attachment and feeding. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 2725–2735. doi: 10.1074/mcp.M114.039289

Soares, T. S., Oliveira, F., Torquato, R. J. S., Sasaki, S. D., Araujo, M. S., Paschoalin, T., et al. (2016). BmTI-A, a Kunitz-type inhibitor from *Rhipicephalus microplus* able to interfere in vessel formation. *Vet. Parasitol.* 219, 44–52. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.01.021

Soares, T. S., Watanabe, R. M. O., Tanaka-Azevedo, A. M., Torquato, R. J. S., Lu, S., Figueiredo, A. C., et al. (2012). Expression and functional characterization of boophilin, a thrombin inhibitor from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut. *Vet. Parasitol.* 187, 521–528. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.01.027

Somprasong, N., Rimphanitchayakit, V., and Tassanakajon, A. (2006). A five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its inhibitory activities. *Dev. Comp. Immun.* 30, 998–1008. doi: 10.1016/j.dci.2006.01.004

Sonenshine, D., and Anderson, J. (2014). "Mouthparts and digestive system," in *Biology of Ticks, 2nd Edn.*, eds. D. E. Sonenshine and R. Michael Roe (New York, NY: Oxford University Press), 122–162.

Sottrup-Jensen, L. (1989). Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J. Biol. Chem.* 264, 11539–11542.

Sottrup-Jensen, L., Stepanik, T. M., Kristensen, T., Lonblad, P. B., Jones, C. M., Wierzbicki, D. M., et al. (1985). Common evolutionary origin of alpha 2-macroglobulin and complement components C3 and C4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 9–13. doi: 10.1073/pnas.82.1.9

Starkey, P. M., and Barrett, A. J. (1982). Evolution of alpha 2-macroglobulin. The demonstration in a variety of vertebrate species of a protein resembling human alpha 2-macroglobulin. *Biochem. J.* 205, 91–95. doi: 10.1042/bj2050091

Stopforth, E., Neitz, A. W., and Gaspar, A. R. (2010). A proteomics approach for the analysis of hemolymph proteins involved in the immediate defense response of the soft tick, *Ornithodoros savignyi*, when challenged with *Candida albicans*. *Exp. Appl. Acarol.* 51, 309–325. doi: 10.1007/s10493-010-9338-z

Sugino, M., Imamura, S., Mulenga, A., Nakajima, M., Tsuda, A., Ohashi, K., et al. (2003). A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. *Vaccine* 21, 2844–2851. doi: 10.1016/S0264-410X(03)00167-1

Syrovets, T., Lunov, O., and Simmet, T. (2012). Plasmin as a proinflammatory cell activator. *J. Leukoc. Biol.* 92, 509–519. doi: 10.1189/jlb.0212056

Tanaka, A. S., Andreotti, R., Gomes, A., Torquato, R. J., Sampaio, M. U., and Sampaio, C. A. (1999). A double headed serine proteinase inhibitor–human plasma kallikrein and elastase inhibitor–from *Boophilus microplus* larvae. *Immunopharmacology* 45, 171–177. doi: 10.1016/S0162-3109(99)00074-0

Tatchell, R. J. (1969). Host-parasite interactions and the feeding of blood-sucking arthropods. *Parasitology* 59, 93–104. doi: 10.1017/S0031182000069857

Tirloni, L., Islam, M. S., Kim, T. K., Diedrich, J. K., Yates, J. R. III, Pinto, A. F., et al. (2015). Saliva from nymph and adult females of *Haemaphysalis longicornis*: a proteomic study. *Parasit. Vectors* 8, 338. doi: 10.1186/s13071-015-0918-y

Tirloni, L., Reck, J., Terra, R. M., Martins, J. R., Mulenga, A., Sherman, N. E., et al. (2014a). Proteomic analysis of cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus saliva: a comparison between partially and fully engorged females. *PLoS ONE* 9:e94831. doi: 10.1371/journal.pone.0094831

Tirloni, L., Seixas, A., Mulenga, A., Vaz Ida, S. Jr., and Termignoni, C. (2014b). A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. *Exp. Parasitol.* 137, 25–34. doi: 10.1016/j.exppara.2013.12.001

Toyomane, K., Konnai, S., Niwa, A., Githaka, N., Isezaki, M., Yamada, S., et al. (2016). Identification and the preliminary *in vitro* characterization of IRIS homologue from salivary glands of *Ixodes persulcatus* Schulze. *Ticks Tick Borne Dis.* 7, 119–125. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.09.006

Tsuda, A., Mulenga, A., Sugimoto, C., Nakajima, M., Ohashi, K., and Onuma, M. (2001). cDNA cloning, characterization and vaccine effect analysis of *Haemaphysalis longicornis* tick saliva proteins. *Vaccine* 19, 4287–4296. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00148-7

Tufail, M., and Takeda, M. (2009). Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *J. Insect Physiol.* 55, 87–103. doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.11.007

Valdés, J. J., Schwarz, A., Cabeza de Vaca, I., Calvo, E., Pedra, J. H. F., Guallar, V., et al. (2013). Tryptogalinin is a tick kunitz serine protease inhibitor with a unique intrinsic disorder. *PLoS ONE* 8:e62562. doi: 10.1371/journal.pone.0062562

van de Locht, A., Stubbs, M. T., Bode, W., Friedrich, T., Bollschweiler, C., Hoffken, W., et al. (1996). The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *EMBO J.* 15, 6011–6017.

Wada, Y., Yoshida, K., Tsutani, Y., Shigematsu, H., Oeda, M., Sanada, Y., et al. (2007). Neutrophil elastase induces cell proliferation and migration by the release of TGF-α, PDGF and VEGF in esophageal cell lines. *Oncol. Rep.* 17, 161–167. doi: 10.3892/or.17.1.161

Walker, D. H., Tidwell, R. R., Rector, T. M., and Geratz, J. D. (1984). Effect of synthetic protease inhibitors of the amidine type on cell injury by *Rickettsia rickettsii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25, 582–585. doi: 10.1128/AAC.25.5.582

Wang, Z. H., Zhao, X. F., and Wang, J. X. (2009). Characterization, kinetics, and possible function of Kazal-type proteinase inhibitors of Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 885–897. doi: 10.1016/j.fsi.2009.03.024

Waxman, L., Smith, D. E., Arcuri, K. E., and Vlasuk, G. P. (1990). Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science* 248, 593–596. doi: 10.1126/science.2333510

Wikel, S. (2013). Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Front. Microbiol.* 4:337. doi: 10.3389/fmicb.2013.00337

Willadsen, P., and Riding, G. A. (1980). On the biological role of a proteolytic-enzyme inhibitor from the ectoparasitic tick *Boophilus microplus*. *Biochem. J.* 189, 295–303. doi: 10.1042/bj1890295

Xu, T., Lew-Tabor, A., and Rodriguez-Valle, M. (2016). Effective inhibition of thrombin by *Rhipicephalus microplus* serpin-15 (RmS-15) obtained in the yeast *Pichia pastoris*. *Ticks Tick Borne Dis.* 7, 180–187. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.09.007

Yu, Y., Cao, J., Zhou, Y., Zhang, H., and Zhou, J. (2013). Isolation and characterization of two novel serpins from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Ticks Tick Borne Dis.* 4, 297–303. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.02.001

Zarbock, A., Polanowska-Grabowska, R. K., and Ley, K. (2007). Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* 21, 99–111. doi: 10.1016/j.blre.2006.06.001

Zhou, J., Liao, M., Hatta, T., Tanaka, M., Xuan, X., and Fujisaki, K. (2006). Identification of a follistatin-related protein from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its effect on tick oviposition. *Gene* 372, 191–198. doi: 10.1016/j.gene.2005.12.020

Zhu, K., Bowman, A. S., Brigham, D. L., Essenberg, R. C., Dillwith, J. W., and Sauer, J. R. (1997). Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). *Exp. Parasitol.* 87, 30–38. doi: 10.1006/expr.1997.4175

Zou, Z., Anisowicz, A., Hendrix, M. J., Thor, A., Neveu, M., Sheng, S., et al. (1994). Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science* 263, 526–529. doi: 10.1126/science.8290962

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Blisnick, Foulon and Bonnet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2. Origine du projet de thèse et résultats antérieurs

Comme présenté dans l'introduction de ce mémoire, il est à l'heure actuelle urgent de développer de nouvelles stratégies de lutte contre les tiques qui soient à la fois efficaces, respectueuses de l'environnement et qui n'atteignent pas les espèces non ciblées. La découverte de ces nouvelles stratégies nécessite d'étudier et de comprendre les interactions qui existent entre les tiques, leurs hôtes vertébrés, et les agents pathogènes transmis. Le laboratoire où ce travail de thèse a été effectué s'attache tout particulièrement à comprendre les mécanismes moléculaires qui régissent ces interactions. Pour ce faire, le laboratoire possède un élevage de tiques *I. ricinus* et a initié un travail basé sur le modèle de transmission des bactéries *Bartonella sp.* par cette espèce de tique. Suite à la validation de la transmission de *B. henselae* et *B. birtlesii* par *I. ricinus* [31, 32], un travail de thèse a été réalisé par XY. Liu dans le but d'identifier des gènes de la tique dont le produit serait impliqué dans la transmission bactérienne [232, 233]. Pour ce faire, des larves « pathogen-free » puis les nymphes issues de ces larves ont été infectées par gorgement artificiel par *B.henselae* quand des lots contrôles ont été gorgés sur du sang non-infecté [234]. Après transformation, les adultes ont été pré-gorgées pendant 4 jours sur du sang sain. Les transcriptomes des glandes salivaires des femelles ont alors été séquencés par des techniques à haut débit afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés entre glandes salivaires de tiques infectées par *B. henselae* et de tiques non-infectées.

Il faut noter qu'à ce jour le génome d'*I. ricinus* n'est pas séquencé et que le seul génome de tique disponible est celui de sa « cousine » américaine, *I. scapularis*. Bien que cette espèce de tique soit proche de *I. ricinus*, de nombreuses différences existent sur le plan génétique. Aussi, il a été nécessaire de réaliser dans un premier temps, par séquençage 454, une banque de référence de l'ensemble des transcrits des glandes salivaires de la tique (24539 isotigs). L'abondance des transcrits a été ensuite comparée entre les échantillons infectés et non infectés par la technologie Illumina. Suite à l'infection, 5,6% des gènes d'*I. ricinus* présentaient une expression qui était modulée (829 transcrits sur-exprimés et 517 sous-exprimés, Tableau 2). Parmi les gènes sous-exprimés en présence de *B. henselae* ont été identifiés des gènes codant des protéines anti complément, des défensines, des inhibiteurs de sérine protéases de la famille des BPTI/Kunitz, des « Collagen-Like Salivary secreted Peptides » (CSLP), des protéines de choc thermique (HSP), des micropulsines, des « Tick Histamine Binding Proteins » (THBPs), des protéines de la famille de Salp15, et enfin des Métalloprotéases. A l'opposé, d'autres gènes

sont surexprimés tels des inhibiteurs de sérine protéases de la famille des BPTI/Kunitz, ceux codant des protéines de la famille de Salp15, des THBPs, et également des Métalloprotéases.

Tableau 2: Identification des gènes différentiellement exprimés dans les glandes salivaires suite à l'infection des tiques Ixodes ricinus *femelles par B. henselae. (Liu et al., 2014b)*

Hypothetical proteins	*Number of isotigs*	
	Up-regulated	*Down-regulated*
Proteins of known function		
Anti-complement proteins	0	10
Arthropod defensins	0	4
BPTI/Kunitz family of serine protease inhibitors	7	17
Collagen-Like Salivary secreted Peptide (CLSP)	0	6
Heat Shock Proteins (HSP)	0	9
Microplusin proteins	0	6
Salp15 super-family proteins	24	32
Tick Histamine Binding Proteins (THBPs)	14	26
Zinc-dependent metalloproteases	2	4
Proteins of unknown function		
Amblyomma maculatum Hypothetical proteins	27	10
Daphnia pulex Hypothetical proteins	4	0
Ixodes scapularis Hypothetical proteins	93	19
Ixodid Secreted salivary gland proteins	55	156
Ixodes scapularis Conserved hypothetical proteins	34	3
Ixodid proteins	164	60
Other species proteins	32	9
Tick Salivary Peptide Group 1 (TSPG-1)	12	30
Zinc finger proteins	14	0
Unknown genes	347	116
Total	**829**	**517**

L'analyse quantitative des niveaux d'expression a alors montré que le transcrit le plus sur-exprimé dans les glandes salivaires en condition d'infection est KF531922, codant un inhibiteur de sérine protéase de la famille des BPTI/Kunitz. Ce gène a donc été nommé *Ixodes ricinus Serine Protease Inhibitor* (*IrSPI*) en raison de son appartenance à cette famille d'inhibiteurs, et sa sur-expression validée par qRT-PCR.

Au regard de la sur-expression de *IrSPI* lors d'une infection des glandes salivaires de la tique, l'hypothèse a donc été émise que le produit de ce gène soit impliqué dans l'infection de la tique par *B. henselae*. Des expériences d'ARN interférence ciblant le transcrit *IrSPI* ont alors été réalisées pour valider une telle hypothèse. Les résultats ont montré qu'après une étape de prégorgement de 7 jours de femelles infectées par *B. henselae* sur du sang sain, l'extinction de *IrSPI* générait une diminution à la fois de la quantité de sang prélevée par les tiques et de la charge bactérienne dans les glandes salivaires (Figure 12).

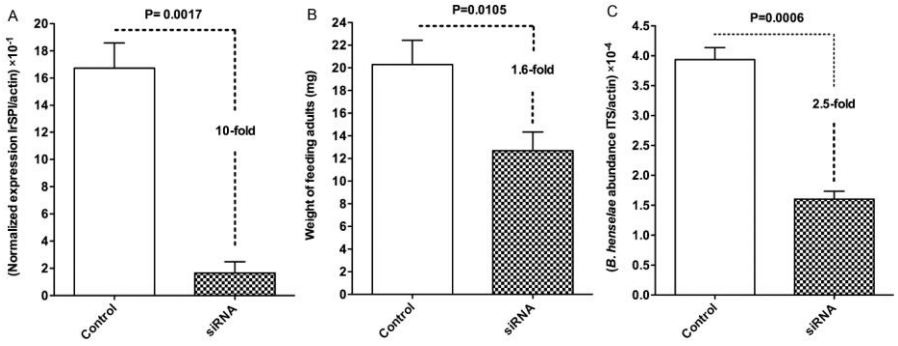


Figure 12 : Extinction du gène IrSPI *par ARN interférence (A) et mesure de l'impact de cette extinction sur la quantité de sang prélevée par des tiques* I. ricinus *femelles lors du gorgement (B), et sur la charge bactérienne dans les glandes salivaires de ces tiques infectées par* B. henselae *(C)* (Liu et al, 2014b).

Ces deux résultats suggèrent l'implication du produit de ce gène dans le gorgement des tiques mais également dans l'infection des glandes salivaires de la tique par la bactérie *B. henselae*. IrSPI, en agissant sur ces deux paramètres, représente ainsi, un candidat vaccinal prometteur contre les tiques *I. ricinus* et la transmission d'agents pathogènes. De plus, son étude devra contribuer à une meilleure compréhension du dialogue moléculaire entre le vecteur, l'agent transmis, et l'hôte vertébré, compréhension essentielle à la mise en place de toute stratégie de lutte contre les tiques et les micro-organismes qu'elles transmettent.

3. Objectifs de la thèse

L'objectif des travaux de thèse présentés ici est de caractériser le gène *IrSPI*, au niveau de sa structure et de son expression, et d'appréhender le rôle joué par la protéine IrSPI dans la biologie de la tique, notamment lors de la prise du repas sanguin et donc dans les interactions avec l'hôte vertébré. Ce travail de thèse s'attache à répondre à ces problématiques à travers les trois axes présentés ci-dessous.

Analyse du gène *IrSPI* et de sa structure.

L'objectif de cette première partie est d'obtenir la séquence complète du gène *IrSPI* dans le but d'en connaître la structure et de le replacer au sein de la famille des inhibiteurs de type Kunitz afin d'étoffer nos connaissances sur ce gène et d'ouvrir des pistes de réflexion sur sa possible fonction. Outre la recherche *in silico* d'homologues chez d'autres espèces de tiques, différentes techniques ont donc été éprouvées ici afin de séquencer la totalité du gène, seule la séquence codante d'*IrSPI* étant connue au début de cette thèse.

De plus, dans une optique vaccinale, il est essentiel de connaître la variabilité d'IrSPI pour évaluer l'efficacité potentielle de la vaccination vis-à-vis de différentes populations européennes de tiques. Dans ce but, de nombreuses collaborations nous ont permis d'obtenir un échantillonnage représentatif d'*I. ricinus* en Europe. Une telle analyse de variabilité antigénique concerne la séquence codante du gène mais, malheureusement, les conditions de conservation des échantillons ne permettant pas l'exploitation des molécules d'ARNs, seul l'ADN permettrait de la réaliser. Pour ce faire, il était donc nécessaire de parvenir à séquencer la totalité du gène *IrSPI*.

Etude de l'expression et de la fonction d'*IrSPI* dans la biologie de la tique.

Dans cette seconde partie, notre objectif était de déterminer la fonction de IrSPI à la fois dans la physiologie de la tique et dans les interactions avec l'hôte vertébré au moment de la prise du repas de sang.

Une analyse bio-informatique a été réalisée dans un premier temps afin de prédire les potentielles modifications post traductionnelles et les structures secondaires de la protéine en lien avec sa fonction potentielle. Ces prédictions ont ensuite été confrontées à des analyses biophysiques de la protéine recombinante IrSPI synthétisée en cellules de drosophile S2. Dans un second temps l'analyse de l'expression du gène *IrSPI* a été réalisée afin de déterminer les conditions qui régissent la synthèse de IrSPI et apporter des pistes de réflexion quant aux fonctions possibles que peut remplir cette protéine chez la tique *I. ricinus.* Outre la détermination de ses protéases cibles, l'objectif était ici de définir l'impact de IrSPI sur les réactions de l'hôte vertébré lors de la piqûre d'une tique au niveau de l'hémostase, de l'angiogenèse, et des réponses immunes.

Identification des interactions protéiques que peut avoir IrSPI

Afin d'approfondir les connaissances sur IrSPI et ses rôles potentiels, l'objectif de ce dernier chapitre était de déterminer les éventuels partenaires protéiques de la protéine à la fois chez la tique *I. ricinus* et chez l'hôte vertébré. Dans ce but, des banques d'ADN complémentaires (ADNc) d'hôtes vertébrés (banques bovine et humaine) ou de tique (*I. ricinus*) ont été criblées par le système de double hybride en levure.

4. Etudes expérimentales

Chapitre I : Analyse du gène *IrSPI* et de sa structure

4.1.1 Introduction

Les travaux antérieurs sur *IrSPI* ayant mis en évidence son implication à la fois dans le gorgement des tiques *I. ricinus* et la transmission de *B. henselae*, cet inhibiteur de sérine protéase apparaît comme un potentiel candidat vaccinal pouvant interférer à la fois sur le gorgement des tiques et les agents pathogènes transmis. Outre l'évaluation expérimentale de l'efficacité vaccinale d'*IrSPI* actuellement en cours au sein du laboratoire, il est essentiel d'estimer sa variabilité antigénique pour présager de son efficacité chez les différentes populations de tiques à cibler. Cette étude nécessite la comparaison des séquences codantes de diverses populations de tiques représentatives de la diversité génétique qui existe chez les populations d'*I. ricinus* en Europe. Cependant, les conditions de conservation des tiques obtenues via de nombreuses collaborations ne permettent pas l'analyse des ARNm trop peu stables, et impliquent donc de connaître la séquence du gène pour l'amplifier et étudier la variabilité de la séquence codante. De plus, l'analyse d'*IrSP*I dont fait l'objet la présente thèse, impliquait aussi la caractérisation du gène *IrSPI* dans le but d'en connaître la structure, et de réaliser une étude phylogénétique grâce aux échantillons collectés à travers l'Europe.

En l'absence de génome séquencé pour *I. ricinus*, nous avons donc dans un premier temps utilisé les données disponibles dans les banques afin de reconstituer la structure supposée de ce gène grâce aux gènes connus qui possèdent les pourcentages d'identité les plus élevés avec *IrSPI*. Des analyses bio informatiques comparatives ont ainsi été réalisées à partir des séquences disponibles dans les banques de données Vectorbase (Vectorbase.org) et NCBI, et de serveurs permettant de prédire la structure du gène. Dans un second temps, nous avons tenté d'obtenir la séquence complète d'*IrSPI* par des approches d'amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR) ou de capture de fragments d'ADN sur billes magnétiques. Une tentative de détermination de la séquence complète du gène *IrSPI* ayant déjà fait l'objet d'un stage de Master 2, les résultats préliminaires obtenus lors de ce stage sont inclus dans ce manuscrit car ont servis de base à cette partie de mon travail.

4.1.2 Résultats antérieurs

Figure 13: Séquence de l'Isotig KF531922.2 contenant la séquence d'IrSPI et position des amorces utilisées en PCR (en 5'-3') (tableau annexe 8). En gras la séquence codante d'IrSPI, en jaune l'amorce 1F, en bleu clair l'amorce 2F, en rose l'amorce 3F, en vert foncé l'amorce 2R, en gris l'amorce 4 R, en marron l'amorce 3R, en vert clair et soulignée l'amorce 1R, en violet l'amorce ID23882 et en lettres bleues l'amorce 5F.

L'étude du transcriptome des glandes salivaires d'*I. ricinus* a permis l'identification de *IrSPI* comme étant le transcrit le plus surexprimé suite à une infection des tiques par *B. henselae* et l'obtention de sa séquence codante portée par l'isotig KF531922.2 [232] (Figure 13).

Un travail de Master 2 réalisé en 2015 par Margaux Verheyden-Greloux (Université Pierre et Marie Curie Paris VI) a par la suite porté sur le séquençage du gène *IrSPI* afin d'en connaître la séquence complète. La stratégie alors utilisée était basée sur l'utilisation de différents couples d'amorces basés sur la séquence de l'isotig contenant la séquence codante de *IrSPI* (Figure 13) et permettant, par des amplifcations PCR successives et un séquençage, de reconstruire la séquence complète du gène. Les résultats obtenus sont compilés dans le tableau 3 qui récapitule les amorces utilisées les résultats des amplifications par PCR, le pourcentage d'identité observé sur le génome d'*I. scapularis* et le pourcentage d'identité avec l'ADN complémentaire (ADNc) d'*IrSPI*. Les séquences des amorces utlisées dans ce chapitre sont présentées dans le tableau 8 en annexe.

*Tableau 3: Tableau récapitulatif des résultats antérieurs de séquençage d'*IrSPI*. qui récapitule les amorces utilisées, les résultats des amplifications par PCR, le pourcentage d'identité observé sur le génnome d'*I. scapularis *et le pourcentage d'identité avec l'ADN complémentaire d'*IrSPI.

Couple d'amorces	Résultats des PCR (en pb)	% d'identité avec le génome d'*I. scapularis*	% d'identité avec l'ADNc d'IrSPI
1F-1R	≈ 5000	Supercontig DS886827 : - 90,8% sur 1056 pb en 5' - 87,6% sur 1073 pb en 3'	0
	975	Supercontig DS673612	0
2F-2R	Pas d'amplification		
2F-1R	Pas d'amplification		
2F-3R	Pas d'amplification		
3F-1R	Pas d'amplification		
3F-3R	Pas d'amplification		
3F-4R	1026	Supercontig DS944088 ; 75,5% sur 1012 pb	0
	183	Supercontig DS965545 : - 76,8% sur 175 pb en 5' - 74,3% sur 171 pb en 5'	100% sur 183 pb
5F-4R	2000	Supercontig DS965545 : - 73,4% sur 162 pb (sur 519 pb séquencées) - 79,4% sur 252 pb (sur 398 pb séquencées)	100% sur 121 pb
3F-ID23882	Pas d'amplification		

Seulement trois couples d'amorces (1F-1R ; 3F-4R ; 5F-4R) ont donné lieu à une amplification d'ADN. Seules deux séqeunces amplifiées par 3F-4R et 5F-4R présentaient une homologie avec *IrSPI*, permettant ainsi l'élaboration d'une ébauche de la structure de ce gène (Figure 14). Ce dernier, à l'image du gène homologue d'*I. scapularis* porté par le Supercontig DS965545, possèderait, au minimum, un intron de 1630 pb et deux exons de 66 et 177pb. Néanmoins, une partie du gène, en 3', restait toujours inconnue à ce stade.

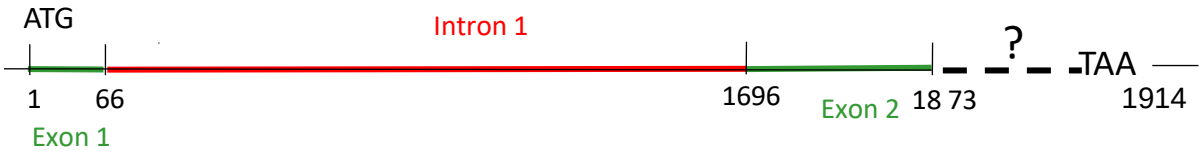


Figure 14: Schéma de la structure du gène IrSPI avec 2 *exons (vert) et un intron (rouge). La séquence en pointillés est inconnue.*

4.1.3 Matériels et Méthodes

4.1.3.1 Analyses bio-informatiques

La recherche de séquences homologues dans la base de données Vectorbase et dans notre propre base transcriptomique des glandes salivaires d'*I. ricinus* [232], a été réalisée grâce à l'outil d'alignement Blast qui permet d'obtenir le pourcentage d'identité et la longueur de la séquence homologue. Les homologies de séquence identifiées ont servi de base à la détermination des différentes amorces utilisées pour les amplifications PCR. Le serveur Genscan a permis la prédiction du nombre et de la position d'introns et d'exons au sein du gène à partir de la séquence codante (http://genes.mit.edu/GENSCAN.html) [235, 236].

4.1.3.2 Collecte et élevage de tiques

Les tiques *I. ricinus* utilisées ici ont été collectées en forêt de Sénart (Ile-de-France), par la méthode du drapeau [237]. Pour ce faire, un tissu blanc d'environ 60 cm² arrimé à l'extrémité d'un bâton est trainé sur la végétation et les tiques à l'affût qui s'accrochent sur le tissu sont alors collectées, rapportées au laboratoire, identifiées, et conservées dans les conditions de notre élevage : 22°C, 95% d'humidité relative et un cycle jour-nuit de 12h/12h [29].

De plus, le laboratoire maintient une population non consanguine de tiques régulièrement alimentée à partir des populations de la forêt de Sénart. Les tiques adultes femelles collectées sont gorgées au laboratoire sur lapin ou sur membrane [29, 238]. Après la ponte, leur statut sanitaire est évalué, par PCR, sur les cadavres des femelles, au regard des bactéries des genres *Anaplasma, Borrelia, Bartonella, Francisella, Rickettsia*, et des protozoaires des genres *Babesia* et *Theileria* susceptibles de circuler dans la région [237]. En fonction des résultats, les larves issues des œufs sont alors incluses ou non dans une colonie dite « Pathogen-free » ou saine dans la mesure où elles ne portent aucun des agents pathogènes testés.

Au laboratoire, l'utilisation d'un système de gorgement artificiel permet de gorger et d'infecter des tiques avec les agents pathogènes désirés [29, 234]. Il est composé de deux parties en verre qui s'emboitent, la partie inférieure contenant les tiques et la partie supérieure le sang avec ou sans agent pathogène. Ces deux parties sont séparées par une membrane (peau de lapin ou gerbille) à travers laquelle les tiques vont prélever leur repas sanguin. L'ensemble est maintenu à 37°C pendant toute la durée du gorgement.

4.1.3.3 Extraction de l'ADN

L'ADN de tique a été extrait à l'aide du kit Nucleospin Tissue (Macherey Nagel). La première étape de lyse a été réalisée en présence de protéinase K à 56°C pendant 3h. La seconde étape de lyse a été réalisée à 70°C pendant 10 minutes dans un tampon fourni par le kit. Une fois les acides nucléiques extraits et fixés sur la membrane de silice, ils sont dessalés et lavés, et sont finalement élués dans 50µl d'eau pure puis conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

4.1.3.4 Extraction d'ARN totaux et synthèse d'ADNc

Les ARN utilisés pour le 3'RACE sont issus de femelles entières ou de leurs glandes salivaires après une étape de prégorgement sur lapin pendant 4 jours [238]. Les ARNm des glandes salivaires ont été extraits après dissection des glandes sous loupe binoculaire, 3 rinçages dans du PBS froid (137 mM NaCl, 1,45 mM NaH_2PO_4, H_2O, 20,5 mM Na_2HPO_4, pH 7.2) puis congélation à -80°C. L'extraction d'ARN a ensuite été réalisée en homogénéisant les glandes salivaires manuellement au potter dans 300µl de Trizol (Thermo Fisher Scientific). Après une incubation de 5 minutes, le volume de trizol a été ajusté à 1ml puis 200µl de chloroforme ont été ajoutés. Les échantillons ont été vigoureusement agités pendant 15 secondes puis incubés 5 minutes à température ambiante. Une centrifugation à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C permet la séparation des phases contenant les ARNs, l'ADN et les protéines. La phase translucide supérieure contenant les ARNs est récupérée, et ces derniers sont ensuite précipités par l'ajout de 500 µl d'isopropanol. Après homogénéisation et incubation de 10 minutes à température ambiante, la solution est centrifugée 10 minutes à 12000 g à 4°C. Le culot d'ARNs est lavé deux fois avec 1ml d'éthanol à 75% froid. Après quelques minutes de séchage, le culot est dissout dans 50 µl d'eau ultrapure RNAse free puis conservé à -80°C. Avant utilisation, les ARNs sont traités avec 2U/µl de DNAse (Ambion) et 2U/µl d'inhibiteur de RNAse (RNAsin Ribonuclease Inhibitor, promega) dans un volume final de 50 µl pendant 30 minutes à 37°C. Une extraction au phénol/ chloroforme est ensuite réalisée après homogénéisation dans 500 µl de phénol/chloroforme (V/V). Après 15 minutes de centrifugation à 12000 g à 4°C, la phase aqueuse est récupérée puis les ARNs sont à nouveau précipités grâce à 300 µl d'une solution d'isopropanol (5 µM Acétate de sodium) et incubation à -20°C pendant 2h. Après 15 minutes de centrifugation (12000 g à 4°C), les ARNs sont rincés deux fois en d'éthanol à 75%, séchés, repris dans 30 µl d'eau ultrapure RNAse free puis conservés à -80°C.

Les ARNs sont ensuite rétro transcrits grâce au kit SuperScript III (Invitrogen) utilisant entre 100 et 400 ng d'ARNs avec 2,5µM d'amorce (5' GACTCGAGTCGACATCGA-Oligo dT) (Adapto primer) dans un volume total de 20µl, et grâce au cycle suivant : 5 minutes à 65°C, 3 minutes à 4°C, 50 minutes à 50°C. Le cycle est terminé par une étape d'inactivation des enzymes à 70°C pendant 15 minutes. Les ADN complémentaires néosynthétisés sont stockés à -80°C.

4.1.3.5 Réaction d'amplification par PCR

La stratégie adoptée ici pour déterminer la séquence manquante en 3' du gène *IrSPI* est l'amplification successive par PCR puis séquençage de l'ADN d'*I. ricinus* avec différents couples d'amorces. Les conditions PCR et la séquence des amorces utilisées sont présentées en annexe (tableaux 8 et 9), et la position des amorces dans la Figure 15. Dans un premier, temps, des amorces situées dans l'intron déjà identifié (F1-intron, F2-intron, F3-intron, F4-intron, F5-intron, F6-intron, et F7-intron) ont été utilisées. En fonction des résultats obtenus, les conditions de PCR ont été optimisées en augmentant notamment la spécificité des amorces grâce à une PCR touchdown en utilisant les amorces F1-intron F2-Intron pour les amorces sens, et R2 et ID23822 pour les amorces anti sens). De plus, des PCR nichées ont été effectuées avec les amorces sens F3-intron, F4-intron, F5-intron, F6-intron F7-intron, et antisens ID23882 et R2. Enfin, dans le but de déterminer de nouvelles portions de séquences utiles pour la synthèse de nouvelles amorces en 3' du codon stop de la séquence codante, la PCR 3' RACE a été utilisée sur de l'ADNc de *I. ricinus* (amorces sens F1 RACE, F2 RACE avec l'amorce adapto primer en amorce antisens)

ATGAAGGCAACCCTCGTAGCCATTTGCTTCTTCGCTGCTGTCTCGTACTCCATGGGGCGGCTGACTtctggtaagt
ccctgtctgtcacgacgttacttttttttttacgaagttaggtgtattcctgcagtcaaagtttacgtcaaatttctcaaactttaaaacaattagctcc
ttattcttttgtaatttgactttattaaaatataagaatgaatttagcctaattctacaataataaaacgcactagtccatagtcccgctgaaagttat
ttttttcatgttctgcttaagtagaccaaacgacttttttttcctttcacatggggctatctctgactgatatttttatacctgcaatcttgcagtttcaatt
tcgttcgccttttatttgcactacttgggcacaaacaataaataacactacagaaatgttgaagaaaaaattatccttttttttccattgttctgttcaa
cttagaaccagaccttgtgacgttccctactagacaaggcaatttctttagcactcaactattaggttttaagctgacaggttattactgtatctgtat
tcgttttgattgcataattgacaaaatatttttttatttgccagtcataaatactcatccatttgtagcttctccacagtcactaaacaacaagaatga
agttctctaaaaacactcatcagttgttgttactaatgaactagtcctactgatttgatgttccactgcctacgcttaaacacattagaaactcggat
atttttaggccttagtgtcaccgtccggaaaacaaagacgaattgtaacatgcaataccgctccggtgtttctggcttgcctgcaaatttcttttgcc
ttgacgtttgagaacacaacaaagggcaaagcaggttcgaagattgctaggtgagccttcggaagaacgcttcaaaacaatggtaaacttattc
gccacttttttttttttggcaacagactcagtttcgccacgccatctcttgggtggccctggcacacttctggttcacgtatatatcctaattttctactc
attgttcttttattgtaagagtgaataagtacgacagtgctataagaggccatttcagaagatagcgcgcatacttgacttcggaattactgcaaa
accagccgtctagttcacaaccggaagtggttgggggctatttgagcactgtggcgtcaccacgcttcacctcacgcgagaaagagcggatagct
tgtagtttactgtgtgtcctaaaaagtttttttattatccttaagaagcataatttgacaccatatttagttcttccaatcttttagatcaaatttatgtat
tgttagttcctattaattttacgtagcctaatggcctatacgtttttgtgtcggttaatgtcaacctcttcactgcctctgagcctctttaaaattcaga
aatgtttgtctttgctgtgttttcttgagtttggcgatgacgaagtattttttcacaaaatatccttgtctaaaaatttatattaaactaccaagcatctt
gctcatgttttttttttttaattttatttcgccagctctgcggtatagaattgttcagttgtaactataagcagttctgaggaagatgctatatattaag
gacacgaatatcttatgtatttttcaaaccctctgcaGAGACACAATGCAGATTTCCTGTGCCAGTTACTTCATGCGCCGAA
GGGGCTAAACTTAGAACTGTCTACTCCTTTAACAACAATACAAACCAATGCGAGCCTTTGAAGGGGAGCTGT
GGAGAAGGTGTGAATCAATTTGAAACTGAAGACTGCTGCAGGCGGGAATGTCCGTACGGAA----------
AGCATTCCAAGGTCGGCAAGGTGTCCGACGGGACATTTTAAgatctcgctggctgcctctggagaaaggttctgcggagac
tactgcaaggcacttagaactcttgaaataaaactctgcat

Figure 15: Séquence connue du gène *IrSPI* et position des amorces utilisées pour les amplifications PCR. La séquence codante du gène est en gras avec le codon initiateur ATG en vert, et le codon stop en rouge, la séquence inconnue est en pointillés. Amorces : *F1 intron* en jaune, *F2 intron* en vert clair, *F3 intron* en vert foncé, *F4 intron* en bleu clair, *F5 intron* en rose, *F6 intron* en bleu foncé, *F7 intron* en gris clair, *F1 RACE* en lettre capitales marron, *F2 RACE* en lettre capitales bleues, *R2* soulignée en bleu et *ID 23882* soulignée en rouge.

4.1.3.6 Capture de séquences d'ADN cibles par hybridation à l'aide de billes magnétiques

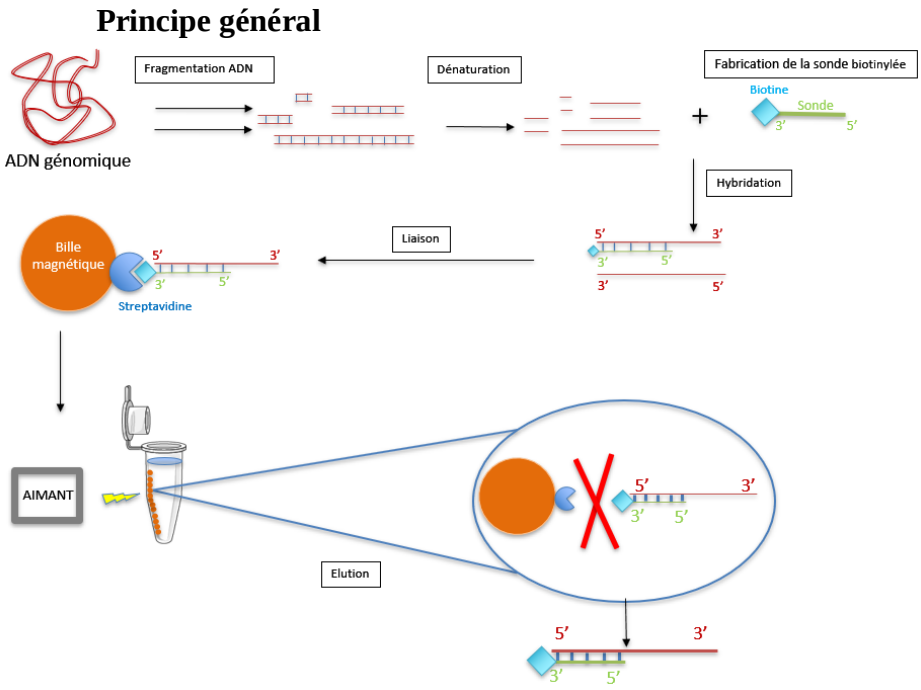


Figure 16: Principe général de l'expérience de capture de séquence d'ADN par l'utilisation de billes magnétique.

Pour obtenir la séquence ADN inconnue en 3' du gène *IrSPI*, nous avons utilisé le Kit Dynabeads Streptavidin Trial (ThermoFisher Scientific) (Figure 16). Ce kit permet, après fragmentation de l'ADN, de capturer à l'aide d'une sonde monocaténaire biotinylée complémentaire à une portion connue de la séquence recherchée, un fragment d'ADN contenant à la fois cette séquence et la séquence inconnue du gène recherché.

L'ADN génomique est dans un premier temps fragmenté par sonication ou digestion enzymatique. En parallèle, une sonde monocaténaire est préparée à partir de la séquence connue du gène d'intéret puis biotinylée en son extrémité 3'. L'ADN fragmenté est dénaturé puis mis en contact avec la sonde pour hybridation. L'ensemble est ensuite incubé avec des billes magnétiques afin que les sondes et les billes se lient par interaction covalente biotine-streptavidine, permettant l'isolement des ADN capturés et l'élimination des ADN et des sondes qui ne se sont pas liés aux billes. L'élution du fragment d'intérêt est ensuite réalisée, par rupture de la liaison biotine-streptavidine et sa séquence déterminée par séquencage avec ou sans une étape de clonage.

Synthèse de la sonde monocaténaire et biotinylation

Une sonde monocaténaire de 183 paires de bases (pb), située en 5' du gène *IrSPI* a été synthétisée :

5'(TGACTGAGACACAATGCAGATTTCCTGTGCCAGTTACTTCATGCGCCGAAGGGGCTAAACTTAG
AACTGTCTACTCCTTTAACAACAATACAAACCAATGCGAGCCTTTGAAGGGGAGCTGTGGAGAAGG
TGTGAATCAATTTGAAACTGAAGACTGCTGCAGGCGGGAATGTCCGTACGGAA) 3'.

Un ADN double brin a été amplifié à partir d'un plasmide contenant l'ADNc de IrSPI via les amorces 3F et 4R. Un ADN simple brin est ensuite synthétisé à partir de cet amplicon grâce à l'amorce 4R par PCR asymétrique. Cette réaction a été réalisée dans un volume final de 25µL contenant 0,8X de dNTP, 1X de tampon, 0,4 µM de l'amorce 4R, 5U de Taq polymérase (TaKaRa, Ozyme) et 300 ng d'ADN de tique. Le poids moléculaire du produit de PCR vérifié par électrophorèse révélée par GelRed®, il est ensuite purifié en utilisant le kit Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel). La sonde néosynthétisée est alors biotinylée en son extrémité 3' d'après les recommandations du kit Biotin 3' End DNA Labeling Kit (Pierce, ThermoFisher Scientific). La biotine est incubée avec 25 pmol de sonde pendant 30 min à 37°C en présence de Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) catalysant la fixation de la biotine en 3' de la sonde, réaction stoppée par l'ajout d'EDTA 0,2 M. L'ajout de 50 µL de chloroforme/isoamyl alcool (V/V) va permettre ensuite, après 2 minutes de centrifugation, l'extraction des sondes biotinylées se trouvant dans la phase aqueuse.

Fragmentation de l'ADN

L'ADN total de tique est fragmenté par digestion enzymatique ou sonication de manière à obtenir des fragments d'une taille compatible avec l'hybridation sur la sonde (taille maximale des fragments compatibles avec le kit : jusqu'à 1 kb).

En se basant sur un autre gène d'*I. ricinus* (*NDI,* numéro d'accession : JN248424.2) et sur le supercontig d'*I. scapularis* présentant le pourcentage maximum d'identité avec *IrSPI,* DS965545 (Vectorbase), nous avons sélectionné des enzymes de restriction dont les sites de restrictions étaient fréquents sans l'être trop et n'étaient pas présents dans la séquence de la sonde, tout en tenant compte de la présence d'au moins un site de restriction en 5' de l'exon 2 d'*IrSPI* pour pouvoir capturer de longs fragments d'ADN en 3'. Ainsi, trois enzymes ont été sélectionnées, Ase I, Hinc II et SnaB I (New England Biolabs), et testées séparément ou ensemble pour Ase I et Hinc II.

Chacune des digestions enzymatiques a été réalisée avec 1µg d'ADN de tique, 10U de l'enzyme de restriction et 1X de tampon approprié (NEB 3.1 pour les enzymes Ase I et Hinc II, et cutsmart pour l'enzyme SnaB I), dans un volume total de 50 µl pendant une heure à 37°C. Les enzymes ont ensuite été inactivées par la chaleur en suivant les recommandations du fabriquant (New England Biolabs) et les produits de la digestion utilisés pour l'expérience de capture.

La sonication de l'ADN a été réalisée avec 1 µg d'ADN de tique dans un volume de 1 ml en utilisant le sonicateur Bandelin HD 2070, avec la sonde MS 72. Différentes puissances (20% et 50%) et temps de sonication ont été évalués (2 fois 15 secondes, 2 fois 30 secondes, 1 et 2 minutes). L'ADN est ensuite concentré en suivant les instructions du kit NucleoSpin « Gel and PCR Clean up » (Macherey-Nagel) dans un volume final de 30 µl.

Hybridation de la sonde biotinylée et des fragments d'ADN total

L'ADN double brin fragmenté est dénaturé par chauffage à 100°C pendant 10 minutes, puis la sonde biotinylée est ajoutée (V/V) pour une hybridation réalisée à 60°C au bain-marie à sec pendant 3h.

Isolement des fragments d'ADN d'intérêt via les billes magnétiques

Le kit contient quatre types de billes magnétiques dont les propriétés diffèrent : M-270 Streptavidin, M-280 Streptavidin, MyOne Streptavidin C1 et MyOne Streptavidin T1. Les deux premières présentent un calibre de 2,8 µm et une capacité de liaison avec la sonde biotinylée de 200 pmol/mg de billes tandis que C1 et T1, de calibre 1µm, ont une capacité de liaison de 500 pmol/mg et de 400 pmol/mg respectivement. Une fois rincées, ces billes magnétiques permettent, grâce aux interactions entre la biotine et la streptavidine, de lier les complexes

sondes/ADN. Les trois types de billes M-280, C1 et T1 ont été testés ici. Après hybridation des complexes sonde/ADN, leur isolement utilise les propriétés magnétiques des billes qui vont les retenir lors des 3 lavages successifs. Afin de récupérer les complexes sonde-ADN, deux conditions d'élution ont été évaluées : eau à 70°C ou une solution de 95 % de formamide en 2M EDTA dans un volume final de 100 µl.

Dans le cas des élutions au formamide, l'éluât a été purifié à l'aide du kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean up » (Macherey-Nagel) et repris dans 22 µl.

4.1.3.7 Clonage dans le vecteur pGEM-T easy et séquençage

Avant clonage, l'élongation des extrémités simple brin du complexe sonde/ADN est réalisée avec 5U de Taq TaKaRa (Ozyme) et des dNTPs à 72°C pendant 30min ; l'enzyme sans activité exonucléase, permettant l'ajout d'un nucléotide A non apparié en 3' qui permet le clonage dans le vecteur pGEM-T easy (Promega, Figure 39 en annexe).

L'étape de ligation dans le vecteur aux extrémités cohésives (thymines en 5'), est réalisée pendant 2h à température ambiante avec un ratio ADN/vecteur de 5/1, 3U de ligase, et 1µL de tampon ligase dans un volume final de 12µL.

La construction plasmidique contenant le fragment d'ADN recherché est alors utilisée pour transformer des bactéries *Escherichia coli* DH_5 compétentes (kit Mix&Go, Zymo Research). Un volume de 100 µl de bactéries compétentes sont mises en présence de 6 µl de produit de ligation, ensuite 50 µl de suspension bactérienne sont étalés sur une boîte de Pétri contenant du milieu Luria-Bertani (LB), de l'ampicilline (50 µg/ml), de l'IPTG et du X-gal (Invitrogen) et incubés à 37°C pendant une nuit. Ne pousseront que les clones ayant intégré un vecteur qui leur confère une résistance à l'ampicilline, et seront sélectionnés ceux qui, ayant un insert ne pourront plus dégrader le X-gal et constitueront de ce fait des colonies blanches. Ces clones positifs sont par la suite cultivés en milieu LB liquide avec ampicilline (50µg/ml) à 37°C sous agitation, une nuit.

L'extraction de l'ADN plasmidique est alors réalisée à partir de 2 ml de culture liquide bactérienne grâce au kit NucleoSpin Plasmid (DNA purification) de Macherey-Nagel. L'élution finale s'effectue avec de l'eau pure à 70°C avec 2x20µl.

La séquence d'ADN exogène introduite dans le vecteur est amplifiée grâce aux amorces SP6 et T7 encadrant le site d'insertion sur le vecteur. Cette PCR est réalisée avec la Taq TaKaRa (Ozyme) dans les mêmes conditions que la PCR 3F-4R. Les poids moléculaires des produits de PCR sont vérifiés par électrophorèse puis les amplicons sont purifiés comme décrit précédemment grâce au kit NucleoSpin Gel and PCR Clean up afin de les faire séquencer (GATC biotech).

4.1.4 Résultats

4.1.4.1 Analyses in silico de la séquence du gène IrSPI

Identification de gènes homologues

La banque de données dédiée aux vecteurs d'agents pathogènes, Vectorbase (Vectorbase.org) regroupe beaucoup de séquences appartenant aux arthropodes vecteurs tels que les moustiques, les glossines, les tiques ou les phlébotomes. Parmi les espèces de tiques on retrouve *I. scapularis, I. ricinus* et *R. microplus*, mais seul le génome de *I. scapularis* a été entièrement séquencé [239].

Des recherches par Blast dans cette banque de données, nous ont permis d'identifier seize séquences de *I. ricinus* présentant une forte identité (comprise entre 76,9% et 98,9%) avec l'ADNc d'*IrSPI* (Tableau 4). Dix de ces séquences sont issues d'une première étude réalisée en 2013 par Schwarz et al [240] qui avait pour but de comparer l'expression de gènes dans les glandes salivaires au cours du gorgement, chez des femelles et des nymphes. Deux temps de gorgement pour chacune des stases ont été étudiés et comparés entre eux grâce à la technologie Illumina après qu'ait été réalisée une banque de référence des transcrits par pyroséquençage 454. Les 6 autres séquences émanent d'une seconde étude parue en 2015 ayant pour but de décrire les modifications transcriptomiques chez les nymphes et les femelles dans les glandes salivaires et l'intestin en réponse à l'attachement et au gorgement des tiques [241]. Les pourcentages d'identité identifiés montrent que *IrSPI* pourrait ainsi, chez *I. ricinus*, appartenir à une famille de gènes relativement proches les uns des autres.

Tableau 4: Tableau récapitulatif des séquences d'ADNc homologues d'IrSPI retrouvées chez I. ricinus.

Nom	Longueur de l'alignement avec IrSPI (en pb)	% De recouvrement	% d'identité	N° d'accession
Schwarz et al., 2013				
Ir2-23207	255	89%	82%	GADI01001709.1
Ir2-1529	255	89%	81,20%	GADI01007489.1
Ir2-5915	253	89%	80,80%	GADI01002565.1
Ir2-8388	234	82%	79,70%	GADI01000784.1
Ir2-5577	255	89%	79,60%	GADI01001735.1
Ir2-5772	255	89%	79,60%	GADI01007495.1
Ir2-5976	255	89%	78,80%	GADI01001733.1
Ir2-8909	246	86%	78%	GADI01001733.1
Ir2-5114	285	100%	77,20%	GADI01004575.1
Ir2-54664	285	100%	76,90%	GADI01004576.1
Kotsyfakis et al., 2015				
Irsgmg-150466	267	94%	98,90%	GANP01007846.1
Irmgsg-168635	271	95%	81,20%	GANP01001011.1
Irmgsg-169124	271	95%	81,20%	GANP01001111.1
Irsgmg-161164	252	88%	81,30%	GANP01009421.1
Irmgsg-176862	252	88%	80,80%	GANP01002050.1
SigP-177097	240	84%	81,70%	GANP01014341.1

Neuf gènes orthologues chez *I. scapularis* ont également été identifiés dans Vectorbase avec des pourcentages d'identité (entre 75,3% et 93,7%) et de recouvrement similaires à ceux observés chez *I. ricinus* (tableau 5). Trois de ces gènes (AF483693.1, AF483686.1, AF483681.1) ont été identifiés par Valenzuela et al. [242], lors d'un inventaire à la fois transcriptomique et protéique des glandes salivaires après 3-4 jours de gorgement, ayant conduit à l'identification de 735 ADNc. Trois ADNc (DQ066178.1, DQ066150.1, DQ066087.1) ont été découverts par Ribeiro et al. [243] dans une autre étude transcriptomique visant elle aussi à réaliser un catalogue des transcrits à différents temps au cours du gorgement chez des femelles entière (non gorgées, gorgées 6-12h, ou 18–24h) et chez des nymphes pré-gorgées (24-48h), représentant un total de 8150 ADNc répertoriés. Enfin, trois derniers gènes (DN970511.1, DN970337.1 et DN970313.1) ont aussi été découverts par Ribeiro et sont répertoriés dans un travail non publié chez des nymphes pré-gorgées pendant 48h.

Tableau 5: Tableau récapitulatif des séquences d'ADNc orthologues d'IrSPI retrouvées chez I. scapularis

N° d'accession	Longueur de l'alignement avec IrSPI (en pb)	% de recouvrement	% d'identité
Valenzuela et al., 2002			
AF483693.1	282	98,9%	76,20%
AF483686.1	242	84,9%	77,30%
AF483681.1	282	98,9%	75,30%
Ribeiro et al., 2006 et unpublished			
DQ066178.1	285	100,0%	93,70%
DQ066150.1	270	94,7%	78,10%
DQ066087.1	282	98,9%	75,50%
DN970511.1	285	100,0%	93,30%
DN970237.1	285	100,0%	93,30%
DN970313.1	270	94,7%	93%

Des analyses ont aussi été effectuées à l'aide de la fonction tBlastX de Vectorbase permettant la comparaison de la séquence traduite en protéine de l'ADNc d'IrSPI avec la traduction des ADNc contenus dans les banques de données chez *I. ricinus* et *I. scapularis*, ce qui explique que les résultats de la longueur de l'alignement soient donnés en pb (tableau 6). Les noms des gènes et non des protéines ont été conservés ici.

Tableau 6: Tableau récapitulatif des protéines homologues d'IrSPI retrouvées dans les banques de données de Vectorbase

Nom du gène	Longueur de l'alignement avec IrSPI (en pb)	% de recouvrement	% d'identité	N° d'accession
Ixodes ricinus				
Schwarz et al. 2013				
Ir2-23207	261	91,6%	70,10%	JAA72099.1
Ir2-1529	174	61,1%	75,90%	JAA66319.1
Ir2-5915	174	61,1%	74,10%	JAA71243.1
Ir2-8388	150	52,6%	68%	JAA73024.1
Ir2-5577	174	61,1%	69%	JAA72073.1
Ir2-5772	162	56,8%	72,20%	JAA66313.1
Ir2-5976	162	56,8%	72,20%	JAA72075.1
Ir2-8909	171	60,0%	68,40%	JAA66563.1
Ir2-5114	285	100,0%	67,40%	JAA69233.1
Ir2-54664	174	61,1%	68,40%	JAA69232.1
Kotsyfakis et al.2015				
Irsgmg-150466	267	93,7%	100%	JAB76622.1
Irmgsg-168635	285	100,0%	70,50%	JAB83457.1

Irmgsg-169124	285	100,0%	70,50%	JAB83357.1
Irsgmg-161164	261	91,6%	74,70%	JAB75047.1
Irmgsg-176862	171	60,0%	71,90%	JAB82418.1
SigP-177097	174	61,1%	75 ,90%	JAB70127.1
Ixodes scapularis				
Valenzuela et al.2002				
AF483693.1	285	100,0%	68,40%	AAM93615.1
AF483686.1	150	52,6%	64%	AAM93608.1
AF483681.1	207	72,6%	72,50%	AAM93603.1
Ribeiro et al.2006 et unpublished				
DQ066178.1	285	100,0%	91,60%	AAY66815.1
DQ066150.1	150	52,6%	66%	AAY66787.1
DQ066087.1	285	100,0%	67,40%	AAY66724.1
DN970511.1	285	100,0%	90,50%	DN970511.1
DN970237.1	285	100,0%	90,50%	DN970237.1
DN970313.1	270	94,7%	91 ,10%	DN970313.1

Suite à ces analyses, nous avons retrouvé chez *I. ricinus* une protéine identique à IrSPI (Irsgmg-150466), bien que le pourcentage de recouvrement ne soit pas total (93,7%). Il semble cependant que le peptide signal de cette dernière soit plus court que celui d'IrSPI, ce qui pourrait être dû à des erreurs de séquençage compte tenu de l'homologie parfaite du reste de la séquence. Cette protéine est également un membre de la famille des inhibiteurs de sérine protéases de type Kunitz et son gène est exprimé à la fois chez les nymphes et chez les femelles, au début du gorgement, dans les glandes salivaires (12h-24h chez les nymphes et 12h-36h chez les femelles). Seules les femelles présentent également une expression de l'ARNm correspondant à cette protéine dans l'intestin au cours du gorgement (12h-36h) [241].

Les autres protéines identifiées présentaient des pourcentages d'identité relativement faibles avec IrSPI (entre 68% et 75,9%). De plus, ces pourcentages d'identité sont à mettre en rapport avec des pourcentages de recouvrement, qui eux aussi sont faibles (52,8% et 56,8% respectivement pour Ir2-8388, et Ir2-5772, Ir2-5976), ce qui laisserait plutôt penser à des homologies de séquence correspondant à des domaines retrouvés chez d'autres protéines de la famille des inhibiteurs de serine protéases de type Kunitz chez cette tique. Tout comme pour Irsgmg150466, les ARNm correspondant à ces protéines sont synthétisés chez les nymphes et les femelles au cours du gorgement, avec chez les nymphes une augmentation de leur expression entre le début et la fin du gorgement quand une diminution est observée au cours du gorgement chez les femelles [240].

Chez *I. scapularis*, le pourcentage d'identité avec IrSPI des séquences traduites oscille entre 64% et 91,6% et les pourcentages de recouvrement sont compris entre 52,6% et 100%. DQ066178.1, identifié ici comme le gène le plus proche d'IrSPI avec 91,6% d'identité possède un pourcentage de recouvrement de 100%. Chez *I. scapularis* les pourcentages d'identité importants relevés pour 4 des protéines identifiées (DQ066178.1, DN970511.1, DN970237.1 et DN970313.1) montrent qu'*IrSPI* possèdent des orthologues proches chez cette autre espèce. Par ailleurs, ces protéines identifiées dans les glandes salivaires de nymphes de *I. scapularis*, font probablement partie du groupe des Monolaris (protéine à un seul domaine Kunitz) à cause de leur petit nombre d'acides aminés et de l'homologie avec la protéine AAY66815 qui appartient à ce groupe de protéines à domaine Kunitz [244].

Prédiction de la structure du gène IrSPI

Le serveur Genscan (http://genes.mit.edu/GENSCAN.html) a été utilisé pour prédire la présence d'exons et d'introns dans la séquence de *IrSPI*. L'analyse réalisée à partir de la portion connue du gène *IrSPI*, a montré la prédiction de deux exons un premier de 66 pb entre les positions 1 et 66 et un second de 218 pb entre les positions 1696 et 1914, et une séquence de poly adénylation signifiant la fin du gène entre les positions 1982 et 1987pb. Ainsi une structure similaire à celle obtenue précédemment par séquençage (Figure 13) avec 2 exons séparés par un intron de 1630 pb est donc retrouvée ici.

Les exons définis par Genscan et identifiés par séquençage ont alors été alignés sur le génome d'*I. scapularis* dans Vectorbase. Le premier exon de 66 pb matche à deux positions, sur le supercontig DS965545 du génome de scapularis entre 47060 et 47125 pb (89,39% d'identité), et entre 29788 et 29859 pb (85,5%). Le second exon de 177 pb, matche en deux positions sur ce même supercontig : sur 180 pb à la position 45169 (76,8% d'identité) et sur 176 pb à la position 27986 (74,3% d'identité). Néanmoins 43 pb de la séquence codante ne matchent en aucune position sur ce supercontig. En revanche, 82 pb en aval du codon stop (3'UTR) matchent en deux positions sur ce supercontig à 39590 et 21688 pb. Ce résultat suggèrerait la présence d'au moins un autre exon contenant les 43 pb manquantes, ce qui porterait à au moins 3 le nombre d'exons composant le gène *IrSPI* et impliquerait la présence, a minima, d'un second intron dans la séquence encore inconnue en 3'. Or la traduction en protéine de *IrSPI* et l'utilisation de tblastn a permis de mettre en évidence que les 6 derniers acides aminés présents juste avant le codon stop étaient identiques à ceux retrouvés sur la séquence traduite du supercontig DS965545 en position 21773 à 21789. *IrSPI* matche donc aussi sur ce supercontig

entre les positions 21689 et 21790, incluant les 6 derniers acides aminés, le codon stop et le début du 3'UTR. L'existence de cet exon en amont du codon stop serait donc en faveur d'un nombre total de 4 exons. Le même résultat est obtenu au niveau de la seconde position où matche *IrSPI* (entre les positions 39591 et 39692).

Ainsi, si on considère que le supercontig DS965545 du génome de *I. scapularis* correspond à l'horthologue de *IrSPI* chez cette autre espèce de tique, et que la structure de ce dernier peut être extrapolée à partir de ce gène, *IrSPI* serait constitué de 4 exons de 66 pb, 177 pb, 25 pb et 18 pb, d'un intron de 1630 pb et de deux autres introns de tailles encore inconnues (Figure 17). Il est à présent indispensable de valider une telle structure par séquençage. Malgré des matchs identifiés sur les premières données du génome de *I. ricinus* dans Vectorbase, en l'absence d'assemblage de ce génome, aucune conclusion n'est encore possible à l'heure actuelle.

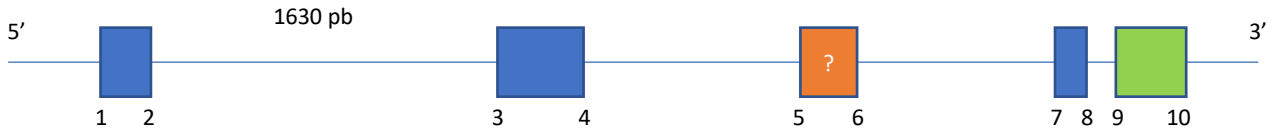


Figure 17: structure hypothétique du gène IrSPI *à l'heure actuelle de nos connaissances. Les exons dont les positions sont connues sont représentés en bleu. Le rectangle orange représente un exon dont la position est encore inconnue, et le rectangle vert représente le 3'UTR du gène* IrSPI. *A partir du supercontig DS965545 ont été établies, les positions de début et de fin des exons. Pour chaque position, deux valeurs sont assignées car deux positions homologues sur ce supercontig ont été identifiées. Position 1 : 47125 ou 29859 ; position 2 : 47060 ou 29788 ; position 3 : 45350 ou 28159 ; position 4 : 45169 ou 27986 ; position 7 : 39692 ou 21790; position 8 : 39673 ou 21772 ; position 9 : 39670 ou 21773 ; position 10 : 39589 ou 21689. Le seul intron de taille connue se trouve entre les positions 2 et 3 et correspond à une séquence de 1630 pb.*

4.1.4.2 Séquençage du gène IrSPI

Recherche de la séquence en 3' du gène IrSPI par amplification PCR

Afin de déterminer la séquence manquante en 3'du gène *IrSPI*, de nombreux couples d'amorces nucléotidiques ont été définis à partir de la séquence connue du gène (Figure 15). Les amorces sens sont situées dans la partie 3' de l'intron, et les amorces antisens dans le 3'UTR après le codon stop.

En se basant sur l'hypothèse où *IrSPI* ne possèderait qu'un seul et unique intron, déjà connu, nous devrions obtenir, pour les amplifications avec F1 intron-ID23882 et F2 intron-ID23882, des tailles d'amplicons de respectivement 430pb et 490pb. De ce fait, si des amplicons de plus petites tailles sont observés par électrophorèse, il s'agit surement d'amplifications non spécifiques. En revanche, si sont observés des amplicons de taille égale ou supérieure, cela pourrait correspondre à la partie 3' d'*IrSPI* : à taille égale il n'y aurait pas d'autres introns, et à

taille supérieure, il y aurait au moins un autre intron. Les résultats des amplifications sur trois échantillons d'ADN de tiques femelles *I. ricinus*, montrent soit des amplicons de taille inférieure à celle attendue (et donc de probables « mismatchs »), soit aucune amplification (Figure 18).

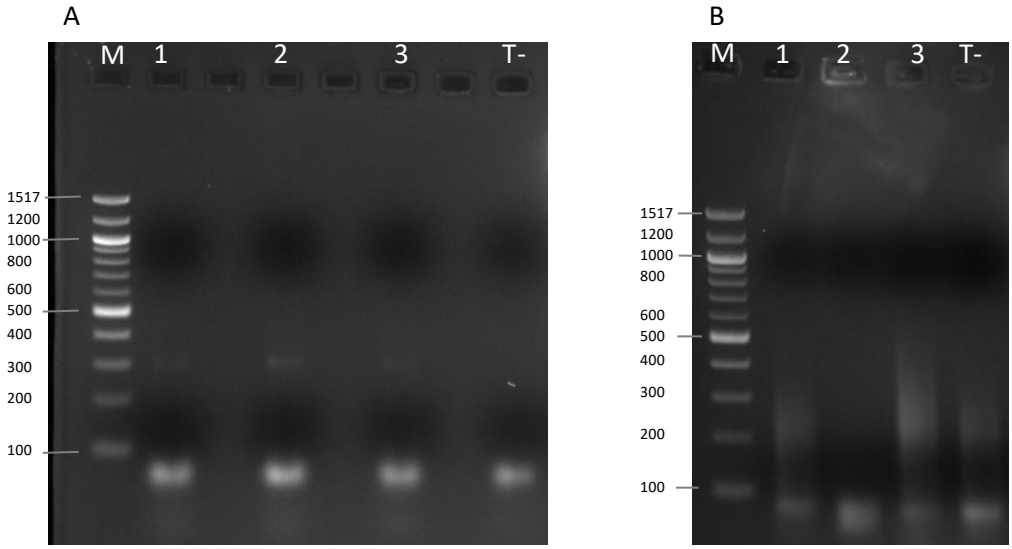


*Figure 18: Electrophorèses en gels d'agarose à 2% de produits de PCR obtenus après amplification par les amorces F1 intron-ID23822 (A) et F2 intron-ID23822 (B) de l'ADN d'*I. ricinus. *1à 3 : amplifications réalisées à partir d'ADN extraits de trois tiques femelles distinctes T- : témoin négatif. M : marqueur de poids moléculaire*

Devant ces résultats, de nouvelles amplifications utilisant de nouveaux couples d'amorces ont été réalisées avec F1 intron-R2 et F2 intron-R2 à partir de nouvelles extractions d'ADN de femelles *I. ricinus*. La taille minimum des amplicons attendue, dans l'hypothèse d'un seul intron, devrait ici être respectivement de 402 pb et 462pb. Les résultats de l'électrophorèse (Figure 19) montrent que les amplicons obtenus sont de taille inférieure, suggérant ici aussi une hybridation aspécifique des amorces ailleurs dans le génome.

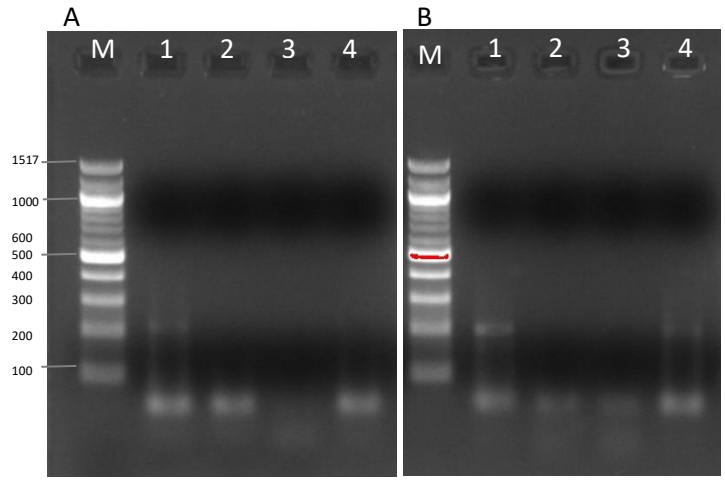


*Figure 19 : Electrophorèses sur gels d'agarose à 2% de produits de PCR obtenus après amplification par les amorces F1 intron-R2 (A) et F2 intron-R2 (B) de l'ADN d'*I. ricinus. *1à 4 : amplifications réalisées à partir d'ADN extraits de quatre tiques femelles distinctes M : marqueur de poids moléculaire*

Afin d'améliorer la spécificité des amorces pour le gène *IrSPI*, des PCR touchdown ont été réalisées en commençant les cycles d'amplification par une température d'hybridation très élevée puis en la diminuant progressivement. Ces PCR ont été réalisées avec les couples d'amorces F2 intron-R2 et F2 intron-ID23882 sur le même ADN provenant de femelles *I. ricinus.* Les tailles des amplicons obtenus se sont encore révélées inférieures au minimum escompté, impliquant que malgré l'augmentation de la spécificité de la PCR par la méthode du touchdown, nous n'avons toujours pas réussi à cibler le gène *IrSPI* (Figure 20). Un résultat similaire a été obtenu avec les couples d'amorces F1 intron-R2 et F1 intron-ID23882 (résultat non montré ici).

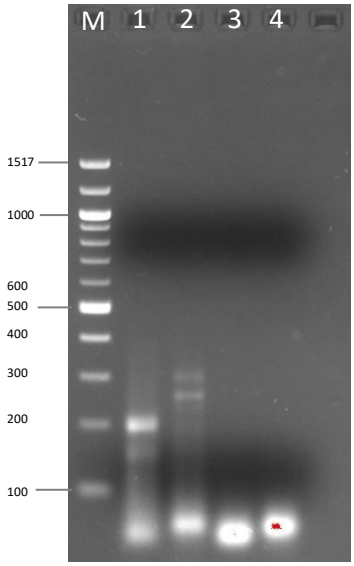


*Figure 20 : Electrophorèse en gel d'agarose 2% des amplifications par PCR touchdown par les amorces F2 intron-R2 et F2 intron-ID23882 sur de l'ADN d'*I. ricinus. *1 : amplification avec le couple d'amorce F2 intron-R2 et 2 : amplification avec le couple d'amorces F2 intron-ID23882. 3 et 4 : témoins négatifs. M : marqueur de poids moléculaire*

Afin d'augmenter la spécificité de l'amplification PCR, des protocoles de PCR nichées ont alors été utilisés avec de nouveaux couples d'amorces sens : F3 intron, F4 intron F5 intron F6 intron F7 intron, et antisens : ID23882 et R2. Pour la première PCR, nous avons testé toutes les amorces sens avec l'amorce ID23882, puis les produits obtenus servent de matrice pour une seconde PCR utilisant les mêmes amorces sens que précédemment mais l'amorce anti sens R2 interne au produit d'amplification. Dans l'hypothèse selon laquelle *IrSPI* ne possèderait qu'un seul intron, les poids moléculaires attendus des amplicons devraient ici être compris entre 740 pb pour F7 intron-ID23882 et 975 pb pour F3 intron-ID23882. Nos résultats de PCR ne présentaient néanmoins aucun amplicon de poids moléculaire compatible avec une amplification du gène cible (résultat non montré ici).

Une approche de type 3' RACE a alors été tentée afin d'augmenter la longueur de la séquence connue en 3' du codon stop pour y définir des nouvelles amorces utilisables ensuite sur l'ADN ; seulement 80pb étant connues en 3' du stop sur l'isotig contenant *IrSPI*. Ce type de PCR, en

ayant comme matrice nucléotidique des ARNs messagers rétro-transcrits à l'aide d'une amorce Oligo dT modifiée (Adapto primer), permet l'amplification de la séquence de l'ADN complémentaire entre la queue polyA à la fin du gène et une amorce spécifique définie sur le gène d'intérêt. Les amorces spécifiques utilisées ici sont F1 RACE et F2 RACE. Les résultats obtenus ont montré plusieurs amplifications probablement non spécifiques mais deux espèces moléculaires par couples d'amorces (Bandes 1-4 de la Figure 21) d'environ 250 à 400 pb ont néanmoins été purifiées pour clonage dans le vecteur pGEM-T easy et séquençage. Cinq clones positifs ont été sélectionnés par condition. Les résultats après amplification des inserts ont montré la présence d'une bande majoritaire dans la majorité des puits pour les quatre espèces moléculaires clonées (Figure 22). Les résultats de séquençage n'ont en revanche pas permis d'identifier la séquence connue d'*IrSPI,* supposant une amplification non spécifique. Les recherches d'homologie de séquences des produits obtenus sur le génome de *I. scapularis* ont en effet mis en évidence des pourcentages d'identité de 72 à 90% ce qui laisse supposer que nous avons bien amplifié de l'ADN de tique mais pas le gène *IrSPI* recherché. N'ayant pu obtenir la séquence en 3' de l'ARNm codant *IrSPI*, nous n'avons ainsi pas pu identifier de nouvelles régions cibles pour dessiner de nouvelles amorces.

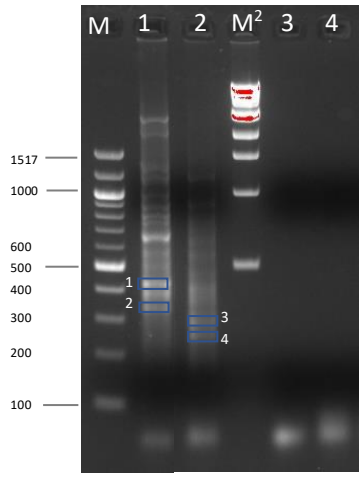


Figure 21: Electrophorèse en gel d'agarose 2% des produits d'amplification de l'ADNc de I. ricinus *avec les amorces F1 RACE-Adapto primer (puits 1) et F2 RACE-Adapto primer (puits 2). Puits 3 et 4 : témoins négatifs, M et M^2 : marqueurs de poids moléculaire. Les encadrés bleus 1, 2, 3, 4 indiquent les bandes qui ont été purifiées pour le clonage.*

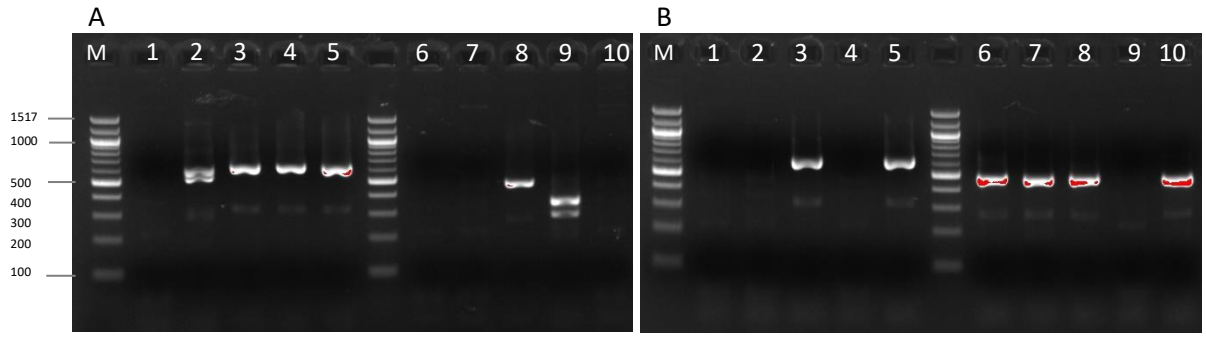


Figure 22: Electrophorèses sur gel d'agarose de produits d'amplification d'ADN de I. ricinus *après clonage.*
A : les puits 1 à 5 et 6 à 10 sont respectivement les produits des amplifications par PCR à partir des clones positifs transformés par le vecteur pGEM-T contenant l'espèce moléculaire 1 ou 2 encadrées Figure 17. B : les puits 1 à 5 et 6 à 10 sont respectivement les produits des amplifications par PCR à partir des clones positifs transformés par le vecteur pGEM-T contenant l'espèce moléculaire 3 ou 4 encadrées Figure 17. M : marqueur de poids moléculaire).

Différentes enzymes Taq polymérase, notamment permettant l'amplification de grands fragments d'ADN, ont aussi été utilisées afin de réussir à amplifier la séquence de *IrSPI* : Takara, Phusion et PrimeStar. Parmi les enzymes et les combinaisons d'amorces testées (F1 intron, F2 intron, pour les amorces sens, et ID23882, R2 et R3 pour les amorces antisens), seul le couple d'amorces F2 intron-ID23882 avec la Taq PrimeStar a permis l'amplification de 4 amplicons de 2800 pb, 1300pb, 1200pb et 700pb. Seul l'amplicon de 2800pb a pu être séquencé sur 640pb mais ces dernières ne correspondaient pas à *IrSPI*.

Nos tentatives diverses pour amplifier par PCR la partie 3' manquante du gène *IrSPI* ayant donc échoué, une nouvelle approche a été envisagée, la capture d'ADN en utilisant des billes magnétiques.

Capture d'ADN cible à l'aide de billes magnétiques

Afin de déterminer la séquence en 3' du gène *IrSPI*, des expériences de capture d'ADN avec des billes magnétiques couplées à la streptavidine ont été mises en place. Plusieurs méthodes de fragmentation de l'ADN génomique de *I. ricinus* ainsi que différentes techniques d'élution des fragments capturés ont été éprouvés.

Après synthèse, la taille de la sonde (183pb) a dans un premier temps été validée sur gel d'agarose. Les premiers essais de capture ont ensuite été réalisés avec les billes M280 et les enzymes de restrictions Hinc II et Snab I pour fragmenter l'ADN et avec une élution finale au formamide. L'amplification, après clonage, des fragments capturés a montré la présence d'un

amplicon d'environ 200 pb (Figure 23). Ce poids moléculaire, équivalent à celui de la sonde, nous laisse supposer que seule celle-ci a été récupérée au cours de cette première expérience.

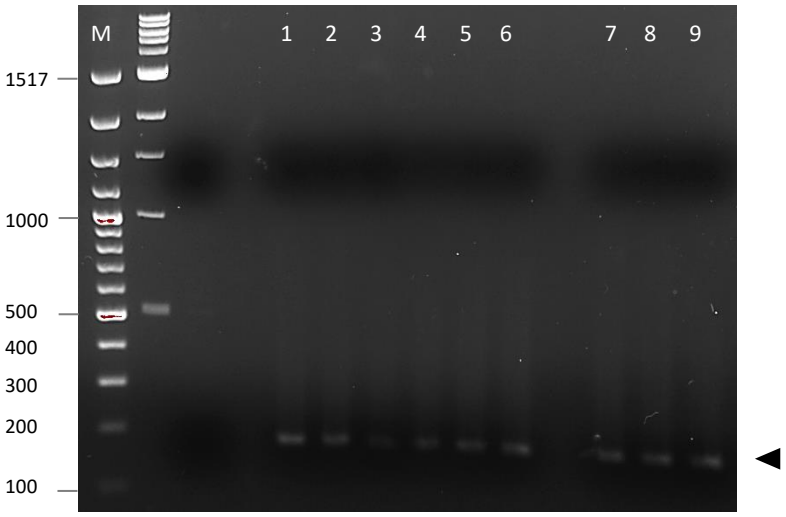


Figure 23: Electrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification, après clonage, des fragments d'ADN de I. ricinus capturés par la sonde de 183 pb. 1- 6 : fragments clonés après digestion de l'ADN par Hinc II. 7- 9 : fragments clonés après digestion par SnaB I. M : marqueur de poids moléculaire. La flèche noire désigne le poids moléculaie de l'espèce moléculaire amplifiée.

Ce premier résultat montrait que s'il n'y a probablement pas de problème au niveau des étapes de biotinylisation de la sonde, d'élution des fragments capturés ou du clonage, il semble y en avoir lors de celle d'hybridation de la sonde avec les fragments d'ADN cible. Il est aussi possible que les sites de restriction des enzymes soient trop éloignés les uns des autres, générant ainsi de très longs fragments qui ont des difficultés à s'hybrider sur la sonde qui ne fait que 183 pb.

De nouvelles expériences ont alors été réalisées dans les mêmes conditions, mais après fragmentation de l'ADN de *I. ricinus* par Ase I ou par sonication à 50% de puissance pendant 1 minute ou deux minutes. Le résultat obtenu après amplification des fragments capturés puis clonés était similaire avec un seul amplicon a environ 200pb quelles que soient les conditions testées.

Pour la suite des tests réalisés ci-après, j'ai pu bénéficier de l'aide de Béatrice Fédit, qui a réalisé son stage de DUT (DUT génie biologique, Université Clermont Auvergne) sur le sujet, et que j'ai encadrée au laboratoire.

Les précédentes expériences ont été répétées en utilisant les billes C1 pour la capture des sondes préalablement mises en contact avec de l'ADN digérés soit par Hinc II soit par Ase I. Après clonage, la présence et la taille des inserts ont été évalués sur gel d'agarose pour 5 clones issus de la digestion par Hinc II et 5 autres par Ase I. Des profils de migration identiques avec de multiples fragments d'ADN ont alors été retrouvés pour l'ensemble des clones ce qui laisse supposer une contamination. Pour pallier à cette contamination, les amplifications par PCR ont été renouvelées en présence de 10% de Diméthylsulfoxyde (DMSO) à partir des colonies isolées. Une seule et unique espèce moléculaire a alors été amplifiée mais, comme précédemment d'une taille avoisinant 200 pb et qui n'a pu être séquencée mais correspond ici aussi probablement à la seule sonde.

De nouvelles conditions ont alors été testées avec de l'ADN de tique ayant subi une sonication de 2 fois 15 secondes à 20% de puissance ou bien avec de l'ADN digéré simultanément par les deux enzymes de restrictions Ase I et Hinc II ; ceci afin de fragmenter davantage le génome, et d'augmenter la probabilité d'hybridation de fragment d'ADN cible avec la sonde. Les billes magnétiques C1 ont été ici utilisées pour récupérer les sondes après l'étape d'hybridation avec l'ADN de tique. Afin d'éviter les étapes de clonage, sources potentielles de contamination, une amplification par PCR a été réalisée directement sur les éluats avec les amorces 3F-4R, 3F-1R et 3F-ID23882. Les deux amorces anti sens 1R et ID23822 étant situées en 3' du codon stop du gène *IrSPI*, l'obtention d'un amplicon par PCR dont la taille serait au moins supérieure respectivement, à 241 et 302 pb, laisserait envisager une probable amplification de la partie 3' du gène *IrSPI* dans l'hypothèse où ce gène ne contiendrait que le seul intron déjà identifié.

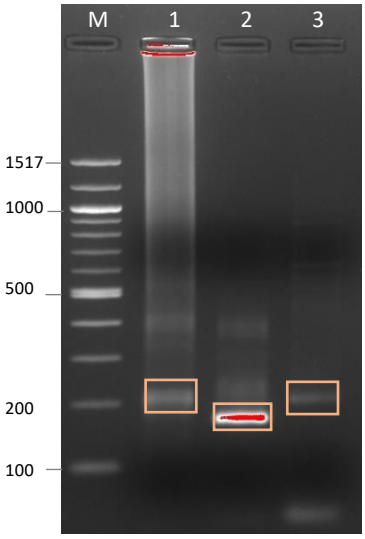


Figure 24: Electrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification par PCR, avec les amorces 3F-4R (1), 3F-ID23882 (2) et 3F-1R (3) à partir de l'éluât de l'expérience utilisant l'ADN doublement digéré par Ase I et Hinc II. Les carrés orange représentent les bandes qui ont été séquencées.

Chaque couple d'amorces, 3F-4R, 3F-ID23882 et 3F-1R, a permis l'amplification d'une espèce moléculaire majoritaire qui a été séquencée (encadrées en orange sur la Figure 24). Seule la bande la plus intense amplifiée avec le couple 3F-ID23882 dont le poids moléculaire avoisine les 180 pb a permis d'obtenir une séquence exploitable. Cette séquence s'hybride sur 163 pb de l'exon n°2 du gène *IrSPI* à cause d'une hybridation aspécifique de l'amorce ID23822. Dix nucléotides sur 21 de cette amorce sont en effet complémentaires d'une séquence située en 5' de l'amorce 4R utilisée pour la synthèse de la sonde expliquant ainsi le résultat obtenu.

Lors d'une dernière expérience, nous avons utilisé les billes magnétiques T1 avec de l'ADN digéré avec une seule enzyme de restriction à la fois (Ase I, Hinc II ou SnaB I), digéré simultanément par deux enzymes (Ase I et Hinc II), après 2 sonication de 30 secondes à 20% de puissance. L'élution de l'ensemble de ces expériences a été réalisée avec de l'eau à 70°C, et des PCR avec les amorces 3F-4R, et 3F-1R et 3F-ID23882 directement sur les éluats ont été réalisées en présence de 10% de DMSO. Des produits d'amplifications par PCR ont été obtenus uniquement pour le couple d'amorces 3F-4R, avec 2 bandes autour de 200 pb et 400 pb, alors que le couple 3F-ID23882 a montré l'amplification d'un fragment d'une taille de 200 pb (Figure 25). Les espèces moléculaires amplifiées dans les puits 3 et 11 ont été envoyées au séquençage mais aucune séquence n'a pu être exploitée.

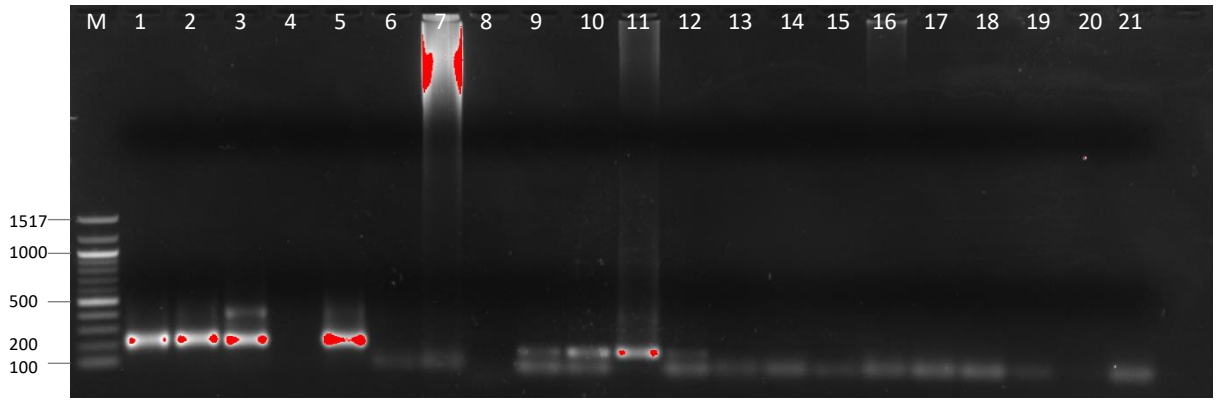


Figure 25: Résultats des amplifications par PCR avec les amorces 3F-4R (1-7), et 3F-1R (15- 21) et 3F-ID23882 (8- 14). Pour chaque couple d'amorces les échantillons ont été déposés dans l'ordre suivant : amplicons obtenus à partir des ADN issus des simples digestions avec Ase I, Hinc II, et SnaB I, puis obtenus par double digestion avec Ase I et Hinc II, et enfin après sonication 2 x 30 secondes à 20% de puissance. Les deux derniers puits sont des témoins négatifs, le premier est un témoin de capture d'ADN sans ADN et le second est celui de la PCR sans aucun ADN. M : marqueur de poids moléculaires.

4.1.5 Conclusions et perspectives

L'objectif de ce premier chapitre était d'obtenir la séquence complète du gène *IrSPI* afin d'en connaître la structure et de pourvoir étudier sa variabilité antigénique. Des travaux antérieurs avaient permis de créer un schéma préliminaire de la structure du gène montrant la présence de 2 exons (de 66 et 177 pb) entre lesquels s'intercale un intron de 1630 pb. Néanmoins, la partie 3' du gène étant toujours manquante, nous avons ici tenté d'une part de prédire sa structure par des recherches bioinformatiques et d'autre part, de séquencer cette partie du gène par diverses méthodes. Nos prédictions laissent supposer la présence de 4 exons au sein du gène, prédictions que nous ne sommes malheureusement pas parvenus à valider par séquençage.

La présence d'introns de grande taille, tel celui déjà identifié et comme supposé par les prédictions bioinformatiques, pourrait dans un premier temps expliquer l'échec d'une amplification de la partie manquante d'*IrSPI* malgré l'utilisation d'enzymes polymérases adaptées. L'alternative utilisée via la technique de capture sur billes magnétiques, si elle semble avoir techniquement fonctionné car ayant permis la capture d'une séquence de 163 pb déjà connue dans le gène, n'a malheureusement, elle non plus pas donné de résultats exploitables. Pour résoudre le probable problème d'hybridation de la sonde avec l'ADN cible, de nouvelles méthodes de fragmentation de l'ADN génomique utilisant des enzymes de restriction dont la fréquence des sites de coupure serait plus importante ou des temps de sonication plus long afin d'optimiser la taille des fragments d'ADN à capturer pourrait être envisagé. Il serait également possible d'optimiser la méthode de dénaturation de l'ADN, en utilisant de la soude par exemple. D'autres moyens pourraient aussi permettre d'obtenir ce fragment d'ADN, comme l'utilisation du southern-blot par exemple, même s'il est reconnu que les sondes utilisées actuellement en remplacement des sondes radiomarquées fonctionnent moins bien.

Les échecs répétés d'amplification du gène *IrSPI* à l'aide de multiples combinaisons d'amorces peuvent aussi s'expliquer par l'existence démontrée de nombreuses séquences répétées dans le génome des tiques [239], expliquant un potentiel manque de spécificité des amorces utilisées. Le génome de *I. scapularis* serait effectivement approximativement composé de 70% de séquences répétées [239].

Les recherches réalisées *in silico* ont par ailleurs démontré la présence de nombreux gènes très proches d'*IrSPI* chez *I. ricinus* avec des pourcentages d'identité compris entre 76,9% et 98,9% et un taux de recouvrement important. Ainsi il semblerait qu'*IrSPI* appartienne à une famille multigénique chez cette tique, bien que seules des données éparses de séquençage Shotgun sans

assemblage existent pour *I. ricinus* à ce jour. Chez *I. scapularis,* tique américaine très proche de *I. ricinus* et seule espèce séquencée [239], l'ADNc le plus proche d'*IrSPI* (DQ066178.1) présente lui aussi un fort pourcentage d'identité avec de nombreux autres gènes, dont ceux présentés dans le tableau 4 et 5. D'après l'analyse, chez *I. scapularis,* de gènes orthologues, deux événements de duplication auraient eu lieu ces 40 derniers millions d'années [239]. Or, sur le super contig qui partage le plus haut pourcentage d'identité avec *IrSPI*, DS965545, la séquence connue de notre gène d'intérêt matche en deux positions distinctes. Cela pourrait donc être effectivement le fruit d'une duplication du gène homologue, mais nous ne pouvons pas non plus exclure des problèmes dans l'assemblage du génome de *I. scapularis*.

La structure du gène *IrSPI* semble, d'après nos résultats d'analyse d'homologie de séquence, être composé de 4 exons. D'après l'étude de Dai et al. [244] réalisée chez *I. scapularis*, les gènes codant des protéines avec un seul domaine Kunitz seraient composés de 3 exons, le premier comportant le peptide signal, le second codant le domaine kunitz, et le dernier le codon stop. De plus, bien que les introns de ces gènes soient de longueurs hétérogènes, il semblerait que leur taille soit en général élevée, avoisinant en moyenne les 2000pb, et donc plus proches de celles retrouvées chez les vertébrés que chez d'autres invertébrés [239].

En se basant sur l'homologie de séquence qu'*IrSPI* partage avec DQ066178.1 chez *I. scapularis,* nous pouvons dire qu'*IrSPI* appartient au groupe 2 des gènes codant des protéines à un domaine kunitz [244]. Ce groupe représente un cluster de gènes ayant évolué séparément du groupe 3 chez les tiques du genre *Ixodes*, à l'opposé des gènes du groupe 1 qui sont partagés par plusieurs espèces de tiques et d'autres espèces de bilatériens ou de cnidaires et apparait comme un groupe ancestral [244]. Les gènes du groupe 2, ont, au cours de l'évolution, acquis de nouvelles fonctions par rapport au groupe 1 ancestral dont les fonctions principales sont la régulation de la coagulation sanguine. En effet, ils ont acquis la capacité d'interagir avec des canaux ioniques, et peuvent ainsi, par exemple, en plus de réprimer l'activité de sérine protéases, être acteurs dans la modulation de l'ingestion de sang au cours du repas sanguin et dans la modulation des réactions immunitaires de l'hôte vertébré [245].

En conclusion, comme seules des données de séquençage Shotgun sans assemblage sont à l'heure actuelle disponibles, seul le séquençage du génome d'*I. ricinus* pourra apporter des réponses à notre questionnement sur la structure du gène *IrSPI*. Un tel projet est actuellement en cours (projet GENERIC) sous l'impulsion de collègues de l'INRA de Nantes mais les données ne sont pas encore disponibles.

Ainsi, dans l'attente du séquençage complet de ce génome, et pour évaluer la variabilité antigénique d'*IrSPI*, l'idéal serait maintenant de recommencer une collecte de tique à l'échelle européenne en prenant soin de ne récupérer que les individus vivants afin de pourvoir en extraire l'ARN, et de séquencer la séquence codante du gène pour des études comparatives.

Chapitre II : Etude de l'expression et de la fonction d'IrSPI dans la biologie et le gorgement de la tique *I. ricinus*

4.2.1 Introduction

Comme mentionné dans la revue présentée en introduction de ce mémoire, les inhibiteurs de sérine protéases peuvent avoir de multiples fonctions chez les tiques. Parmi elles on retrouve des implications dans la ponte des œufs, leur maturation et l'éclosion, dans la mue, dans l'homéostasie et le système de défense immunitaire des tiques, dans la coagulation de l'hémolymphe, et dans l'ingestion et la digestion du sang. Lors de la prise du repas de sang, certains de ces inhibiteurs agissent sur les réponses de l'hôte à la piqûre de la tique en inhibant la coagulation sanguine au niveau des voies de la coagulation intrinsèque et extrinsèque, en réprimant l'angiogenèse via une induction de l'apoptose cellulaire, et enfin en modulant les réponses immunitaires de l'hôte.

L'objectif de ce chapitre 2 est d'étudier et de comprendre le rôle d'IrSPI dans la biologie de la tique *I. ricinus*, au travers des actions qu'il peut exercer, à la fois chez la tique elle-même, puis chez l'hôte vertébré lors de la prise du repas sanguin.

L'étude de l'expression d'un gène à la fois dans le temps et l'espace apporte des indications essentielles quant à son rôle dans l'organisme dont il est issu. Nous savons d'ores et déjà que l'infection par la bactérie *B. henselae* est un des stimuli qui induit une sur-expression de *IrSPI* au niveau des glandes salivaires de la tique *I. ricinus* femelle quatre jours après le début du gorgement [232]. Le gorgement des tiques n'étant pas un processus linéaire dans le temps, une analyse plus fine de son expression au cours du gorgement est à présent requise pour comprendre le rôle d'*IrSPI* lors de ce processus vital pour la tique. Par ailleurs, l'expression de ce gène pourrait ne pas être cantonné aux glandes salivaires, et la mise en évidence d'une expression dans d'autres organes de la tique serait aussi indicative du rôle de cet inhibiteur de sérine protéases dans la biologie du vecteur. Enfin, il est nécessaire de savoir si *IrSPI* est exprimé à tous les stades de la tique, et notamment chez les œufs et les males qui ne se gorgent pas pour envisager d'autres fonctions que celles mises en évidence dans l'infection par une bactérie et la prise du repas de sang. Enfin, l'expression d'*IrSPI* a été évaluée dans d'autres conditions d'infection par une autre bactérie transmise, *B. birtlesii*, et par une bactérie non transmise, *E. coli*, pour mettre en évidence un rôle potentiel d'*IrSPI* dans la réponse immune de la tique.

La démonstration antérieure, par ARN interférence, de l'implication de *IrSPI* dans la prise du repas sanguin par la tique [232] pouvait laisser supposer un impact de cet inhibiteur chez l'hôte vertébré au cours de ce processus. Pour répondre à cette question, il était dans un premier temps essentiel d'établir si cette protéine est ou non sécrétée lors du repas sanguin et injectée à l'hôte. Les analyses fonctionnelles d'un possible impact d'IrSPI chez l'hôte réalisées ensuite, nécessitaient l'utilisation d'une protéine recombinante qui a été ici synthétisée en cellules S2 de drosophile. Cette protéine recombinante nous a dans un premier temps permis de vérifier les prédictions bio-informatiques réalisées concernant les structures secondaires et les modifications post-traductionnelles d'IrSPI. Elle a ensuite permis d'identifier la sérine protéase cible de cet inhibiteur. Enfin, cette protéine recombinante nous a permis d'évaluer l'impact d'IrSPI sur les réponses de l'hôte vertébré liées à la piqûre de la tique, dont la coagulation, l'angiogenèse des cellules endothéliales, et la modulation des réponses immunitaires au niveau du site de piqûre, en particulier sur les lymphocytes et les macrophages.

L'ensemble des matériels et méthodes, des résultats et leur discussion est présenté sous la forme d'un manuscrit en préparation pour une soumission au journal PLOS Pathogens. De plus, des expériences et résultats complémentaires non inclus dans la publication prévue sont présentés dans une seconde partie, par manque de place dans la publication ou parce que certaines expériences nécessitent d'être renouvelées.

4.2.2 Article en préparation

The immunomodulatory effect of IrSPI, a salivary gland serine protease inhibitor involved in *Ixodes ricinus* tick feeding.

Short title: IrSPI, an *Ixodes ricinus* saliva immunomodulator of host immune system

Blisnick A. A.[1], Šimo L.[1]; Grillon C. [2], Fasani F.[2], Brulé S[3], Le Bonniec B.[4], Prina E.[5], Marsot M.[6], Richardson J.[7], Bonnet S.I.[1*]

[1] UMR BIPAR, Animal Health Laboratory, INRA, ANSES, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France

[2] Centre de Biophysique Moléculaire - UPR 4301, Orléans, France

[3] Plateforme de Biophysique moléculaire, Institut Pasteur, UMR 3528 CNRS, Paris, France.

[4] INSERM UMR-S1140, Faculté de Pharmacie Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

[5] Unité de Parasitologie moléculaire et Signalisation – INSERM U1201, Institut Pasteur, Paris, France

[6] Unité EPI, Animal Health Laboratory, INRA, ANSES, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France

[7] UMR 1161 Virologie, INRA, ANSES, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

*Corresponding author

E-mail: sarah.bonnet@vet-alfort.fr (SIB)

Abstract

Ticks are strict hematophagous arthropods and represent the most important vectors of pathogens affecting domestic and wild animals worldwide and second to mosquitoes as vectors of human pathogens. Hard tick feeding is a slow process, taking up to several days for repletion prior to detachment, and necessitates extended control over the host response. The success of the feeding process depends on the tick injecting saliva, which must, not only control host haemostasis and wound healing, but also subvert the host immune response to avoid tick rejection during the lasting process. In turn, the manipulation of the host immune response creates a favourable niche for the survival and propagation of diverse tick-borne pathogens transmitted during feeding. Here, we report on the molecular and biochemical features and functions of IrSPI, a serine protease inhibitor from *Ixodes ricinus* saliva involved in acquisition of the blood meal. Our results show that IrSPI harbours the typical fold of the Kunitz type I serine protease inhibitors and that it inhibits the serine protease elastase, and to a lesser extent, chymotrypsin. We also show that IrSPI is injected into the host during feeding. Crucially, IrSPI was found to have no impact on tissue factor pathway induced coagulation, fibrinolysis, apoptosis or angiogenesis but to mediate a strong effect on immune cells. IrSPI affected macrophages as antigen presenting cells by diminishing their IL-5 production. In addition, IrSPI repressed mitogen-stimulated proliferation of $CD4^+$ cells, and in the absence of mitogen, induced proliferation of B cells. Inhibition of T cell proliferation was associated with marked diminution in pro-inflammatory cytokine secretion. Our study contributes to a better understanding of tick-host interactions and provides insight that can be exploited for the design of a vaccine candidate against tick bites, by targeting an immunomodulator implicated in the feeding success of *I. ricinus* ticks.

Author summary

In Europe, ticks represent the most important vector for both human and animal health, *Ixodes ricinus* corresponding to the most abundant species. Ticks feed on blood for an extended period of time during which their saliva favors both feeding and pathogen transmission by interfering with host responses. A better understanding of tick-host-pathogen interactions is central to the discovery of improved control methods. In that context, we previously identify IrSPI as an *I. ricinus* salivary molecule implicated in both tick feeding and bacteria transmission. Here, this serine protease inhibitor was almost characterized as an elastase inhibitor. We found that it was overexpressed during blood feeding in several tick organs, and especially in salivary glands. We then demonstrated that IrSPI is injected to the host through saliva, and despite no impact found on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells, we reported an immunomodulatory role along blood feeding, with the repression of T $CD4^+$ lymphocyte proliferation, increase of B cell proliferation, and modification of the cytokine secretion pattern of both splenocytes and macrophages. Our study provides new insights into the complex armament develop by ticks to overcome the host response and then a potential target against their feeding process and pathogen transmission.

Introduction

Ticks are obligate hematophagous arthropods able to feed on diverse vertebrate hosts including mammals, birds, amphibians and reptiles. They cause substantial economic losses in the livestock industry due to blood spoliation and secondary infection of bite wounds, which consequently decrease food production and the value of leather. Crucially, ticks are excellent vectors of pathogens including bacteria, parasites and viruses. They represent, after mosquitoes, the second most important vector of human pathogens, and the first for animal health [1]. In particular, the hard tick *Ixodes ricinus* is the most widespread and abundant tick species in Europe, as well as the most efficient transmitter of pathogens of major concern to both human and animal health [2]. This tick species follows a three-host life cycle and involves three distinct stages that feed only once on their respective hosts.

The blood meal of hard ticks represents one of the longest feeding processes by blood feeding arthropods, taking over ten days for adults in several species and thus causing severe tissue damages. The success of the blood meal is critically dependent on saliva, which represents the primary tick-host interface (reviewed in [3]). Indeed, tick saliva possesses essential properties that facilitate feeding, including its ability to repress host pain at the tick bite site, thus preventing detection by the host. In addition, tick saliva has the capacity to counteract the host's haemostatic and immunological responses at the site of injury. As pool-feeders, ticks create a haemorrhagic blood-pool and alternate blood absorption with saliva injection such that the anti-coagulant properties of the saliva maintain the blood-pool in a fluid state through blocking blood coagulation cascade activation and promoting fibrinolysis. Moreover, tick saliva impedes the host's innate immune system by preventing complement activation and immune cell recruitment, thus precluding tissue remodelling and angiogenesis as well as local inflammation. Due to the repression of lymphocyte recruitment to the tick bite site, tick saliva also impairs anti-tick adaptive immune responses. Finally, these tick bite-associated processes create an environment that is favourable to the transmission of tick-borne pathogens (TBP) to the host.

A better understanding of tick-host-pathogen interactions is central to the discovery of improved control methods for ticks and tick-borne disease (TBD) [4]. In order to identify tick factors involved both in tick biology and in pathogen transmission, we previously compared gene expression through NGS technologies in salivary gland (SG) tissue from uninfected and *Bartonella henselae*-infected *I. ricinus* ticks [5]. This gram-negative bacterium is responsible of cat scratch disease in human and is transmitted from cat to cat by fleas. But, albeit most part of its transmission to human is due to scratches and bites from infected cat, we have previously demonstrated that *I. ricinus* is also able to transmit it [6]. A small percentage (5.6%) of genes was found to be modulated by bacterial infection.

The most highly overexpressed gene – that we named *Ixodes ricinus* serine protease inhibitor (*IrSPI*) – encoded a putative serine protease inhibitor (IrSPI). Preliminary functional analysis by RNA interference (RNAi) revealed that IrSPI was implicated in tick feeding as well as in *B. henselae* infection of tick SG, rendering it a promising target for a vaccine against *I. ricinus*. Also justifying our interest for IrSPI, it is known that several serine protease inhibitors are involved in the abovementioned processes maintaining the blood-pool by the tick saliva [7]. In fact, serine protease inhibitors represent one of the main protein family injected to the host by ticks along blood feeding due to the key roles of proteins they inhibit in host regulation of coagulation, angiogenesis, haemostasis and immune responses. Moreover, in ticks, some of them are involved in blood digestion, tick innate immune system, tick reproduction, as well as pathogen transmission [7].

The aim of this study was to elucidate the role of *IrSPI* both in tick biology and at the interface of the tick and its vertebrate host during feeding. *In silico* characterization of IrSPI confirmed that it belonged to the Kunitz type I family of inhibitors of serine proteases. We showed that *IrSPI* was induced during blood feeding and was injected into the host, suggesting that it is involved in modulating the host responses to tick feeding. Through recombinant expression, we found that IrSPI inhibited elastase but did not interfere with the tissue factor pathway of blood coagulation, fibrinolysis, endothelial cells apoptosis or angiogenesis. Finally, we demonstrated the implication of IrSPI in the modulation of the host immune response by reducing T lymphocyte proliferation and by altering the cytokine profile expression of both macrophages and splenocytes.

Results

Molecular characterization of IrSPI

The full-length *IrSPI* cDNA encompasses a 321-nucleotide open reading frame encoding a 19-residue signal peptide followed by a 285-nucleotide sequence encoding a 94 amino acid protein. *I. ricinus* and *I. scapularis* sequences that present the greatest degree of identity with IrSPI are shown in Fig 1A. IrSPI sequence harboured 7 cysteines potentially forming 3 disulfide bonds. The putative mature protein has a molecular mass of 8163.10 Da, a single potential N-glycosylation site and 10 putative phosphorylation sites (Fig 1B). To investigate these post-translational modifications, recombinant IrSPI expressed in Drosophila S2 cells was analysed with the UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker-Daltonics, Germany). Results revealed a 990 Da shift between the

practical mass (13,034 Da) and the theoretical mass (12,044 Da), consistent with 10 phosphoryl groups (80 Da) and a single N-linked glycan (161 Da) as previously hypothesized through NetNGlyc 1.0 and NetPhos 3.1 servers (Fig S1).

The predicted protein structure, as determined by using Phyre 2 software, consists of 2 β-sheets, 2 α-helix, and a single Kunitz-like inhibitory domain, suggesting that IrSPI belongs to the Kunitz type I protease inhibitor family (Fig 1C). IrSPI recombinant protein was used to confirm this structure but circular dichroism experiments failed to reveal the expected α-helix signals (Fig S2). In addition, the main population observed in analytical ultracentrifugation (AUC) had a sedimentation coefficient of 1.6S and a frictional ratio (f/f0) of 1.2, consistent with a monomeric and globular IrSPI (Fig S3).

Taking into account that the absence of helix into IrSPI structure may not allowed the formation of disulphide bonds that probably exposed hydrophobic residues to the protein surface, the globular aspect of IrSPI could be the consequence of the abortion of native folding process and its globular form might represent an intermediate of folding and not the real structure of IrSPI. Altogether, the results suggested that the recombinant protein may have been misfolded, which might compromise its functional activity as a protease inhibitor. Consequently, inhibition assays of the serine proteases were performed with a refolded form of IrSPI and the refolding buffer used as control.

Inhibition of serine proteases

In accordance with the presence of an Alanine as P1 residue, we hypothesized that IrSPI could inhibit serine proteases of the elastase-like family. To test this prediction, the ability of IrSPI to inhibit cleavage of their respective substrates was evaluated for several serine proteases including elastase. Although no inhibition on any serine proteases was evidenced with the non-refolded protein, after refolding, IrSPI in excess (1 μM) decreased the catalytic activity of elastase to a moderate extent (23.9%), and very slightly that of chymotrypsin (1.7%) (Fig 2). No inhibition of trypsin, thrombin or kallikrein was detected.

IrSPI expression and localization of its product

To explore IrSPI function, transcriptional investigations in all tick stages from our *I. ricinus* pathogen free colony were performed by quantitative RT-PCR. IrSPI mRNA was not detected in eggs, unfed larvae, nymphs, and adults of both sexes, or in fed larvae at day 1 and 3 of engorgement. However, comparison of the transcript abundance in unfed, 3 days fed, and 5 days fully engorged

nymphs, revealed a significant up-regulation of the IrSPI mRNA following 5 days feeding (Fig 3A). The expression of IrSPI mRNA in different tissues was then evaluated in a pool of 17 field females pre-fed for 5 days on rabbit, which was shown to be infected with *Babesia venatorum* and *Rickettsia helvetica* by PCR as previously described [8]. Results showed that in adults and at roughly half way through feeding, *IrSPI* is expressed in SG, guts, synganglions, ovaries and the rest of tick body (carcasses) with a significant higher expression in SG (Fig 3B). *IrSPI*-specific transcripts were then analysed in various organs of *B. henselae*-infected *I. ricinus.* The results confirmed its over-expression following infection in SG, and revealed an up-regulation also in gut and to a lesser extent in ovaries (Fig 3C). Such overexpression was not found following infection with *B. birtlesii,* a phylogenetically proximal bacterium.

The expression of *IrSPI* was also analysed after infection of ticks with a non-transmitted pathogen, *Escherichia coli,* to estimate its potential implication in the tick innate immune response. The efficiency of this response was validated in parallel by evaluation of the expression level of *defensin6*, which is known to be up-regulated following *E. coli* infection in ticks [9]. While we confirmed that *defensin6* was up-regulated following infection, expression of *IrSPI* was unchanged (Fig 3D).

To document *IrSPI* expression in the salivary glands and to determine whether the gene product would be present in tick saliva injected into the vertebrate host, mRNAs of *IrSPI* were analysed by *in situ* hybridization in salivary glands of pathogen-free, partially fed, females. The *IrSPI* transcript was identified in the secretion vesicles of type II acini, responsible for tick saliva secretion in hard ticks [10] (Fig 3E). The presence of IrSPI protein was then studied in tick saliva and in salivary gland extracts obtained from a pool of 17 *I. ricinus* females from the field after a 5-day pre-feeding step on rabbit. SDS-PAGE analysis revealed major differences in the protein composition of saliva and salivary gland extracts, with a higher quantity of proteins in the salivary glands (Fig 4A). The presence of IrSPI was confirmed by western blot analysis using an antiserum from mice immunized with recombinant IrSPI (Fig 4B), as well as a serum collected from a tick-infested rabbit (Fig 4C). Native IrSPI was only faintly detected by the mouse antiserum in the tick salivary glands and not at all in its saliva (Fig 4B). However, its recombinant counterpart was detected by the serum raised in tick-infested rabbit demonstrating that IrSPI generated an antibody response in rabbit and is indeed injected by ticks into the host though the saliva along blood feeding (Fig 4C). These results suggested possible difference regarding immunogenicity/conformation and/or protein quantity between the recombinant and native proteins since mouse antiserum recognized less native than recombinant IrSPI.

Anticoagulant activity

The hypothesis that IrSPI might display anti-coagulant activity was evaluated through thrombin generation and clot waveform assays. Thrombin formation was triggered by adding calcium to a premix of plasma, phospholipid vesicles and tissue factor, in the presence or absence of various amounts of 'refolded' IrSPI. Analysis of the kinetics suggested that IrSPI had little or no impact on clot formation (Fig 5). At concentrations up to 0.8 µM IrSPI, the lag-time of clot formation and amounts of thrombin formed were comparable between the positive control (peak-high at 371 s) and samples containing IrSPI (peak at 371 s) or refolding buffer alone (peak at 357 s) (Fig 5A). IrSPI had no significant impact on fibrin formation either, clotting-times of 105 s versus 119 s for controls (with and without refolding buffer) and containing IrSPI, respectively (Fig 5B). To evaluate the ability of IrSPI to modulate clot stability, its potential influence on clot lysis was also investigated. Fibrin formation was triggered as above with a mixture of phospholipid vesicles, tissue factor and calcium, but in the presence of tPA to induce fibrin clot lysis. Again, no significant impact on the half-lysis times between refolding buffer with or without IrSPI could be detected (512 versus 528 s, respectively; Fig 5C).

Apoptosis and Angiogenesis

As IrSPI was shown to be a component of the tick saliva, we next hypothesized that it could modulate formation of new vessels by promoting apoptosis and/or inhibiting microvascular endothelial cell proliferation. The ability of IrSPI, refolded or not and cognate media as controls, to induce apoptosis was first evaluated in HsKMEC endothelial cells using cell viability and apoptosis markers, i.e., cells labelled with Annexin V-FITC but not propidium iodide corresponding to viable cells, by flow cytometry (Fig 6). Addition of 1 µM IrSPI refolded or not to culture medium had only a weak effect (11.9% and 9.2% versus 10.5 % with culture medium alone); the highest effect was actually obtained by adding refolding buffer without IrSPI (25.5%).

Two endothelial cell lines were used to investigate the impact of IrSPI on angiogenesis: HskMEC and HEPC-CB1. For this purpose, we first evaluated the toxicity of IrSPI (between 0.0625 and 2 µM) refolded or not as well as that of the culture and refolding media on HsKMEC cells. Concentrations of 0.5 µM and 1 µM refolded IrSPI that did not induce any significant toxicity (mortality of 18% and 29%, respectively) compared to the control, were used to evaluate its impact on angiogenesis. Compared with culture medium, non-refolded IrSPI at any concentration had no effect on the number of junctions, master junctions, segments, master segments, meshes or total segment length for two endothelial cell lines, namely, HsKMEC and HEPC-CB1 (Fig 7). In both cell lines, and depending on the concentration, the refolded IrSPI had also no impact on some of these angiogenesis parameters or,

when it decreased some of them, our results showed that it was mainly due to the refolding buffer and not to IrSPI itself (Fig 7).

Splenocyte proliferation assay

Next, we tested whether IrSPI might have a role in host immunomodulation during tick feeding. Splenocytes isolated from 3 OF1 mice were cultured in the presence or absence of ConA for 3 days and the impact of unrefolded IrSPI on three lymphocyte subsets ($CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, B cells) proliferation was evaluated by CFSE dye dilution assay *via* flow cytometry. As expected, we observed no cell proliferation in absence of Con-A. Then under ConA-mitogen stimulus, total splenocytes were in proliferation. This observation was due to responses of T-cells since ConA does not induce B cell proliferation. Results presented in Figure 8 showed that CFSE staining was not perfectly similar for the 3 experiments due to the use of non-inbred mice.

In the absence of mitogen stimulation, no effect was observed on either of the T cell subsets when, in unstimulated B cells, a substantial increase in cell division was observed (+28.31%) in the presence of IrSPI. This last result should be taken with a certain degree of caution, due to the small number of gated cells. Indeed, only live cells were taken into consideration for analysis of proliferation, and the number of live cells remaining after the 3-day incubation was quite low. Indeed, with unstimulated splenocytes, 214 ± 149 (SD) gated B cells were counted per well in the absence of IrSPI, while only 55 ± 25 (SD) gated B cells were counted when splenocytes had been incubated in the presence of IrSPI.

Upon ConA stimulation and in the presence of IrSPI, $CD8^+$ T cells exhibited a decrease in proliferation (-3.6%), which did not reach statistical significance. In contrast, proliferation of $CD4^+$ T cells was significantly diminished (-18%) in the presence of IrSPI. IrSPI reduced then the number and intensity of peaks for both $CD4^+$ and $CD8^+$ positive cells, validating its role in immune modulation.

Cytokine expression in response to IrSPI

In order to gain insight into how IrSPI might influence immune cells, cytokines and chemokines secreted in the supernatants of mitogen-stimulated and unstimulated splenocytes were compared by using a multiplex bead-based assay. The 26-plex panel included 17 cytokines representative of multiple T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 and Treg) and 9 chemokines. In the absence of mitogen stimulation but in the presence of IrSPI, secretion of several cytokines and chemokines were

significantly diminished (P<0.01), in particular IP-10 (-32.8%), MCP-3 (-72.3%), MIP-1β (-26%) and RANTES (-15.6%) (Table 1 and S1). IrSPI also significantly decreased (P<0.01) several chemokines in mitogen-stimulated splenocytes including IP10 (-46.5%), MIP-1β (-17.9%), RANTES (-37.9%), GM-CSF (-71.9%), and Eotaxin (-21.3%). Moreover, expression of several T helper cytokines was also significantly reduced, namely, IFN-γ (-50.3%), IL-1β (-45%), IL-18 (-46%), IL-13 (-75.1%), IL-6 (-54.8%), TNF-α (-46,1%), and IL-9 (-48.8%) (Tables 1 and S2). By contrast, a single cytokine, IL-2, was significantly up-regulated (+49.2%) following IrSPI exposure.

To address the impact of IrSPI on immune sentinel cells, we also compared T helper secretion of cytokines and chemokines in the supernatants of murine macrophages grown in the presence or absence of IrSPI following activation with IFN-γ and LPS. Secretion of all tested T helper cytokines and chemokines was diminished, but statistical significance was attained only for the decrease in IL-5 (-9.6%; P<0.01) (Table 1 and S3 table).

Table 1: Impact of IrSPI on mice splenocyte cytokine/chemokine production with or without mitogen stimulation by Concanavalin A (ConA).

	Cytokines/ chemokines	Effect of IrSPI (percentage)	P-value
		Splenocytes	
Without ConA	IP-10	Decrease (- 32,8%)	2,21E-03
	MCP-3	Decrease (- 72,3%)	8,07E-04
	MIP-1β	Decrease (- 26 %)	2,11E-03
	RANTES	Decrease (- 15,6 %)	3,94E-03
With ConA	IL-1 β	Decrease (- 45 %)	1,15E-03
	IL-13	Decrease (- 75,1 %)	4,47E-04
	IL-18	Decrease (- 46 %)	1,63E-07
	IL-6	Decrease (- 54,8 %)	5,80E-06
	IL-9	Decrease (- 48,8 %)	7,06E-03
	TNF-α	Decrease (- 46,1 %)	7,23E-06
	IFN-γ	Decrease (- 50,3 %)	2,28E-07
	IP-10	Decrease (- 46,5 %)	4,30E-05
	MIP-1β	Decrease (- 17,6 %)	2,28E-03
	RANTES	Decrease (- 37,9 %)	1,26E-04
	Eotaxin	Decrease (- 21,3 %)	3,89E-03
	GM-CSF	Decrease (- 71,9 %)	8,67E-08
	IL-2	Increase (+ 49,2 %)	5,62E-04
		Macrophages	
With LPS/IFN-γ	IL-5	Decrease (-9,6%)	8,37E-03

* All results are presented as the significance of expression changes (P-value < 0.01; ANOVA) after a 3-day incubation with IrSPI. Splenocytes of each of 3 mice were evaluated separately in triplicate for each condition. Results are expressed as the mean for the 3 mice after calculating the mean of triplicate wells for each mouse.

Taken together, our data suggest that, apart from IL-2, IrSPI repressed secretion of multiple T helper cytokines and chemokines by activated immune cells (splenocytes and macrophages), consistent with a role for IrSPI as an immune modulator of the host response against tick bites.

Discussion

Extensive knowledge is accumulating regarding the capacity of tick saliva from both soft and hard ticks to counteract the host responses and to allow them to accomplish their blood meal successfully [11-13]. Relatively few salivary compounds, however, have been molecularly characterized as the active factors responsible for this process (recently reviewed in [3]). In a previous study, we identified a serine protease inhibitor, named IrSPI, potentially present in *I. ricinus* saliva and demonstrated its implication both in tick feeding and in *Bartonella* infection of *I. ricinus* salivary glands [5]. The presence of homologous/paralogous genes to *IrSPI* in both *I. ricinus* and *I. scapularis* ticks suggests that it belongs to a family of genes that are involved in important functions in tick physiology and that the regulatory role of such SPIs is highly conserved. Here we also provide evidence that IrSPI is a Kunitz SPI that is induced during blood feeding and present in tick saliva. Moreover, we show that IrSPI inhibits elastase and modulates host immune responses. It is likely that such immunomodulation substantially contributes to successful feeding and engorgement of *I. ricinus* ticks, and thereby facilitates transmission of TBP.

Production of functionally active recombinant protein has already been proved to be difficult in some cases. As example, it has been demonstrated that the p36 immunosuppressive salivary gland protein from *Dermacentor andersoni* salivary glands exerted its activity only when the recombinant protein was expressed in insect cells but not in bacteria [14], suggesting that functional activity might depend upon proper post-translational modifications, such as glycosylation. Similarly, Konnai and co-workers have tentatively attributed the lack of histamine binding affinity of lipocalins from *Ixodes persulcatus* to the expression of the recombinant proteins in *E. coli* [15]. In the present study, we therefore expressed IrSPI in Drosophila cells, and showed that the protein was functional, e.g., exerted an immunomodulatory activity, when expressed in this insect cell system. However, circular dichroism analysis of recombinant IrSPI suggested that it lacked important secondary structural features of Kunitz. Nonetheless, when subjected to a refolding step, it displayed an inhibitory activity against elastase.

In accordance with its primary structure, IrSPI belongs to the Kunitz SPI superfamily, whose members competitively inhibit serine protease activity in a reversible lock-and-key fashion. In ticks, certain members of this superfamily have been shown to be involved in subversion of host defence mechanisms during feeding [7]. Invertebrate Kunitz inhibitors possess diverse inhibitory effects on several serine proteases depending on their amino acid composition, especially the P1 residue presents in the reactive site. Positively charged P1 residues, such as Lys or Arg, are associated with inhibition of trypsin-like SP; large hydrophobic residues, such as Phe, Tyr or Leu, with inhibition of chymotrypsin-like SP; and small hydrophobic residues, such as Ala or Val, with inhibition of elastase-like SP [16]. We showed that IrSPI, which harbours Ala as P1 residue, does indeed inhibit elastase. IrSPI also inhibited the activity of chymotrypsin, albeit weakly, in keeping with the partial fit of Ala-bearing SPI within the active site of this protease, but less effectively than SPI bearing large hydrophobic amino acids at the P1 position. Elastase, a serine protease synthesized and released by neutrophil cells after trauma, is responsible for tissue inflammation and remodelling [17]; chymotrypsin also participating in this latter process [18]. Through its inhibitory activity, IrSPI might thus participate in reducing inflammation and tissue repair upon tick bite, as has been suggested for other Kunitz SPI, such as for Tryptogalinin from *Ixodes scapularis*, which also inhibits, among other proteases, elastase [19].

We showed that IrSPI mRNA was expressed in diverse organs from pooled ticks, including SG, guts, ovaries, and synganglions as well as the carcasses in wild pre-fed ticks that harboured, at least for one tick of the pool, two TBP. This wide tissue distribution suggests that IrSPI might be implicated in multiple aspects of tick biology. Expression of IrSPI in pools containing infected ticks is compatible with its induction by TBP, as we previously demonstrated for *B. henselae* [5]. In fact, TBP infection has already been shown to modulate expression of many tick genes, and a number of these, including some encoding Kunitz proteins, have been identified as implicated in TBP transmission [20]. Such molecular interactions reflecting the vector competence of an arthropod [4] may be common but also TBP-specific as we showed for *B. henselae* and *B. birtlesii* regarding IrSPI. A previous RNAi experiment has also shown that IrSPI is potentially involved in bacterial adhesion, invasion and/or multiplication within the tick salivary gland, but also potentially in tick defence mechanism as it may act against other bacteria potentially in competition with *B. henselae* [5]. This latter hypothesis was thus evaluated here regarding *E. coli,* but over expression of *IrSPI* was not observed following tick infection with this not transmitted bacterium.

We next demonstrated that *IrSPI* expression is induced in tick salivary glands by the blood feeding process: in nymphs at the end of the engorgement (day 5) and in females in the middle of the feeding process at day 5 on rabbits and at days 4 and 8 on membrane [5]. Similar blood-meal induction has been also reported for Irsgmg-150466, which likely corresponds to the same gene as it presents,

without the signal peptide, 100% identity at the protein level. Expression of Irsgmg-150466 was high 12 h after the beginning of the engorgement, but then decreased after 24 h and 12 h in salivary glands of *I. ricinus* females and nymphs, respectively [21]. Chmelar and co-workers have also reported the expression of a homologous gene (contig 240) in *I. ricinus* female salivary glands 24 h after tick attachment [22]. This dynamic expression of paralogs of IrSPI was recently reported by Dai et al. in *I. scapularis* [23], lending support to the discontinuous BPTI/Kunitz gene expression by both *I. ricinus* and *I. scapularis* during the ingestion of the blood meal, with both up- and down-regulated transcripts depending on time. Nevertheless, it should be noted that in these studies, appreciation of the level of expression is based on detection of mRNA, which may differ from protein expression, as transcript expression profiles do not necessarily translate into variation in the corresponding protein expression.

Importantly, due to the presence of a signal peptide and expression in salivary glands, IrSPI was predicted to be a secreted protein, potentially present in tick saliva. We have shown that *IrSPI* mRNA is expressed in the type 2 acini that are responsible for saliva secretion, and, using anti-IrSPI antibodies raised in rabbits infested with ticks, that the native IrSPI protein is present in tick saliva and injected into the host during the bite. This demonstration that IrSPI takes part in the molecular dialogue between the tick and its vertebrate host strongly argues in favour of a role for IrSPI in the tick feeding process.

Host skin represents the first obstacle that ticks need to overcome for feeding. Upon tissue damages, cellular components of host skin, including epithelial cells, fibroblasts and endothelial cells, generate biomolecules that facilitate tissue remodelling and wound healing including angiogenesis. As slow-feeding hematophagous arthropods, and in order to remain attached to their host and capable of obtaining blood over several days, ticks have to inhibit these processes. The first study that demonstrated the ability of tick saliva to inhibit angiogenesis was published in 2005 [12]. Since then, a number of tick salivary molecules have been reported to be able to modulate angiogenesis and wound healing. These include certain Kunitz SPI from *Haemaphysalis longicornis* (Haemangin [24]), *R. microplus* (BmTI-A [25] and BmCI [26]) and *Amblyomma cajennense* (Amblyomin-X [27]). Nevertheless, although IrSPI, like BmTI-A and BmCI, acts as an elastase inhibitor, it does not seem to directly perturb neither apoptosis of HsKMEC cells or the angiogenic capacity of HsKMEC and HEPC-CB1 cells. However, it should be noted that this *in vitro* observation might be different in a whole organism, with a possible indirect effect of IrSPI on angiogenesis due to its inhibitory effect on proinflammatory cytokines, which are implicated in this process, as observed in both splenocytes and macrophage cells.

The initial step in tick bites is laceration of host tissue, which releases a large amount of tissue factors that trigger activation of pathways involved in haemostasis, and fibrin clot formation and lysis.

In vertebrate blood coagulation, two different pathways (intrinsic and extrinsic pathways) act in concert to induce formation of thrombin and activate a third pathway (common pathway) required for formation of a fibrin clot and thus prevention of blood leakage after tissue damage. The major pathway of blood coagulation, however, is the tissue factor pathway (extrinsic pathway), which is rapidly activated following damage to blood vessels caused by tick bite. Several tick factors have been described as being able to counteract vertebrate blood haemostasis (reviewed in [3]), most of them corresponding to SPI. In fact, most of the tick SPI injected into the host during blood feeding facilitate completion of the long blood meal by targeting one or more SP involved in blood coagulation pathways, thereby preventing blood clot formation and maintaining blood in a fluid state in the tick bite site [7]. IrSPI, however, did not appear to regulate the extrinsic pathway, as no effect was observed on the thrombin formation time or the fibrin clot formation time. In addition, some tick SPI could also accelerate the lysis of the fibrin clot that is currently forming [7], but IrSPI did not present any activities in that way. Nevertheless, such a result might be expected given that alanine residue at the P1 site of IrSPI – suggested elastase-like targets – and the exclusive presence of trypsin-like serine proteases within the host-blood coagulation cascade [28]. Further investigations would be required to determine whether IrSPI might regulate other processes of blood coagulation, such as platelet aggregation or the intrinsic pathway.

To avoid host rejection, ticks have developed a complex armament to circumvent both innate and adaptive immune responses as well as complement activation [11]. Relatively few tick salivary factors responsible for this immunomodulation have been identified, which have recently been reviewed by Simo et al. [3]. They have been reported to play a role in the activation and/or recruitment of multiple resident and infiltrating cell types at the tick bite site, including macrophages, mast cells, dendritic cells, endothelial cells, keratinocytes and lymphocytes, as well as in the polarization of an initial Th1 helper response towards a Th2 orientation, considered to be more favourable to tick blood feeding [11]. Here we showed that IrSPI inhibits ConA-induced proliferation of murine $CD4^+$ T cells, as has been reported for saliva of not only *I. ricinus* [29], but also several other tick species including *D. andersoni* [30], *A. variegatum* [31] and *I. dammini* [32]. It is noteworthy that in our study IrSPI inhibited secretion of IL-9, which promotes the proliferation of $CD4^+$ rather than $CD8^+$ T cells [33]. Until now, a small number of salivary proteins with immunosuppressive capacity have been characterized, including the most highly investigated protein Salp15 from *I. scapularis* [34], P36 from *D. andersoni* [14] and Iris from *I. ricinus* [35]. It should be noted that in our study the impact of IrSPI was assessed on mouse splenocytes, which comprise, in addition to the high proportion of T cells, multiple other immune cell types such as B cells, macrophages, dendritic cells, eosinophils, basophils, natural killer cells and neutrophils. Thus, an indirect action of IrSPI on T cells via other cells should not be excluded,

as has already suggested for dendritic cells [36]. Indeed, we observed that IrSPI decreased the expression, by splenocytes, of multiple chemokines and cytokines that directly or indirectly stimulate T cell proliferation, including MIP-1β, RANTES and IL-9 [37, 38]. Furthermore, we showed that IrSPI also repressed the expression of IL-13, which is mainly produced by Th2 lymphocytes, and which may regulate proliferation and differentiation of DCs and B cells [39], when in parallel we observed that IrSPI appeared to stimulate B cell proliferation in the absence of mitogen stimulation. Such a result is in accordance with the reported fact that, in cultured murine splenocytes, some neutrophil elastase inhibitors are able to promote B-cell differentiation into IgG and IgA producing cells [40]. This activity may be related to the induction of several B cell genes, including *Aid*, *Baff* and *April*, which play a role in their differentiation and proliferation [41, 42]. In addition, we showed that IrSPI decreased the expression of some neutrophil chemokines, and it is thus plausible that the impact of IrSPI on B cell proliferation was related to its capacity to interact with elastase-like proteases other than elastase at the B cell surface.

At the tick bite site, and in response to tissue damage, numerous cell types (including fibroblasts, endothelial cells, macrophages, DCs, T cells, neutrophils, eosinophils, and resident tissue cells) are able to secrete immunological factors, thereby promoting inflammation, tissue remodelling, wound healing, angiogenesis, and pathogen clearance. To repress immune cell activation and proliferation that, if unchecked, would compromise tick feeding, tick saliva, as a rich source of immune modulators (reviewed in [3]) that act in concert to achieve a stronger effect, hijacks cellular immune responses and notably secretion of cytokines and chemokines, thus affecting the previously mentioned processes. Our results showed that for *I. ricinus,* IrSPI, as part of this salivary cocktail, represents one of the molecules that is likely to contribute to the modification of the cytokine profile as evaluated on both splenocytes and macrophage cell lines.

The effect of tick saliva being able to polarize immune responses towards Th2 rather than Th1 has been reported for several tick species including *I. ricinus* [36, 43, 44]. Our results show that, by repressing the production of IP-10, MCP-3, MIP-1β and RANTES from a large variety of cells (present in splenocytes), IrSPI may be one of the actors acting in Th2 immune polarization by restraining Th1 cytokines. Another elastase inhibitor from *I. ricinus*, Iris, has been shown as promoting Th2 polarization by enhancing Th2 cytokine expression at the tick bite site by increasing IL-10 secretion and repressing IL-6 and IFN-γ [35]. It has been reported that polarization of the immune response toward the Th2 subset is associated with tolerance to tick bites in mice [45], in addition to creation of favourable conditions for the tick-borne bacteria *Borrelia burgdorferi* [46].

This switch toward a Th2 response of lymphocytes promotes an anti-inflammatory answer and an inhibition of pro-inflammatory molecules as already reported with total salivary gland extracts of *I. ricinus* [43]. Among down-regulated molecules by IrSPI, MIP-1β, GM-CSF and RANTES, strongly associated with secretion of IFN-γ , are considered to be proinflammatory chemokines typically expressed in response to infection, promoting recruitment of effector cells to the site of pathogen entry [47]. Our data also showed that IrSPI decreased the expression of IFNγ as has been reported for salivary gland extracts of *I. ricinus* [48]. IFN-γ is principally produced by cytotoxic and Th1 cells, and constitutes one of the major regulators of both innate and adaptive immunity, as well as inflammation. Local tissue inflammation and allergic reactions at the tick bite site are also controlled by IrSPI through the inhibition of eotaxin-1, IL-18, or IL-9. Inhibition of this last cytokine has also been reported for the salivary cysteine protease inhibitor sialostatin L from *I. scapularis*, thus preventing the development of experimental asthma [49].

In addition, and like the dendritic cell modulator Japanin from *Rhipicephalus appendiculatus* [50], IrSPI also repressed the expression of TNFα, which is predominantly produced by both activated macrophages and T lymphocytes in inflammatory and infectious conditions. Although unable to drive the differentiation of naïve $CD4^+$ cells towards a Th2 phenotype in a direct manner, IL-13, also repressed by IrSPI, may affect T cell function indirectly via downregulation of proinflammatory Th1 cytokines, including IL-12, which have been shown to be also repressed by OmC2 from the soft tick *Ornithodoros moubata* [51].

As Japanin [50], IrSPI also decreased IL-1β. In addition to trigger the release of other pro-inflammatory cytokines, this cytokine, which is secreted following injury, activates neutrophil and macrophage phagocytosis and the release of toxic oxygen and nitrogen radicals. As serine proteases from neutrophils and macrophages such as elastase have been reported to process pro- IL-1β into active fragments [52], we thus cannot exclude a role for IrSPI as an indirect inhibitor of IL-1β secretion through inhibition of these molecules. As this cytokine was among the most highly down regulated in the presence of IrSPI, and given the importance of IL-1β in both immune cell recruitment and nociception, its suppression by IrSPI may well participate in avoidance of tick rejection by the host. Besides IL-1β, pain sensation is reinforced by pro nociceptive chemokines and cytokines release at the tick bite site including TNFα, IFN-γ, IL-6, IL-18, MCP-3, RANTES, and MIP-1β [53] that are also repressed by IrSPI. Immune cell recruitment might be also impacted by IrSPI through the modulation of MIP-1β, RANTES, GM-CSF and IP-10 or IL-6 triggering the expression of T cell attractant chemokines and eotaxin-1, TNF-α or IL-13 regulating cell adhesion proteins [54].

As previously mentioned, in order to feed successfully, tick must maintain blood flow, and inhibition of some cytokines/chemokines by IrSPI may also impact this host response in order to antagonize homeostasis and angiogenesis. It includes RANTES that modulates neovascularization and endothelial cell spreading [55], IL-6 through induction of VEGF [56], TNF through induction of *COX 2* [57], and eotaxin-1 through direct chemotaxis of endothelial cells and the formation of blood vessels in vivo [58].

Being co-administered with the pathogens transmitted during the tick bite, the immunosuppressive effect of IrSPI necessarily influences their transmission. Several cytokines/chemokines that were reported here as repressed by IrSPI have effectively been shown to be implicated in pathogen control and clearance, including in the recruitment of effector cells to the site of pathogen entry as for RANTES, MIP-1β and IL-18 [47] as well as IL-9 [59]. While most proinflammatory cytokines and chemokines were significantly inhibited by IrSPI, a single cytokine, IL-2, was up-regulated. This result was somewhat unexpected in the light of published data reporting a decrease in IL-2 expression by tick saliva [11]. Nevertheless, while IL-2 is often considered to be proinflammatory, it can also behave as an anti-inflammatory cytokine by promoting Treg differentiation, long-term survival and suppressive activities [60] thus decreasing local inflammation and promoting tolerance towards pathogen [61].

Together with the results observed for splenocytes, the macrophages response to IrSPI confirms that this salivary molecule is able to down regulate proinflammatory cytokines and the Th1 promoting ones. Such a result has been already reported for saliva of *R. microplus* on bovine macrophages activated by LPS with a decrease of TNF-α, IL-12 and IFN-γ [62]. Here, while a decrease of all tested cytokines was observed, only significant impact on mice macrophages was reported for IL-5 having pro-inflammatory functions, including eosinophil activation, B cell growth and promotion of antibody production. Its pro-inflammatory feature is reinforced through its ability to increase the susceptibility of B and T cells to IL-2, and subsequently the production of cytotoxic T cells. Though this cytokine is considered to be predominantly expressed by $CD4^+$ T cells, recent evidence suggests that macrophages may also be a source of IL-5 [63].

IrSPI is derived from the most important vector in Europe and represents an important component of the tick salivary cocktail that enables the tick to overcome the host immune system and thus to successfully feed and transmit pathogens. While requiring further investigation to understand the molecular processes involved in modulation of the host immune response, this work represents a real advance in the identification of the key molecules in immunomodulation mediated by tick saliva.

Indeed, since host immunity elicited against these kinds of molecules might diminish tick infestation and/or transmission of TBD, IrSPI represents a potential target antigen for anti-tick vaccine development. Anti-tick vaccines hold the promise of affording broad protection against multiple TBD transmitted by the same vector. The utilisation of so-called “exposed” salivary antigens like IrSPI, rather than “concealed” tick antigens to which the host is never naturally exposed, may allow natural boosting of the host response upon exposure to ticks [64]. In addition, immunity against such proteins may block the feeding process prior to pathogen transmission, which typically occurs many hours or even days after tick attachment. However, the fact that IrSPI belongs a protein family with extensive functional redundancy [65], suggests that the vaccinal potential of IrSPI should be evaluated as a component of a multivalent vaccine with cocktails of antigens involved in distinct mechanisms against host defence or targeting epitopes that are common to IrSPI’s protein family.

Material and methods

Ethics

Animal experiments involving rabbits and mice used for tick feeding were approved by the local ethics committee for animal experimentation (ComEth Anses/ENVA/UPEC; Permit Number 2015091413472401). Regarding rabbits used for feeding of pathogen-free ticks, they have subsequently been put up for adoption via the White Rabbit Association, Paris, France.

Ticks

I. ricinus ticks from the field of from a pathogen-free colony were used in this study. Questing ticks (nymphs and adults) were collected by flagging in the Sénart forest, located south-east of Paris (France), as previously described [8]. All pathogen-free *I. ricinus* ticks were derived from a laboratory colony reared at 22°C and in 95% relative humidity with 12 h light/dark cycles as previously described [66].

Cloning and sequencing of IrSPI cDNA

Our previous results generated a total of 24,539 isotigs following NGS sequencing of the *I. ricinus* salivary gland transcriptome [5]. Of these, the coding sequence of IrSPI (GenBank KF531922.2) without the stop codon (282 pb) was amplified with ID23822F (5’-ACATCTACCGTTCAAGATGAAG -3’) and ID23822R (5’-TCTAAGTGCCTTGCAGTAGTC-3’), and was cloned into the pET28 vector following the manufacturer’s instructions (Novagen). After transformation of *E. coli* TOP10 bacteria (ThermoFisher scientific) with the plasmid and kanamycin selection, IrSPI sequence insertion was validated by PCR and sequencing.

Recombinant IrSPI protein production

The open reading frame (ORF) of IrSPI lacking the 5' sequence encoding its signal peptide (MKATLVAICFFAAVSYSMG) was synthetized (Eurofin) as a fusion with the sequence encoding Twin-Strep-Tag (WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK) and enterokinase (DDDDDK). The BglII and EcoRI restriction sites were used for insertion of the sequence in the pMT/BIP/V5-His plasmid (ThermoFisher). The production of recombinant IrSPI protein was performed in the Platform of Recombinant Proteins in Eukaryotic Cells, Pasteur Institute Paris, France. Briefly, drosophila S2 cells (Invitrogen, Carlsbad, CA) adapted to serum free Insect Xpress (Lonza) medium were co-transfected with pMT/BIP/IrSPI and the pCoPURO vector (Addgene) conferring resistance to puromycin, using the cellfectin II transfection reagent (Invitrogen). The upstream pMT/BiP/V5-His *Drosophila* BiP secretion signal allows the recombinant protein to enter the S2 cell secretory pathway for recuperation in culture medium. IrSPI expression was driven by the metallothionein promoter after induction by 5 µM $CaCl_2$. Clarified cell supernatants were concentrated 10-fold using Kicklab tangential flow filtration cassettes (GE Healthcare, cut-off 10 kDa) and adjusted to pH 8.0 in 10 mM Tris before purification in an AKTA Avant system by Steptrap-HP chromatography (GE Healthcare). Final purification was achieved by gel filtration using a Superdex 75 HiLoad 16/60 column (GE Healthcare) equilibrated in PBS-X (without Ca^{2+} and Mg^{2+}). Protein quantity was estimated by peak integration.

IrSPI refolding

Eight µg of IrSPI were refolded for 30 minutes at 25°C in a final volume of 100µl containing 10µg of the disulfide isomerase protein (sigma-Aldrich) with reduced / oxidized glutathione (Sigma-Aldrich) (2mM / 0.2mM) in borate buffer (100 mM Borate, 150 mM NaCl, pH 7.4).

Circular dichroism

Circular dichroism experiments were performed in the far-UV region using an Aviv CD spectrometer model 215 equipped with a water-cooled Peltier unit. A 200µl volume of recombinant IrSPI at 0.075µg/µl was used to record spectra in a cell of measure width of 1-mm path length in far-UV (between 190 to 270 nm) at 25°C. IrSPI and its cognate buffer were screened ten times successively to produce an averaged spectrum. The spectra were corrected using buffer baselines measured under the same conditions. Data were normalized to residue molar absorption measured in mdeg (M^{-1} cm^{-1}) and expressed as delta epsilon ($\Delta\varepsilon$) allowing BestSel website algorithm treatment for secondary structure predictions [67].

Sedimentation Velocity (SV) and Analytical Ultracentrifugation (AUC)

The oligomerization state of IrSPI was determined in a sedimentation velocity experiment in a ProteomeLab XL-I analytical ultracentrifuge (Beckman-Coulter, USA). Briefly, after loading IrSPI at 0.075 $mg.ml^{-1}$ in a 1.2 cm epoxy double sector cell, cell assembly was equilibrated for 1h30 at 20.0°C in a four-hole AN60-Ti rotor. The sample was spun at 42,000 r.p.m for 10h and 400 scans for both Rayleigh interference and absorbance at 280 nm were recorded. Absorbance data were collected at a constant radial step size of 0.001 cm. Partial specific volume of 0.70 and the extinction coefficient ε at 280 nm of 14350 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ were theoretically calculated at 20 °C from the IrSPI amino acid sequence using Sednterp software (Spin Analytical, USA). The PBS (-Ca^{2+} and -Mg^{2+}) density ρ and viscosity η of 1.0053 $g.mL^{-1}$ and 1.018 cP, respectively, were also determined with Sednterp at 20°C. The sedimentation profile of IrSPI was analyzed in SEDFIT using the continuous size distribution c(s) model [68].

MALDI-TOF/TOF analysis

The purity and integrity of the recombinant IrSPI protein were confirmed using a Bruker UltrafeXtreme MALDI-TOF/TOF instrument (Bruker-Daltonics, Germany). Briefly, 1 µL of protein at 0.075 mg/mL was deposited on a MTP 384 ground steel target plate with 1 µL of 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB) in 50% acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid as matrix solution. Data were acquired using Flexcontrol software (Bruker-Daltonics, Germany) and shots were recorded in positive ion linear mode. Mass spectra were externally calibrated in the m/z range of 5-20 kDa with a protein calibration standard (Bruker-Daltonics, Germany) and analysed with the Flexanalysis software (Bruker).

Serine protease inhibition assays

Serine protease inhibition assays were performed by using the ELISA plate reader Multiskan GO (Thermo Scientific) that is able to maintain the temperature at 37°C. Serine proteases and their corresponding substrates (in brackets) were purchased from Sigma Aldrich and used with the following concentrations: 24.6nM Trypsin-T1426 (N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilide hydrochloride), 46.5 nM chymotrypsin-C3142 (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide), 21.6 nM Elastase-45125 (N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide), 43nM Thrombin-T6884 (Sar-Pro-Arg-p-nitroanilide dihydrochloride) and 33nM Kallikrein-K3627 (N-Benzoyl-Pro-Phe-Arg-p-nitroanilide hydrochloride). Reactions were performed in Tris-HCl 20 mM, 150mM Nacl, 0.1% BSA pH 7.4 buffer (except for thrombin inhibition, pH 6.5), with a final substrate concentration of 0.2 mM. All reactions were performed with both non-refolded and refolded recombinant IrSPI, the refolding buffer being used as a negative control for this latter condition. After initial incubation of serine protease with or without recombinant protein for 15 min at 37°C, the OD was recorded at 405 nm for 30 minutes (every 10s) at the same temperature. OD

data were then analyzed with Graphpad Prism, where linear coefficients were compared after linear regression computation. Results were expressed as the difference between positive controls (without IrSPI) and reactions in the presence of IrSPI after subtraction of results obtained for the refolding buffer for the refolded IrSPI.

Ticks infected with tick-borne pathogens

B. birtlesii-infected nymphs pre-fed for 3 days on mice were obtained from moulted larvae infected on mice that received injection of an *in vitro* culture of *B. birtlesii* (IBS325^T) as previously described [69]. *B. henselae*-infected females pre-fed for 4 days were obtained with the previously described membrane feeding system and following the same protocol [5]. *B. henselae* and *B. birtlesii* infection in ticks was confirmed by RT-PCR using primers described by Reis and co-workers [69].

Tick infection with Escherichia coli

E. coli (CIP7624 strain, Pasteur Institute, Paris) was cultivated at 37°C under atmospheric conditions for one night on Luria Bertani (LB)-agar plates and then for 24h in liquid LB medium. The bacterial concentration was then evaluated by spectrophotometry at 600 nm (OD at 1 represents 2.2 × 10^9 CFU/ml). Three pathogen free *I. ricinus* females were nano-injected with 250 µl (1 × 10^7 CFU) of bacterial suspension into the body cavity using a glass microcapillary attached to a nanoinjector pump (Drummond) driven by Micro 4 controller (World Precise Instruments). Three other females injected with 250 µl of PBS and 3 uninjected ticks were used as controls. *E. coli* infection was confirmed by qPCR with primers targeting *WecA* gene [70].

Tick saliva and tick organ collection

For saliva collection, 34 female *I. ricinus* from the field were pre-fed for 5 days on a rabbit as previously described [71]. After detachment, ticks were then fixedly installed on microscopy slides with the hypostome positioned in sterile 10 µl tips. After application of 5 µl of 5% pilocarpine in methanol to the tick dorsum, ticks were positioned upside down to facilitate collection of saliva and placed in dark, humid chambers as described by Patton et al. [72]. After about 5h, a pool of approximately 50 µl of saliva was obtained (average of 1.5 µl per tick) and stored at -80°C until used.

After saliva collection, salivary gland extracts were prepared. Salivary glands were collected from 17 ticks by dissection under a magnifying glass. Glands were pooled and immediately rinsed 3 times in cold-PBS (137 mM NaCl, 1.45 mM $NaH_2PO_4.H_2O$, 20.5 mM Na_2HPO_4, pH 7.2). They were then

sonicated (Bandelin HD 2070, equipped with the MS 72 probe) 3 times for 15 seconds in 1.5 ml of PBS, at 37% of power on ice, before concentration to a final volume of 100 µl by using Amicon Ultra filters (cut-off at 3KDa) and stored at -80°C until used in western blot. The remaining 17 ticks were then dissected under a magnifying glass and salivary glands, midgut, ovaries, synganglion and the rest of tick body, named carcasses, were extracted from the tick body, rinsed 3 times in cold-PBS, pooled by organ and stored at -80°C until RNA extraction.

Total RNA extraction

To follow gene expression, RNA extraction was performed on eggs, whole unfed larvae, nymphs, males and females, and fed nymphs from the tick colony, and on tick organs from pre-fed field females using the Nucleo Spin RNA (Macherey-Nagel) kit according to the manufacturer's instructions. Tissue homogenization was first achieved with Precellys24 (Bertin instruments) in a lysis buffer containing β-mercaptoethanol by using silicate beads for organs and metal beads for whole ticks and eggs. RNAs were eluted in 30 µl of RNAse free water and RNA concentration was determined by measuring absorbance at 260 nm using a Nanodrop one (Thermo fisher Scientific).

Quantitative RT-PCR

To evaluate the expression of *IrSPI* in the different tick life stages, RNA samples from one egg deposition, 120 unfed larvae, 20 unfed nymphs, 5 unfed males and 5 unfed females from the tick colony were used. The temporal expression profile of *IrSPI* during feeding was evaluated in RNA samples from 20 unfed, 20 3-day and 20 5-day fed nymphs from the colony after feeding on rabbits as previously described [71]. To evaluate the expression of *IrSPI* in different tick organs, pools of RNA samples from salivary glands, midgut, synganglion, ovaries, and carcasses of 17 females from the field that were pre-fed for 5 days on rabbits were used. Finally, the impact of tick infection with microorganisms was evaluated for both transmitted and untransmitted bacteria. For *B. birtlesii,* pools of salivary glands, guts and ovaries from 8 infected nymphs pre-fed for 3 days were used, while the same organs from 4 uninfected ticks were used as control. For *B. henselae*, pools from 13 salivary glands, 14 guts and 16 ovaries from infected females and non-infected controls pre-fed for 4 days were used. Finally, pools of RNA samples from 3 females from the colony infected with *E. coli* were analysed, with 3 PBS-injected ticks or 3 uninjected ticks as controls.

Reverse transcription was performed with SuperScript III (Invitrogen) with 100 to 400 ng of RNA per reaction. First strand cDNA synthesis was performed by using 2.5 µM Oligo dT primers in a total volume of 20 µl at 65°C for 5 min, 4°C for 3 min, 50°C for 50 min, and 70°C for 15 min. Following

RNase H treatment (Invitrogen) at 37°C for 20 minutes, expression of *IrSPI, WecA (E. coli), defensin 6* and *rps4* (a tick housekeeping gene) was evaluated by qPCR using the LightCycler 480 System (Roche). The SyBr green Master mix (Roche) added to 2 µl of cDNA, contained 6 µl of SyBr green vial 2, and 0.5 µM of forward and reverse primers in a total volume of 12 µl. Primers used for detection of *IrSPI* transcripts were previously described [5] while, for *defensin-6,* primers were designed according to the sequence published by Tonk et al [9]: (F: 5'-TCGTCGTGATGATTGCGGGT-3' and R: 5'-TCGTCGTGATGATTGCGGGT-3'). The following qPCR cycles conditions were used: 95°C 5 min; 95°C 10 s, 60°C 15 s, 72°C 15 s, 45 cycles. Each sample was amplified in triplicate and results were analysed by Roche LightCycler 480 Software V1.5.0. Relative quantification of gene expression was calculated using the comparative Cp method [73]. Cp for *IrSPI* were then normalized using the *I. ricinus rps4* gene [74] and expressed as fold change after ΔΔCp analysis. Analysis of *IrSPI* expression in wild female organs was performed by using a plasmid containing *IrSPI* cDNA as a positive control, and *IrSPI* quantity was expressed as copy number of *IrSPI* cDNA.

In situ hybridization

In situ hybridization was performed as previously described [75]. Briefly, a 183-nucleotide long single-stranded DNA probe containing digoxygenin dNTP was prepared by using asymmetric PCR (Roche Molecular Biochemicals) and the following primers: 5'- TGACTGAGACACAATGCAGA -3' (forward) and 5'- TTCCGTACGGACATTCCCGC -3' (reverse). The salivary glands from partially fed pathogen-free *I. ricinus* females engorged for 8 days by means of a membrane feeding system [66] were dissected in ice-cold PBS and subsequently fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich P6148) for 2 hours at RT. After three washes in PBST (PBS + 0.2% Triton), the tissues were treated with 25 µg/ml proteinase K for 10 minutes at RT. The reaction was stopped by adding PBST-glycine (0.2% of triton and 2 mg/ml glycine) for 5 minutes. Samples were re-fixed in 4% paraformaldehyde at RT and washed in PBST three times for 5 minutes. Hybridization was performed with either sense or antisense probe diluted ten times in hybridization solution (HS; 50% formamide, 5x SSC, 50 g/ml heparin, 0.1% Tween 20, and 100 g/ml salmon sperm DNA). The samples were then incubated in HS containing the representative probe for 30 hours at 48°C in a humidified chamber. After hybridization, tissues were washed sequentially in HS (12 hours, 48°C), HS-PBST (1:1; 5 min, RT) and PBST (5 min, RT). After blocking in 1% BSA in PBST for 20–30 min at RT, the tissues were immediately incubated with sheep anti-digoxigenin-AP (alkaline phosphatase; Roche Diagnostick, Germany) at a dilution of 1:1000 in PBST overnight at 4°C. Tissues were washed three times with PBST. Color reaction was developed by incubation with staining solution made from NBT/BCIP Ready-to-Use Tablets (Roche) according to the manufacturer's protocol. The salivary glands were mounted in glycerol and examined under an optical

microscope (Olympus BX53). Digital captured images were assembled and enhanced in Adobe Photoshop CS4.

Anti-IrSPI serum production

Anti IrSPI sera were produced against both the endogenous protein following tick bites in rabbits and the recombinant protein in mice. Two hundred nymphs and around 2000 larvae from our *I. ricinus* colony were fed on New Zealand white rabbits (Charles River) until feeding completion (7 days) as previously described [71]. At day 17 post-infestation, the rabbit was sacrificed and blood recovered by cardiac puncture. Five BALB/c mice were used to produce antibodies against IrSPI over a 90-day protocol. Three subcutaneous vaccinations (Days 0, 14 and 28) were performed within 10 µg of recombinant IrSPI. Blood samples were collected retro-orbitaly 0, 14, 28, 42, and 56 days after the primo-injection and through final cardiac puncture at day 90. Both blood from mice and rabbit were stored at RT for 2 hours before two steps of centrifugation at 6500g for 5 min to obtain clear serum that was stored at -20°C until used. Immunogenicity of the recombinant protein and affinity of the antibodies produced in mice against IrSPI were confirmed through ELISA experiments.

Western blot analysis

Ten µl of both saliva and salivary gland extract, as well as 1.5 µg of recombinant IrSPI protein as positive control, were analyzed on 4-15% acrylamide gel under reducing conditions (Mini protean TGX stain free gels, Bio-Rad) and UV detection (ChemiDoc, Bio-Rad), or following immunoblotting with sera from mice and rabbit after IrSPI immunization or tick infestation, respectively. Transfer to the nitrocellulose membrane was performed using the transblot turbo (Bio-Rad) followed by saturation in TBS-5% milk for 1h at RT and incubation for 1h at RT with the primary antibodies in TBS-5% milk (1/1000 dilution for mice immune serum and 1/100 for rabbit serum). After 3 washes in TBS-5% milk, antibody binding was detected with the BCIP/NBT Color development system (Roche), using either anti-mouse or anti-rabbit alkaline phosphatase conjugated antibodies (A3562 or A3687, respectively; Sigma-Aldrich) diluted 1:7500 in TBS-5%. Results were analyzed with the ChemiDoc instrument (Bio-Rad) and with the furnished software ImageLab 1.5 (Bio-Rad).

Thrombin generation, clot waveform, and fibrinolysis assays

Thrombin generation assay (TGA) was adapted from the calibrated automated thrombogram (CAT) as described by Jourdi et al. [76]. Briefly, 80 µl calibrated Poor Platelet Plasma (PPP, Cryopep, Montpellier, France) containing or not 0.8 µM of refolded IrSPI, and 20 µl PPP-Reagent (Stago, Asnière sur Seine, France) were dispensed in a well of a flat bottom microtiter plate. Thrombin generation was

initiated after 5 min preheating at 37°C by automated injection of 20 µL of a mixture of substrate solution and calcium (FluCa, Stago). Progress of Z-Gly-Gly-Arg-7-amino-4-methylcoumarin hydrolysis was recorded every 10 seconds in a thermostated Tecan Infinite M200 Pro (excitation 340 nm, emission 440 nm, Z-position 20000 µm). Fluorescence measurements were analysed using GraphPad Prism software (San Diego, CA, U.S.A.). Lag time, time to peak (TTP), maximum amount of thrombin formed (peak height) and endogenous thrombin potential (ETP) were computed using the area under curve method. Clot waveform assay was simultaneously performed by taking advantage of the capacity of the Tecan reader to record fluorescence and A_{405} simultaneously as described by Jourdi et al. [77]. Data were analysed using GraphPad Prism software to estimate the lag time of clot formation defined as the time needed to reach 15% of the maximum turbidity. Fibrinolysis was measured by the clot waveform assay except that 6 nM of tissue Plasminogen Activator (tPA, Actilyse, Boehringer Ingelheim, Germany) was added to the PPP prior to triggering clot formation. Time to half-lysis was defined as the time needed to halve the maximum turbidity. Obtained results were then compared between positive controls, negative controls (refolding buffer) and samples treated with IrSPI.

IrSPI impact on apoptosis of endothelial cells

The mature endothelial cell line, HsKMEC, derived from the human skin microvascular [78], was cultivated in 24-well plates in complete OptiMEM® medium (OptiMEM® with 2% FBS, 0.5 µg/mL fungizone and 40 µg/mL gentamicin, Gibco). After 24 hours, medium was replaced by 1µM of recombinant IrSPI that had been refolded or not or by their cognate controls, that is, refolding buffer or complete OptiMEM® medium, respectively. Cells were then incubated for 40h at 37°C. At 24h, staurosporin (1µM) was added to the corresponding wells as a positive control for apoptosis. Cells were detached by trypsinization, washed, labelled with Annexin-V-FITC and propidium iodide according to the manufacturer's instructions (FITC Annexin V kit and Dead Cell Apoptosis Kit, Invitrogen), and analyzed by cytofluorimetry by using the LSR Fortessa X20 instrument (Becton Dickinson).

Impact of IrSPI on Host Angiogenesis

Potential cytotoxicity of IrSPI was first evaluated on HSkMEC cells. After 24h of culture in 96-well plates in complete OptiMEM® medium, the medium was replaced by refolded or untreated IrSPI at 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 or 0.0625 µM, or by the corresponding controls; namely, refolding buffer or complete OptiMEM® medium. After 48h of culture, each supernatant was removed and replaced by a solution of Alamar Blue™ (100 µl, at 1/22 dilution in OptiMEM® medium, Invitrogen). Cell toxicity was

assessed after 3h of incubation by measuring fluorescence intensity using the Victor 3V spectrofluorometric multiwell plate reader (Perkin Elmer; excitation at 560 nm; emission at 605 nm). The ability of IrSPI, refolded or not, to modulate host angiogenesis was then evaluated on two human endothelial cell lines, HsKMEC and HEPC-CB1, a human progenitor endothelial cell line [79]. Fifty µl of Matrigel™ (½ dilution in OptiMEM® medium) were dispensed into 96-well microplates and incubated for 30 min at 37°C to allow Matrigel™ polymerization. Cells (1.5×10^5 cells/ml) were resuspended in 100 µl of OptiMEM® containing either 1 or 0.5 µM of the recombinant protein, refolded or not, or, as controls, the refolding buffer or culture medium, and were then seeded in wells containing the Matrigel™ matrix. Plates were incubated in a videomicroscope chamber at 37°C under 5% of CO_2. Pseudo vessel formation was visualized for 9h30 with an inverted microscope equipped with a CCD camera (Axio Observer Z1, Zeiss, Le Pecq, France), with acquisitions each 30 min *via* the Zen software (Zeiss). Angiogenesis was quantified by the determination of several parameters (number of segments and their length, number of meshes, and number junction) with the ImageJ software (with Angiogenesis Analyzer) [80].

Splenocyte proliferation assay

Spleens of three OF1 mice (8 weeks of age) were gently crushed in individual cell strainers (100 µm). After 2 washes in complete medium (RPMI 1640 (Gibco) with 5% sodium pyruvate, 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen), 1% 200 mM L-glutamine (Gibco) and 10% heat-inactivated FCS (Invitrogen)), cells were centrifuged for 5 min at 1400 rpm and incubated at 37°C for 2 min in sterile RBC lysis solution (Invitrogen). Lysis was arrested by adding 30 ml of PBS, and cells were pelleted and resuspended in 2 ml complete medium. Cells were then labelled with CFSE (10 µM) (Molecular Probes) for 5 minutes at RT in the dark, and quenched by adding 5 volumes of cold complete medium. CFSE-labelled cells were maintained on ice for 5 min and then washed twice in complete medium. The proliferation of mitogen-stimulated and unstimulated cells was then measured in the presence or absence of IrSPI, in triplicate wells for each condition. For each mouse, CFSE-labelled cells (5×10^5 per well in 50 µl) were dispensed in 96-well U-bottomed plates. Recombinant IrSPI (2 µg per well in 50 µl complete medium) or just medium was added and cells were incubated at 37°C in 5% CO_2 for 2 hours. Concanavalin A (ConA) (2 µg/ml in 100 µl of complete medium containing 0.1 mM ß-mercaptoethanol) or, for unstimulated cells, just medium, was then added. Single wells containing CFSE-labelled and unlabelled cells were included for isotype controls and for spectral compensation for CFSE and the viability label. After 3 days of culture (37°C in 5% CO_2), supernatants (150 µl/ well) were collected and stored at -80°C for subsequent analysis of cytokine expression and cells were harvested for phenotypic labelling and flow cytometry.

For phenotypic labelling, all antibodies were purchased from eBiosciences and diluted in PBS containing 0.5% bovine serum albumin and 2 mM EDTA (PBS–BSA–EDTA). To block Fc receptors, cells were resuspended in 50 µl of anti-mouse-CD16/32 (0.5 µg/well) and incubated for 15 min at 4°C. Cells were then resuspended in a cocktail of PE-anti-CD4 and APC-anti-CD8 (both at 0.125 µg/well) and eFluor 450-anti-CD19 and APC-eFluor 780-anti-CD3e (both at 0.5 µg/well). For isotypic controls, the same concentration of the cognate isotypic antibodies was used. After 30 min, cells were washed and labelled for 30 min with a viability marker (LIVE⁄DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, Molecular Probes) according to the manufacturer's recommendations. Cells were washed and fixed with 150 µl of 1% paraformaldehyde in PBS. Flow cytometry was performed using the FACSCanto II cytometer (BD Biosciences). Data were acquired and analysed with FACSDiva (BD Biosciences) and FlowJo software (Tree Star), respectively. Live cells, distinguished by referring to dot plots of Aqua staining versus side scatter, were gated as B or T lymphocytes on the basis of CD19 or CD3e staining, respectively, and T cells were further distinguished for CD4 or CD8 expression. The CFSE staining of each subset was then examined.

Macrophage stimulation assay

Macrophages were isolated from bone marrow of three 20-week-old BALB/cJRj mice. Mice were sacrificed by cervical dislocation and femurs and tibias were harvested and kept on ice in PBS-A (without Mg^{2+} and Ca^{2+}). Bone marrow was flushed out from cleaned bones without muscle with cold PBS-A using a 10 ml syringe and 25-gauge needle into a sterile 50 ml conical tube placed on ice. Bone marrow cells were centrifuged for 10 min at 4°C and 300g speed, the pellet was resuspended in 500 µl of ice-cold PBS-A. Five ml of Gey buffer were added drop by drop to the cell suspension to lyse contaminating red blood cells. After 10 minutes of incubation at 4°C, volume was completed to 50 ml with cold PBS-A and cell suspension centrifuged for 10 minutes at 4°C and 300g speed. Cell pellet was carefully resuspended in 1 ml of complete medium to dissociate aggregates. Cell suspension was diluted in complete medium before cell counting in Malassez cells. Suspensions of 1.5×10^6 cells/ml were cultivated at 37°C with 7.5% of CO_2 in petri dishes (Petri Greiner ref: 664161) using complete DMEM medium (Pan DMEM (Biotech P04-03588) with 15% FCS and 4.5 g/l glucose, 50µg/ml penicillin and streptomycin, 10 mM HEPES, 50 µM β–ME) supplemented with 50 ng/ml M-CSF-1 (rm M-CSF-1, ref 12343115, ImmunoTools). Fresh medium was added after three days of culture. At day 6, supernatants were transferred into Falcon tubes and adherent macrophages were harvested by gentle flushing following a 30 min incubation at 37°C in PBS-A containing 25 mM EDTA. Individual cell suspensions (1 for each of 3 mice) were then transferred to 12-well plates by using 10 ml of PBS-A at 2×10^6 cells/wells. Four culture conditions were tested for 24h in complete medium: with or without

IrSPI (10 µg/ml), and with or without stimulation (0.5 µg/ml LPS and 100 U/ml IFN-γ). Respective controls were complete medium or complete medium with stimulation cocktail.

Cytokine profile analysis

The impact of IrSPI on cytokine production was evaluated on splenocytes (both ConA stimulated and not) and on macrophages activated by LPS and IFN-γ by using the Luminex Procarta PPX-01-S26088EX kit (Invitrogen) targeting mouse Th1 (IL-2, IL-1β, IFN-γ, TNF-α, IL-12p70, IL-18), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-9), Th17 (IL-17, IL-23, IL-27), and Th22 (IL-22) cytokines, chemokines (Eotaxin, Groα-KC, IP-10, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2, MCP-1, MCP-3, RANTES), and one colony-stimulating factor (GM-CSF), according to the manufacturers' instructions. Supernatant (50 µl) from splenocytes cultured under mitogen stimulation or not and with or without IrSPI, and 100 µl of supernatant from activated macrophages cultivated with or without IrSPI, as described above, were used. Each supernatant was incubated for 1h30 with magnetic beads displaying antibodies directed against the targeted cytokines. The beads with immobilized cytokines were then incubated successively with biotinylated anti-cytokine antibodies and streptavidin-PE and analysed by using the Luminex^{TM} 200 system (Bio-Rad).

Statistical analysis

Graphpad prism version 7.8 (San Diego, California) was used to perform student's t-test to evaluate significance of IrSPI expression, angiogenesis parameters, as well as the difference in splenocyte proliferation in response to IrSPI exposure. The P-value < 0.05 was used as a threshold to establish level of significance labelled with (*) whereas more significant results with P-value < 0.01 were indicated with (**).

Cytokine/chemokine expression analysis by Luminex was performed for each of 3 mice in triplicate and in duplicate for splenocytes and macrophages, respectively. ANOVA analysis was used in order to evaluate the variability between triplicates or duplicates and between mice for each measured molecule, with and without stimulation. The variable "presence or absence of IrSPI" and the variable mouse were used as fixed and random effect, respectively. The influence of the protein on the variable "cell response" was expressed as P values (P<0.01).

Software

NetNGlyc 1.0 and NetPhos 3.1 servers (DTU Bioinformatics) and Phyre 2 software [81] were used in order to predict post-translational modifications and secondary structures of IrSPI, respectively.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Robert Menard for his precious help for editing this paper. We thank Martine Cote, Evelyne Le-Naour and Lisa Fourniol for tick collection, tick rearing and technical assistance. We also thank P@CYFIC platform from CBM (Orleans, France) for video-microscopy of angiogenesis experiments and Dr Claudine Kieda for the establishment of the human endothelial cell lines. We are very grateful to Anthony Relmy and Sandra Blaise-Boisseau for technical help and advices in cytokine evaluation by Luminex technology. We also thank Sara Moutailler for technical advices in qPCR experiments and Bruno Baron from the Plateforme de Biophysique moléculaire (Institut Pasteur) for help with CD experiments and data analysis. We also thank the "*Tiques et Maladies à Tiques*" group (*REID-Réseau Ecologie des Interactions Durables*) for stimulating discussion.

References

1. de la Fuente J, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. Front Biosci. 2008;13:6938-46. Epub 2008/05/30. PubMed PMID: 18508706.
2. Rizzoli A, Silaghi C, Obiegala A, Rudolf I, Hubalek Z, Foldvari G, et al. Ixodes ricinus and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. Front Public Health. 2014;2:251. doi: 10.3389/fpubh.2014.00251. PubMed PMID: 25520947; PubMed Central PMCID: PMCPMC4248671.
3. Simo L, Kazimirova M, Richardson J, Bonnet SI. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:281. Epub 2017/07/12. doi: 10.3389/fcimb.2017.00281. PubMed PMID: 28690983; PubMed Central PMCID: PMCPMC5479950.
4. de la Fuente J, Antunes S, Bonnet S, Cabezas-Cruz A, Domingos AG, Estrada-Pena A, et al. Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:114. doi: 10.3389/fcimb.2017.00114. PubMed PMID: 28439499; PubMed Central PMCID: PMCPMC5383669.
5. Liu XY, de la Fuente J, Cote M, Galindo RC, Moutailler S, Vayssier-Taussat M, et al. IrSPI, a tick serine protease inhibitor involved in tick feeding and Bartonella henselae infection. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(7):e2993. Epub 2014/07/25. doi: 10.1371/journal.pntd.0002993. PubMed PMID: 25057911; PubMed Central PMCID: PMCPMC4109860.
6. Cotte V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, Boulouis HJ, et al. Transmission of Bartonella henselae by Ixodes ricinus. Emerg Infect Dis. 2008;14(7):1074-80. doi: 10.3201/eid1407.071110. PubMed PMID: 18598628; PubMed Central PMCID: PMCPMC2600320.
7. Blisnick AA, Foulon T, Bonnet SI. Serine Protease Inhibitors in Ticks: An Overview of Their Role in Tick Biology and Tick-Borne Pathogen Transmission. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:199. Epub 2017/06/08. doi: 10.3389/fcimb.2017.00199. PubMed PMID: 28589099; PubMed Central PMCID: PMCPMC5438962.
8. Paul RE, Cote M, Le Naour E, Bonnet SI. Environmental factors influencing tick densities over seven years in a French suburban forest. Parasit Vectors. 2016;9(1):309. Epub 2016/05/29. doi: 10.1186/s13071-016-1591-5. PubMed PMID: 27234215; PubMed Central PMCID: PMCPMC4884405.
9. Tonk M, Cabezas-Cruz A, Valdes JJ, Rego RO, Grubhoffer L, Estrada-Pena A, et al. Ixodes ricinus defensins attack distantly-related pathogens. Dev Comp Immunol. 2015;53(2):358-65. Epub 2015/08/10. doi: 10.1016/j.dci.2015.08.001. PubMed PMID: 26255244.
10. Simo L, Zitnan D, Park Y. Neural control of salivary glands in ixodid ticks. J Insect Physiol. 2012;58(4):459-66. Epub 2011/11/29. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.11.006. PubMed PMID: 22119563; PubMed Central PMCID: PMCPMC3295888.
11. Kotal J, Langhansova H, Lieskovska J, Andersen JF, Francischetti IM, Chavakis T, et al. Modulation of host immunity by tick saliva. J Proteomics. 2015;128:58-68. Epub 2015/07/21. doi: 10.1016/j.jprot.2015.07.005. PubMed PMID: 26189360; PubMed Central PMCID: PMCPMC4619117.
12. Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. Thromb Haemost. 2005;94(1):167-74. Epub 2005/08/23. doi: 10.1160/TH04-09-0566. PubMed PMID: 16113800; PubMed Central PMCID: PMCPMC2893037.
13. Mans BJ, Louw AI, Neitz AW. Evolution of hematophagy in ticks: common origins for blood coagulation and platelet aggregation inhibitors from soft ticks of the genus Ornithodoros. Mol Biol Evol. 2002;19(10):1695-705. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003992. PubMed PMID: 12270896.
14. Alarcon-Chaidez FJ, Muller-Doblies UU, Wikel S. Characterization of a recombinant immunomodulatory protein from the salivary glands of Dermacentor andersoni. Parasite Immunol. 2003;25(2):69-77. PubMed PMID: 12791102.

15. Konnai S, Nishikado H, Yamada S, Imamura S, Ito T, Onuma M, et al. Molecular identification and expression analysis of lipocalins from blood feeding taiga tick, Ixodes persulcatus Schulze. Exp Parasitol. 2011;127(2):467-74. doi: 10.1016/j.exppara.2010.10.002. PubMed PMID: 21036169.
16. Garcia-Fernandez R, Perbandt M, Rehders D, Ziegelmuller P, Piganeau N, Hahn U, et al. Three-dimensional Structure of a Kunitz-type Inhibitor in Complex with an Elastase-like Enzyme. J Biol Chem. 2015;290(22):14154-65. doi: 10.1074/jbc.M115.647586. PubMed PMID: 25878249; PubMed Central PMCID: PMCPMC4447985.
17. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013;2(7):379-88. doi: 10.1089/wound.2012.0383. PubMed PMID: 24527354; PubMed Central PMCID: PMCPMC3763227.
18. Shah D, Mital K. The Role of Trypsin:Chymotrypsin in Tissue Repair. Adv Ther. 2018;35(1):31-42. doi: 10.1007/s12325-017-0648-y. PubMed PMID: 29209994; PubMed Central PMCID: PMCPMC5778189.
19. Valdes JJ, Schwarz A, Cabeza de Vaca I, Calvo E, Pedra JH, Guallar V, et al. Tryptogalinin is a tick Kunitz serine protease inhibitor with a unique intrinsic disorder. PLoS One. 2013;8(5):e62562. Epub 2013/05/10. doi: 10.1371/journal.pone.0062562. PubMed PMID: 23658744; PubMed Central PMCID: PMCPMC3643938.
20. Liu XY, Bonnet SI. Hard tick factors implicated in pathogen transmission. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(1):e2566. doi: 10.1371/journal.pntd.0002566. PubMed PMID: 24498444; PubMed Central PMCID: PMCPMC3907338.
21. Kotsyfakis M, Schwarz A, Erhart J, Ribeiro JM. Tissue- and time-dependent transcription in Ixodes ricinus salivary glands and midguts when blood feeding on the vertebrate host. Sci Rep. 2015;5:9103. Epub 2015/03/15. doi: 10.1038/srep09103. PubMed PMID: 25765539; PubMed Central PMCID: PMCPMC4357865.
22. Chmelar J, Anderson JM, Mu J, Jochim RC, Valenzuela JG, Kopecky J. Insight into the sialome of the castor bean tick, Ixodes ricinus. BMC Genomics. 2008;9:233. Epub 2008/05/21. doi: 10.1186/1471-2164-9-233. PubMed PMID: 18489795; PubMed Central PMCID: PMCPMC2410133.
23. Dai SX, Zhang AD, Huang JF. Evolution, expansion and expression of the Kunitz/BPTI gene family associated with long-term blood feeding in Ixodes Scapularis. BMC Evol Biol. 2012;12:4. Epub 2012/01/17. doi: 10.1186/1471-2148-12-4. PubMed PMID: 22244187; PubMed Central PMCID: PMCPMC3273431.
24. Islam MK, Tsuji N, Miyoshi T, Alim MA, Huang X, Hatta T, et al. The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick blood-feeding success. PLoS Pathog. 2009;5(7):e1000497. Epub 2009/07/14. doi: 10.1371/journal.ppat.1000497. PubMed PMID: 19593376; PubMed Central PMCID: PMCPMC2701603.
25. Soares TS, Oliveira F, Torquato RJ, Sasaki SD, Araujo MS, Paschoalin T, et al. BmTI-A, a Kunitz type inhibitor from Rhipicephalus microplus able to interfere in vessel formation. Vet Parasitol. 2016;219:44-52. Epub 2016/02/28. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.01.021. PubMed PMID: 26921038.
26. Lima CA, Torquato RJ, Sasaki SD, Justo GZ, Tanaka AS. Biochemical characterization of a Kunitz type inhibitor similar to dendrotoxins produced by Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) hemocytes. Vet Parasitol. 2010;167(2-4):279-87. Epub 2009/10/16. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.030. PubMed PMID: 19828254.
27. Drewes CC, Dias RY, Hebeda CB, Simons SM, Barreto SA, Ferreira JM, Jr., et al. Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. Toxicon. 2012;60(3):333-40. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.04.349. PubMed PMID: 22575283.
28. Davie EW, Fujikawa K, Kurachi K, Kisiel W. The role of serine proteases in the blood coagulation cascade. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 1979;48:277-318. PubMed PMID: 367103.
29. Mejri N, Franscini N, Rutti B, Brossard M. Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to Ixodes ricinus instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. Parasite Immunol. 2001;23(2):61-9. PubMed PMID: 11240897.

30. Ramachandra RN, Wikel SK. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. J Med Entomol. 1992;29(5):818-26. Epub 1992/09/01. PubMed PMID: 1404261.
31. Rodrigues V, Fernandez B, Vercoutere A, Chamayou L, Andersen A, Vigy O, et al. Immunomodulatory Effects of Amblyomma variegatum Saliva on Bovine Cells: Characterization of Cellular Responses and Identification of Molecular Determinants. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:521. Epub 2018/01/23. doi: 10.3389/fcimb.2017.00521. PubMed PMID: 29354598; PubMed Central PMCID: PMCPMC5759025.
32. Urioste S, Hall LR, Telford SR, 3rd, Titus RG. Saliva of the Lyme disease vector, Ixodes dammini, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2-dependent mechanism. J Exp Med. 1994;180(3):1077-85. PubMed PMID: 8064226; PubMed Central PMCID: PMCPMC2191645.
33. Chang HC, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. Nat Immunol. 2010;11(6):527-34. doi: 10.1038/ni.1867. PubMed PMID: 20431622; PubMed Central PMCID: PMCPMC3136246.
34. Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius JW, Das S, Thomas V, Persinski R, et al. Salp15, an ixodes scapularis salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. Immunity. 2002;16(6):849-59. Epub 2002/07/18. PubMed PMID: 12121666.
35. Leboulle G, Crippa M, Decrem Y, Mejri N, Brossard M, Bollen A, et al. Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from Ixodes ricinus ticks. J Biol Chem. 2002;277(12):10083-9. Epub 2002/01/17. doi: 10.1074/jbc.M111391200. PubMed PMID: 11792703.
36. Skallova A, Iezzi G, Ampenberger F, Kopf M, Kopecky J. Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. J Immunol. 2008;180(9):6186-92. PubMed PMID: 18424740.
37. Taub DD, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ. Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. J Immunol. 1996;156(6):2095-103. Epub 1996/03/15. PubMed PMID: 8690897.
38. Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, Dardalhon V, Awasthi A, Imitola J, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(31):12885-90. doi: 10.1073/pnas.0812530106. PubMed PMID: 19433802; PubMed Central PMCID: PMCPMC2722314.
39. de Waal Malefyt R, Abrams JS, Zurawski SM, Lecron JC, Mohan-Peterson S, Sanjanwala B, et al. Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8+ and CD4+ Th0, Th1 and Th2 T cell clones and EBV-transformed B cells. Int Immunol. 1995;7(9):1405-16. PubMed PMID: 7495748.
40. Attia Z, Rowe JC, Kim E, Varikuti S, Steiner HE, Zaghawa A, et al. Inhibitors of elastase stimulate murine B lymphocyte differentiation into IgG- and IgA-producing cells. Eur J Immunol. 2018;48(8):1295-301. doi: 10.1002/eji.201747264. PubMed PMID: 29710424.
41. Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. J Exp Med. 1999;189(11):1747-56. PubMed PMID: 10359578; PubMed Central PMCID: PMCPMC2193079.
42. Yu G, Boone T, Delaney J, Hawkins N, Kelley M, Ramakrishnan M, et al. APRIL and TALL-I and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. Nat Immunol. 2000;1(3):252-6. doi: 10.1038/79802. PubMed PMID: 10973284.
43. Kovar L, Kopecky J, Rihova B. Salivary gland extract from Ixodes ricinus tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokine profile. Parasitol Res. 2002;88(12):1066-72. doi: 10.1007/s00436-002-0714-4. PubMed PMID: 12444457.
44. Mejri N, Brossard M. Splenic dendritic cells pulsed with Ixodes ricinus tick saliva prime naive CD4+T to induce Th2 cell differentiation in vitro and in vivo. Int Immunol. 2007;19(4):535-43. doi: 10.1093/intimm/dxm019. PubMed PMID: 17344202.

45. Ganapamo F, Rutti B, Brossard M. In vitro production of interleukin-4 and interferon-gamma by lymph node cells from BALB/c mice infested with nymphal Ixodes ricinus ticks. Immunology. 1995;85(1):120-4. PubMed PMID: 7635513; PubMed Central PMCID: PMCPMC1384034.
46. Zeidner N, Dreitz M, Belasco D, Fish D. Suppression of acute Ixodes scapularis-induced Borrelia burgdorferi infection using tumor necrosis factor-alpha, interleukin-2, and interferon-gamma. J Infect Dis. 1996;173(1):187-95. PubMed PMID: 8537658.
47. Thelen M, Stein JV. How chemokines invite leukocytes to dance. Nat Immunol. 2008;9(9):953-9. doi: 10.1038/ni.f.207. PubMed PMID: 18711432.
48. Kopecky J, Kuthejlova M, Pechova J. Salivary gland extract from Ixodes ricinus ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. Parasite Immunol. 1999;21(7):351-6. PubMed PMID: 10417669.
49. Horka H, Staudt V, Klein M, Taube C, Reuter S, Dehzad N, et al. The tick salivary protein sialostatin L inhibits the Th9-derived production of the asthma-promoting cytokine IL-9 and is effective in the prevention of experimental asthma. J Immunol. 2012;188(6):2669-76. doi: 10.4049/jimmunol.1100529. PubMed PMID: 22327077; PubMed Central PMCID: PMCPMC3523721.
50. Preston SG, Majtan J, Kouremenou C, Rysnik O, Burger LF, Cabezas Cruz A, et al. Novel immunomodulators from hard ticks selectively reprogramme human dendritic cell responses. PLoS Pathog. 2013;9(6):e1003450. doi: 10.1371/journal.ppat.1003450. PubMed PMID: 23825947; PubMed Central PMCID: PMCPMC3695081.
51. Salat J, Paesen GC, Rezacova P, Kotsyfakis M, Kovarova Z, Sanda M, et al. Crystal structure and functional characterization of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick Ornithodoros moubata. Biochem J. 2010;429(1):103-12. doi: 10.1042/BJ20100280. PubMed PMID: 20545626; PubMed Central PMCID: PMCPMC3523712.
52. Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, Ross S, Wieczorek M, Kroona H, et al. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(11):6261-6. PubMed PMID: 10339575; PubMed Central PMCID: PMCPMC26869.
53. Kwiatkowski K, Mika J. The importance of chemokines in neuropathic pain development and opioid analgesic potency. Pharmacol Rep. 2018;70(4):821-30. doi: 10.1016/j.pharep.2018.01.006. PubMed PMID: 30122168.
54. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. Biochim Biophys Acta. 2014;1843(11):2563-82. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014. PubMed PMID: 24892271.
55. Suffee N, Hlawaty H, Meddahi-Pelle A, Maillard L, Louedec L, Haddad O, et al. RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. Angiogenesis. 2012;15(4):727-44. doi: 10.1007/s10456-012-9285-x. PubMed PMID: 22752444.
56. Adachi Y, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Takayama K, Curiel DT, Nishimoto N. Interleukin-6 induces both cell growth and VEGF production in malignant mesotheliomas. Int J Cancer. 2006;119(6):1303-11. doi: 10.1002/ijc.22006. PubMed PMID: 16642474.
57. Mark KS, Trickler WJ, Miller DW. Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. J Pharmacol Exp Ther. 2001;297(3):1051-8. PubMed PMID: 11356928.
58. Salcedo R, Young HA, Ponce ML, Ward JM, Kleinman HK, Murphy WJ, et al. Eotaxin (CCL11) induces in vivo angiogenic responses by human CCR3+ endothelial cells. J Immunol. 2001;166(12):7571-8. PubMed PMID: 11390513.
59. Arendse B, Van Snick J, Brombacher F. IL-9 is a susceptibility factor in Leishmania major infection by promoting detrimental Th2/type 2 responses. J Immunol. 2005;174(4):2205-11. PubMed PMID: 15699153.
60. Barron L, Dooms H, Hoyer KK, Kuswanto W, Hofmann J, O'Gorman WE, et al. Cutting edge: mechanisms of IL-2-dependent maintenance of functional regulatory T cells. J Immunol.

2010;185(11):6426-30. doi: 10.4049/jimmunol.0903940. PubMed PMID: 21037099; PubMed Central PMCID: PMCPMC3059533.
61. Chinen T, Kannan AK, Levine AG, Fan X, Klein U, Zheng Y, et al. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. Nat Immunol. 2016;17(11):1322-33. doi: 10.1038/ni.3540. PubMed PMID: 27595233; PubMed Central PMCID: PMCPMC5071159.
62. Brake DK, Perez de Leon AA. Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of Rhipicephalus microplus. Parasit Vectors. 2012;5:38. doi: 10.1186/1756-3305-5-38. PubMed PMID: 22333193; PubMed Central PMCID: PMCPMC3320552.
63. Takatsu K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2011;87(8):463-85. PubMed PMID: 21986312; PubMed Central PMCID: PMCPMC3313690.
64. Nuttall PA, Trimnell AR, Kazimirova M, Labuda M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. Parasite Immunol. 2006;28(4):155-63. doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00806.x. PubMed PMID: 16542317.
65. Kim TK, Tirloni L, Pinto AF, Moresco J, Yates JR, 3rd, da Silva Vaz I, Jr., et al. Ixodes scapularis Tick Saliva Proteins Sequentially Secreted Every 24 h during Blood Feeding. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(1):e0004323. doi: 10.1371/journal.pntd.0004323. PubMed PMID: 26751078; PubMed Central PMCID: PMCPMC4709002.
66. Bonnet S, Jouglin M, Malandrin L, Becker C, Agoulon A, L'Hostis M, et al. Transstadial and transovarial persistence of Babesia divergens DNA in Ixodes ricinus ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. Parasitology. 2007;134(Pt 2):197-207. doi: 10.1017/S0031182006001545. PubMed PMID: 17076925.
67. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Refregiers M, et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(24):E3095-103. doi: 10.1073/pnas.1500851112. PubMed PMID: 26038575; PubMed Central PMCID: PMCPMC4475991.
68. Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. Biophys J. 2000;78(3):1606-19. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76713-0. PubMed PMID: 10692345; PubMed Central PMCID: PMCPMC1300758.
69. Reis C, Cote M, Le Rhun D, Lecuelle B, Levin ML, Vayssier-Taussat M, et al. Vector competence of the tick Ixodes ricinus for transmission of Bartonella birtlesii. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(5):e1186. Epub 2011/06/10. doi: 10.1371/journal.pntd.0001186. PubMed PMID: 21655306; PubMed Central PMCID: PMCPMC3104967.
70. Bugarel M, Beutin L, Scheutz F, Loukiadis E, Fach P. Identification of genetic markers for differentiation of Shiga toxin-producing, enteropathogenic, and avirulent strains of Escherichia coli O26. Appl Environ Microbiol. 2011;77(7):2275-81. doi: 10.1128/AEM.02832-10. PubMed PMID: 21317253; PubMed Central PMCID: PMCPMC3067419.
71. Almazan C, Bonnet S, Cote M, Slovak M, Park Y, Simo L. A Versatile Model of Hard Tick Infestation on Laboratory Rabbits. J Vis Exp. 2018;(140). doi: 10.3791/57994. PubMed PMID: 30346382; PubMed Central PMCID: PMCPMC6235438.
72. Patton TG, Dietrich G, Brandt K, Dolan MC, Piesman J, Gilmore RD, Jr. Saliva, salivary gland, and hemolymph collection from Ixodes scapularis ticks. J Vis Exp. 2012;(60). Epub 2012/03/01. doi: 10.3791/3894. PubMed PMID: 22371172; PubMed Central PMCID: PMCPMC3912584.
73. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc. 2008;3(6):1101-8. Epub 2008/06/13. PubMed PMID: 18546601.
74. Koci J, Simo L, Park Y. Validation of internal reference genes for real-time quantitative polymerase chain reaction studies in the tick, Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. 2013;50(1):79-84. Epub 2013/02/23. PubMed PMID: 23427655; PubMed Central PMCID: PMCPMC3703510.
75. Simo L, Slovak M, Park Y, Zitnan D. Identification of a complex peptidergic neuroendocrine network in the hard tick, Rhipicephalus appendiculatus. Cell Tissue Res. 2009;335(3):639-55. Epub

2008/12/17. doi: 10.1007/s00441-008-0731-4. PubMed PMID: 19082627; PubMed Central PMCID: PMCPMC3573535.
76. Jourdi G, Siguret V, Martin AC, Golmard JL, Godier A, Samama CM, et al. Association rate constants rationalise the pharmacodynamics of apixaban and rivaroxaban. Thromb Haemost. 2015;114(1):78-86. Epub 2015/03/13. doi: 10.1160/TH14-10-0877. PubMed PMID: 25761505.
77. Jourdi G, Gouin-Thibault I, Siguret V, Gandrille S, Gaussem P, Le Bonniec B. FXa-alpha2-Macroglobulin Complex Neutralizes Direct Oral Anticoagulants Targeting FXa In Vitro and In Vivo. Thromb Haemost. 2018;118(9):1535-44. Epub 2018/08/03. doi: 10.1055/s-0038-1667014. PubMed PMID: 30071567.
78. Carreau A, Kieda C, Grillon C. Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. Exp Cell Res. 2011;317(1):29-41. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.08.011. PubMed PMID: 20813110.
79. Paprocka M, Krawczenko A, Dus D, Kantor A, Carreau A, Grillon C, et al. CD133 positive progenitor endothelial cell lines from human cord blood. Cytometry A. 2011;79(8):594-602. doi: 10.1002/cyto.a.21092. PubMed PMID: 21710642.
80. Carpentier G. Angiogenesis analyser tool for Image J. 2012.
81. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat Protoc. 2015;10(6):845-58. Epub 2015/05/08. doi: 10.1038/nprot.2015.053. PubMed PMID: 25950237; PubMed Central PMCID: PMCPMC5298202.

Authors contribution

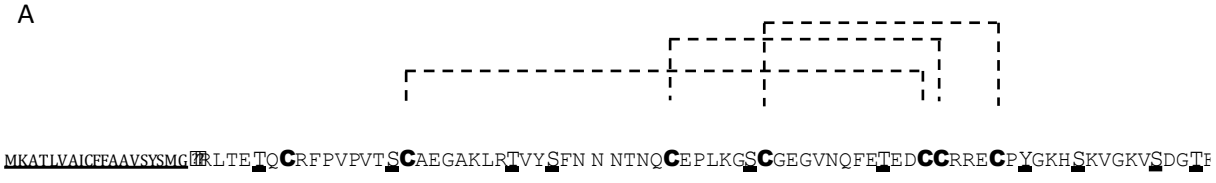
AAB and SIB conceived the experiments. AAB, SIB, JR, LS, CG, FF, SB, BLB and EP designed and performed experiments. AAB, SIB, JR, LS, SB, BLB, CG and MM analyzed the data. AAB, SIB, JR, LS, CG, FF, SB, BLB, EP and MM wrote the paper.

Funding

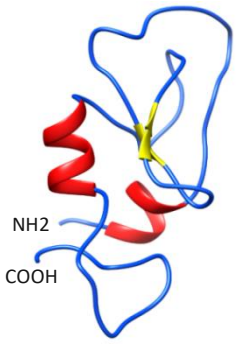
This work was supported by PhD grant of AAB from both ANSES and the French ministry of Agriculture and food (DGER).

Figure legends

A



B



C

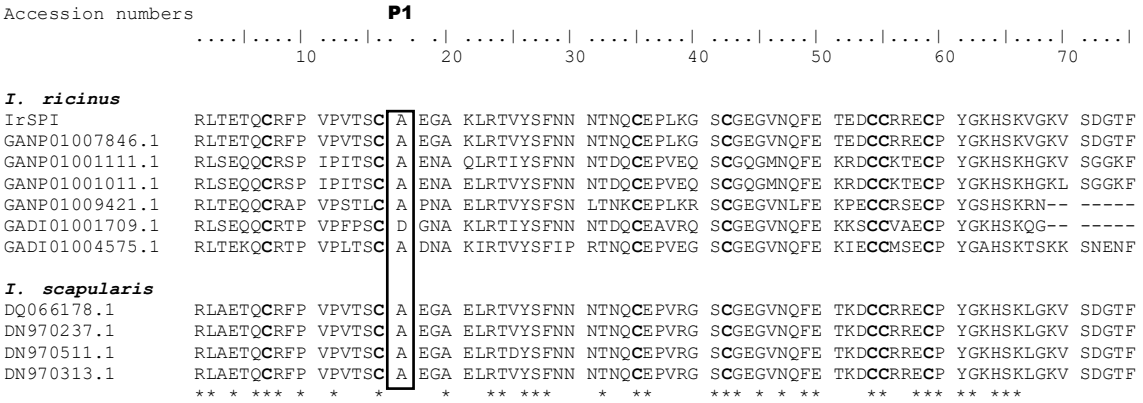


Fig 1. Sequence structure of IrSPI (KF 531922.2) and amino acid sequence alignment of *I. ricinus* and *I. scapularis* Kunitz protease inhibitors. A) Primary and B) secondary structures of IrSPI. The signal peptide is underlined. Post-translational modification predictions identified 10 putative phosphorylation sites (underlined) and 1 putative N-glycosylation site (double underlined). The 7 cysteine residues (in bold) provide the possibility of forming 3 disulfide bridges (dashed line) and, combined with the formation of 2 β–sheets (yellow) and 2 α-helices (red), bestow the Kunitz/BPTI fold to IrSPI protein with only one Kunitz domain. C) Amino acid sequence alignment of IrSPI with other known tick Kunitz protease inhibitors from *I. ricinus* and *I. scapularis* with their corresponding accession numbers. Identical amino acids are marked with asterisks and the P1 residue is highlighted by a rectangle. Accession numbers in genbank are indicated for each gene, as well as the percentage of identity with IrSPI.

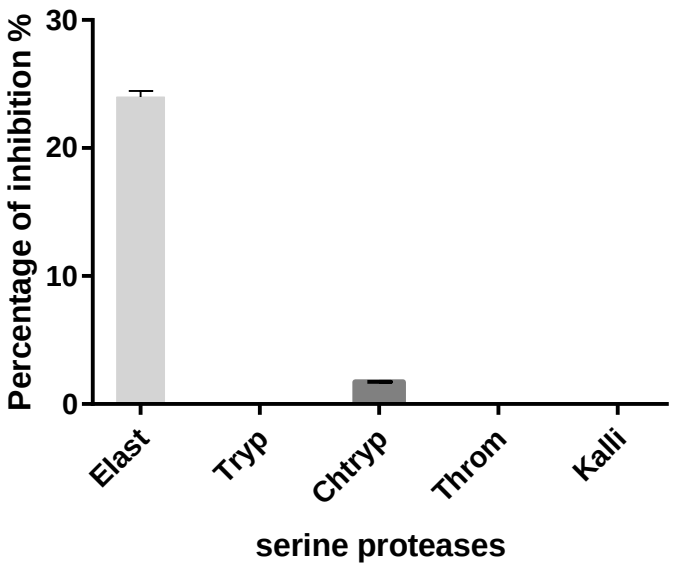


Fig 2. Inhibition of serine proteases by IrSPI. The ability of IrSPI (1µM of refolded protein) to inhibit the activity of elastase (Elast), trypsin (Tryp), chymotrypsin (Chtryp), thrombin (Throm) and kallikrein (Kalli) on synthetic substrates was evaluated at 37°C for 30 min. The enzyme activity was evaluated by reading the absorbance at a wavelength of 405 nm and results were expressed as the mean of duplicates of percentage of inhibition due to IrSPI after subtraction of the refolding buffer effect and comparison with the control.

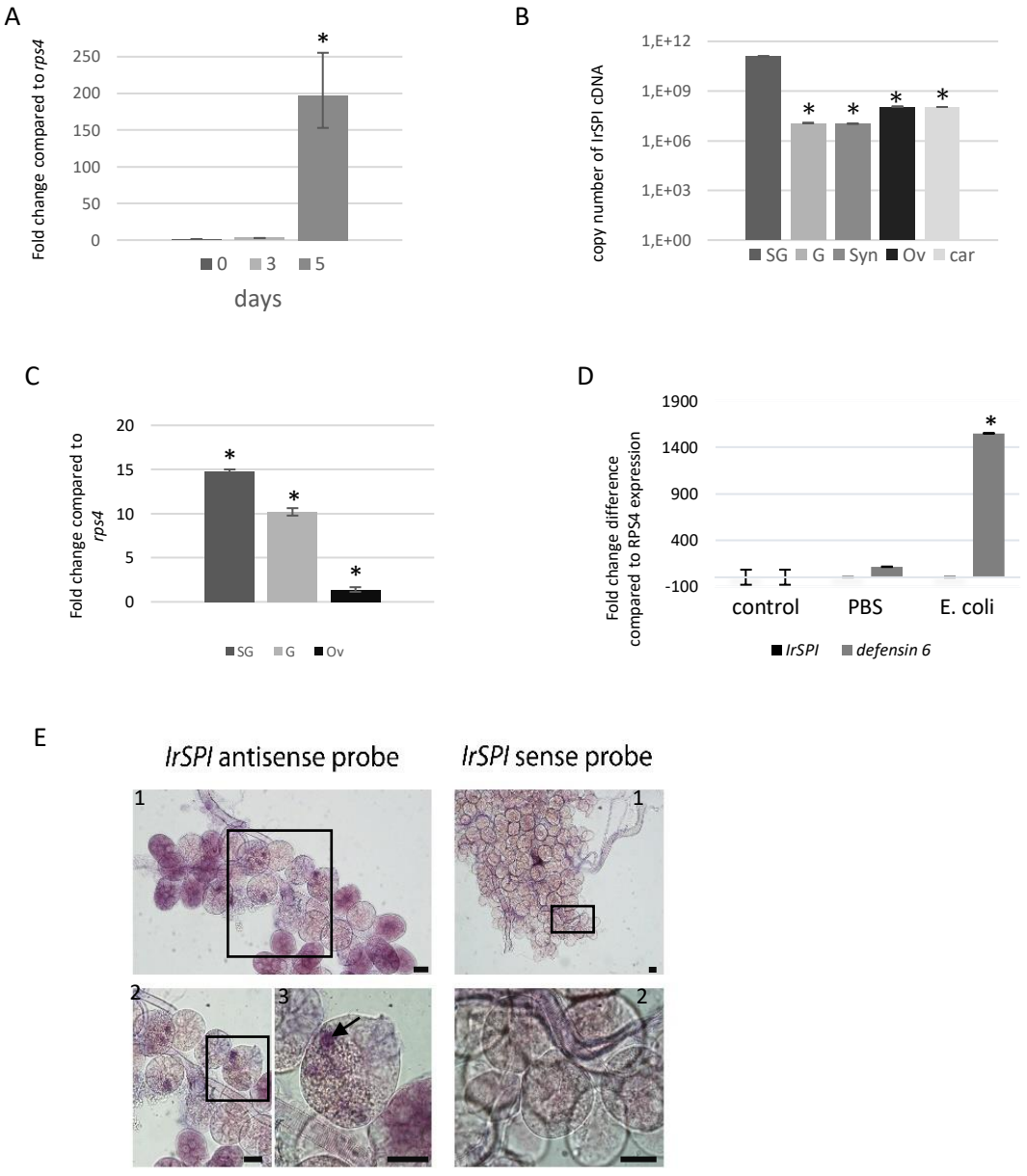


Fig 3. IrSPI transcript profiling and localization. A) Relative *IrSPI* expression in pathogen-free nymphs throughout feeding on rabbits showing late expression of the gene at day 5. 20 pathogen-free nymphs were used for all feeding time points (Days 0, 3 and 5), and *IrSPI* expression monitored by quantitative RT-PCR was expressed relative to *rps4* gene. B) Relative *IrSPI* expression in several organs of wild female ticks pre-fed for 5 days on rabbit. Pools of salivary glands (SG), gut (G), synganglion (Syn), ovaries (Ov) and the remaining body, i.e. the carcasses (car) from 17 females were used for each condition, and *IrSPI* expression monitored by quantitative RT-PCR was expressed according to the copy number of *IrSPI* cloned in a plasmid. C) Relative expression of *IrSPI* in pools of 13 salivary glands, (SG), 14 gut (G) and 16 ovaries (Ov) from *B. henselae* infected females pre-fed for 4 days, was monitored by quantitative RT-PCR, compared with uninfected ones, and expressed as fold change with respect to *rps4* gene. D) Relative *IrSPI* and *defensin6* expression after *E. coli* injection. Three pathogen-free females per group received no injection (Control), 250 nl of PBS (PBS) or 250 nl of 10^7 bacterial CFU (*E. coli*) and mean expression of *IrSPI* and *defensin 6,* normalized to RSP4 expression, was monitored

by quantitative RT-PCR after 24h. E) *In situ* hybridization of mRNA of IrSPI in salivary glands of pathogen free females pre-fed for 8 days on membrane. Specific IrSPI anti-sense probe was incubated on salivary glands and visualized through addition of NBT/BCIP. Arrows show the presence of IrSPI transcripts in cells containing secretory vesicles in type II acini. IrSPI sense probe was used as negative control. Screens 1 to 3 are successive zooms. The scale bars represent 60 µm. Asterisks (*) indicate significant difference as determined by Student's t-test (P<0,05).

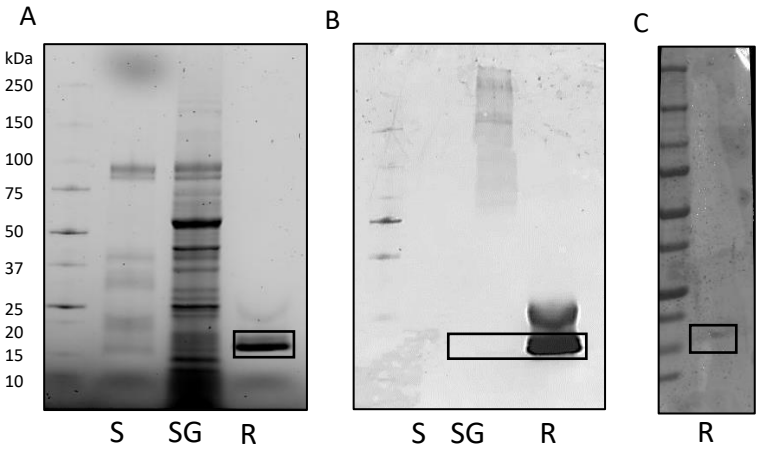


Fig 4. Detection of endogenous IrSPI protein expression. Tick saliva (S) and salivary gland extracts (SG) were obtained from a pool of 17 I. ricinus females from the field after a pre-feeding step of 5 days on rabbits. 10 µl of saliva (S), 10 µl of salivary gland extract (SG) and 1.4 µg of recombinant IrSPI (R) were used in each corresponding lane. A) SDS-PAGE electrophoresis and UV revelation. B) Western blot analysis using an antiserum from a mouse immunized against IrSPI. C) Western blot analysis using an antiserum from a rabbit after tick infestation. Bands corresponding to IrSPI are framed.

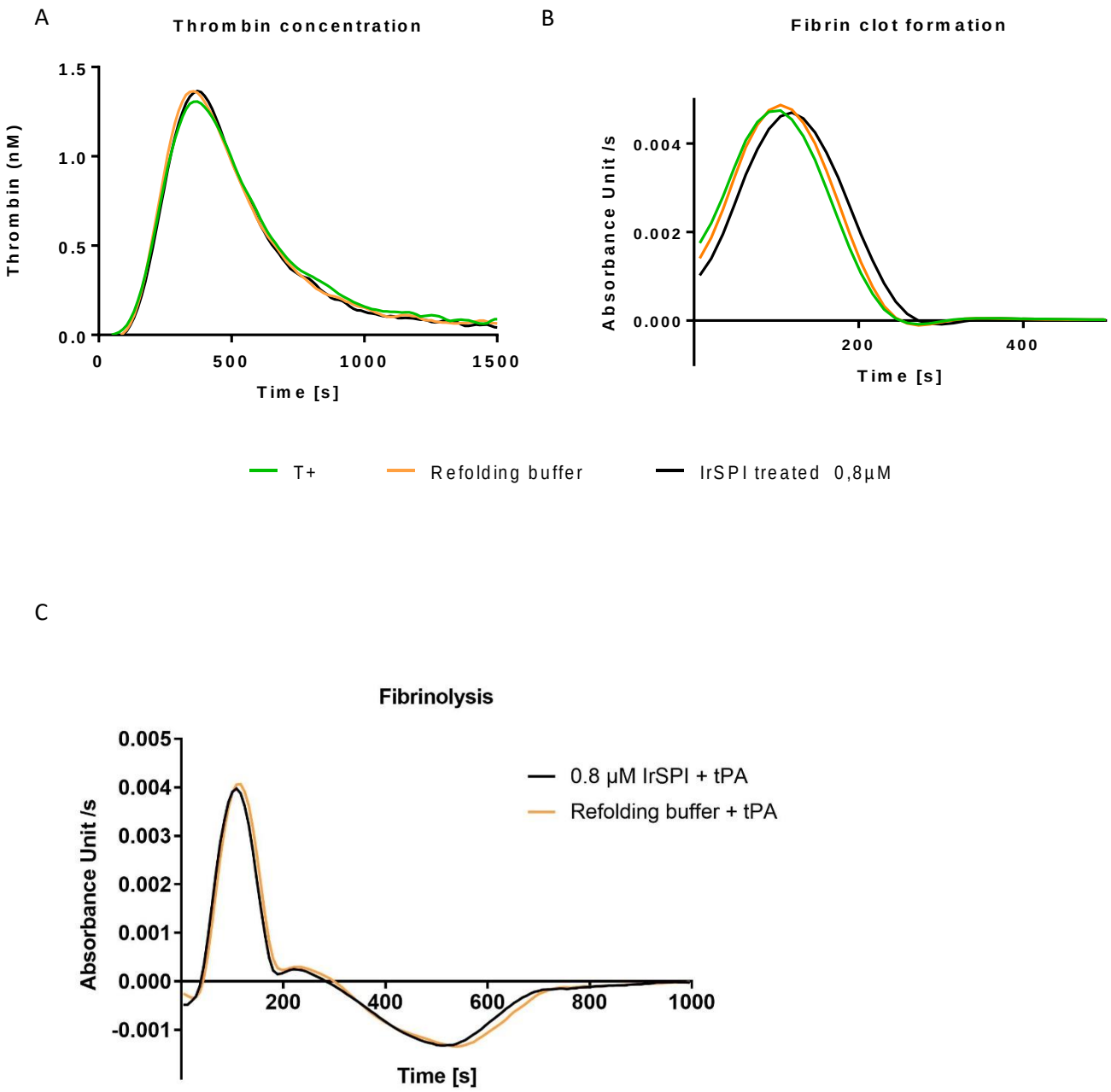


Fig 5. Effect of IrSPI on vertebrate host coagulation. A) Effect of IrSPI on thrombin generation during the coagulation process induced by the extrinsic coagulation pathway. Thrombin formation, generated by addition of phospholipidic vesicles and calcium in the presence of chromogenic substrate, was monitored by determining fluorescence at 340 nm. B) Effect of IrSPI on fibrin clot formation induced by the extrinsic coagulation pathway. Fibrin formation in response to thrombin activation was determined by recording the increase in absorbance at 405 nm. C) Effect of IrSPI on fibrin clot lysis after fibrin formation. Fibrin lysis was determined by recording the decrease in absorbance at 405 nm. All results are presented as the mean of two independent experiments.

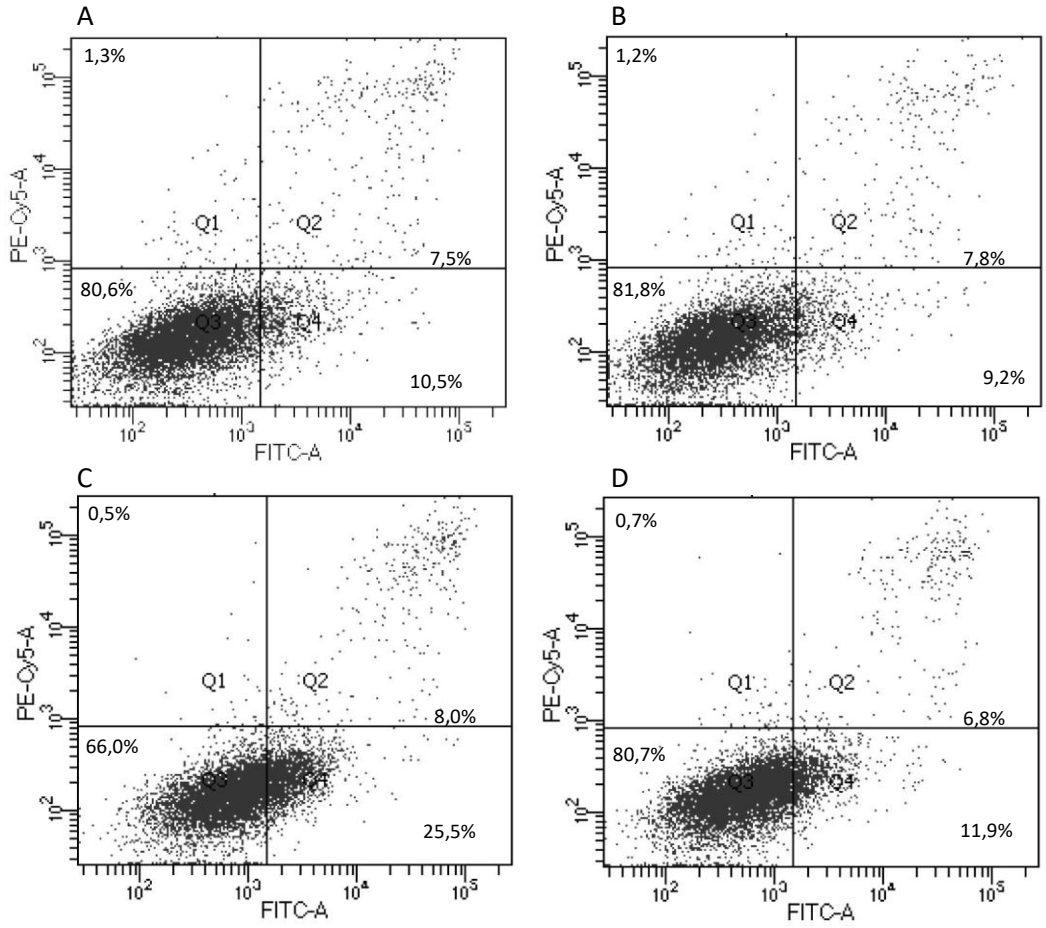
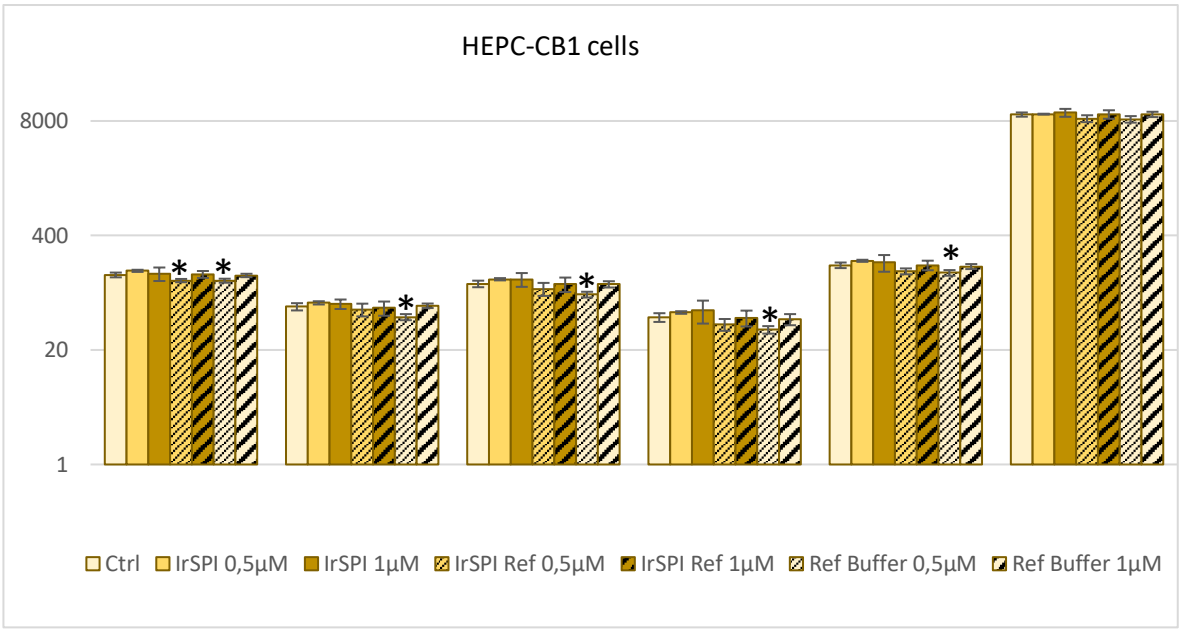


Fig 6. Impact of IrSPI on endothelial cell apoptosis. Viability and apoptosis were monitored in HsKMEC endothelial cells after labelling with propidium iodide and Annexin V-FITC, respectively, by flow cytometry. Cells were incubated for 40h in the presence of A) culture medium, B) 1 µM of IrSPI without refolding, C) refolding medium, or D) 1 µM of refolded IrSPI. The percentage of apoptotic cells was determined as the number of cells labelled with Annexin V but not propidium iodide (Q4) out of 10000 cells analysed per condition.

A



B

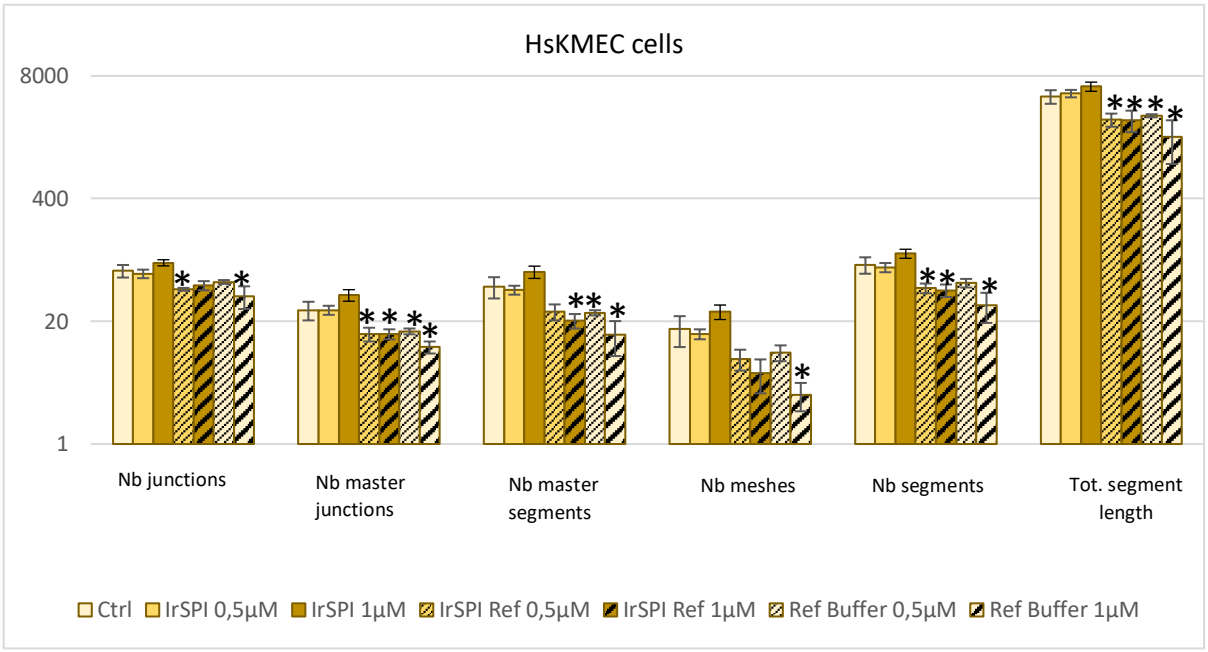


Fig 7. Impact of IrSPI on angiogenesis. A) HEPC-CB1 and B) HsKMEC endothelial cells were cultivated with IrSPI before (IrSPI) or after refolding step (IrSPI Ref) for 9h30, and number of junctions, master junction, segments, master segments, meshes and total segment length were recorded via video-microscopy every 30 min and analysed with ImageJ software. Results are expressed as mean of triplicates. Controls correspond to culture medium (ctrl) and refolding buffer (Ref buffer). Asterisks (*) indicate significant difference as determined using the Student's t test ($P<0.05$).

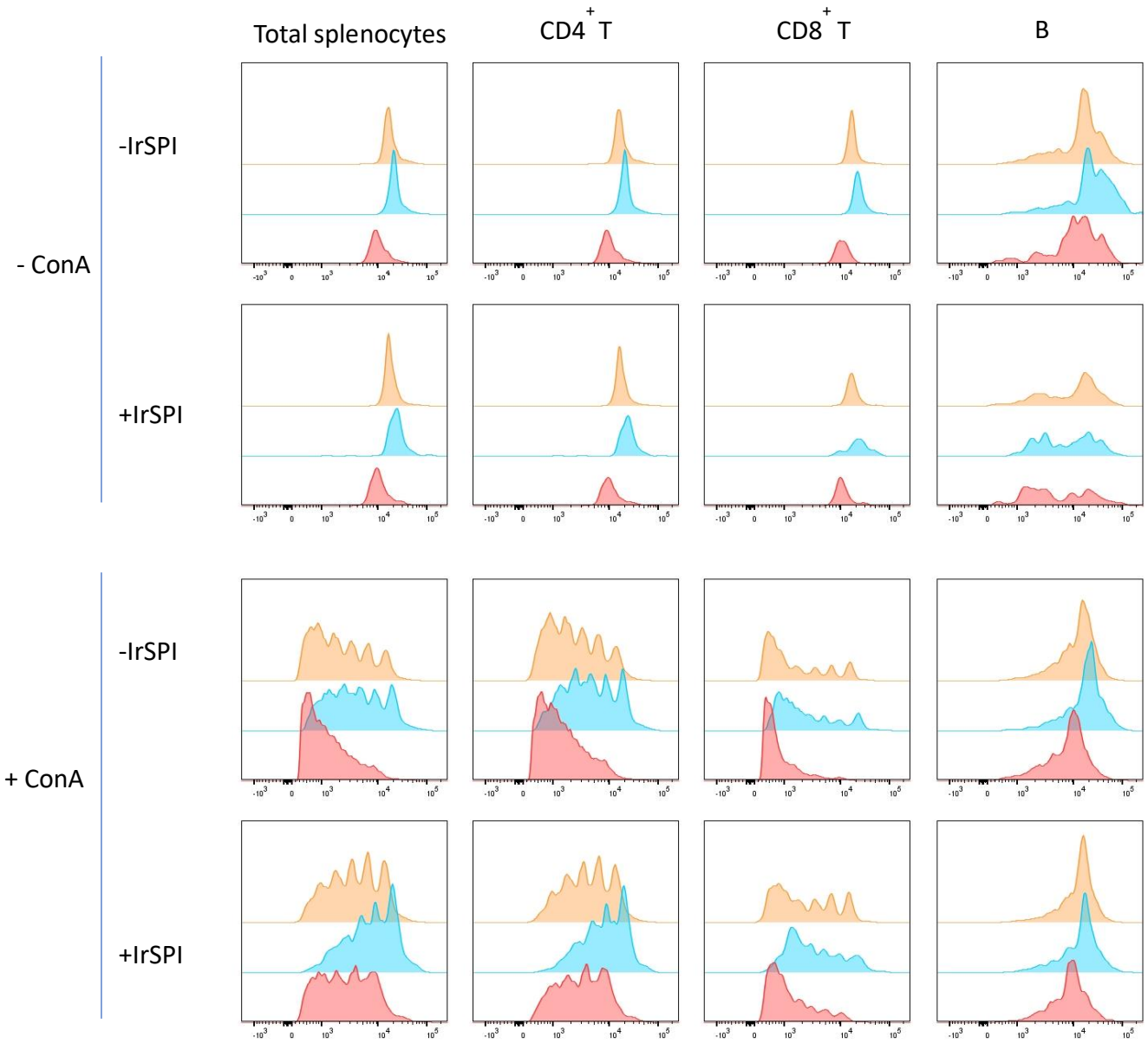
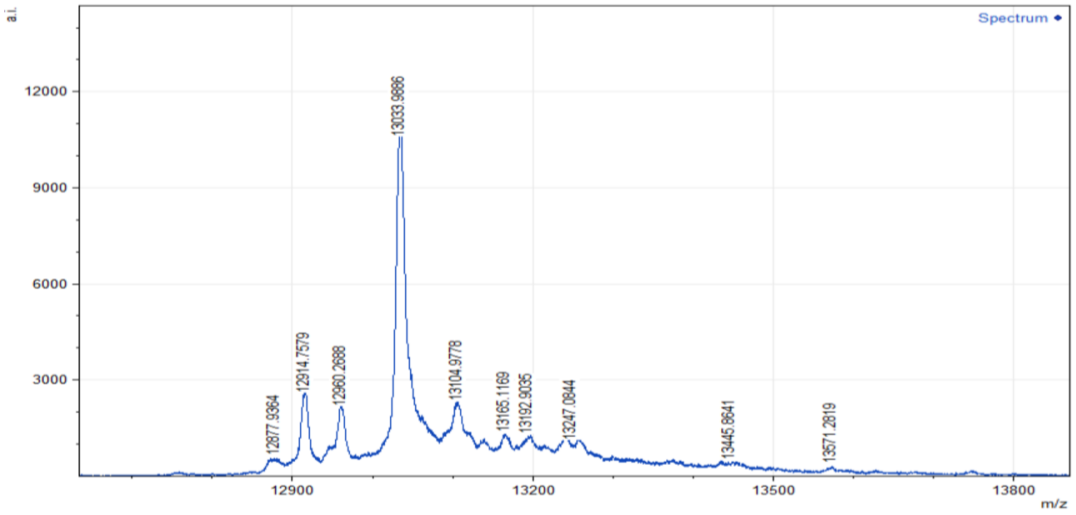


Fig 8. Impact of IrSPI on mice splenocyte proliferation. Splenocytes from OFI mice were used to evaluate proliferation of T and B cell subsets with or without mitogenic stimulation by Concanavalin A. Cell proliferation was evaluated by CFSE dye dilution and flow cytometry. Splenocytes of each of 3 mice were evaluated separately in triplicate for each condition. Results are expressed for each condition as the mean of triplicate wells for each condition. Successive peaks, corresponding to decrease of CFSE labelling, reveal successive cell divisions.

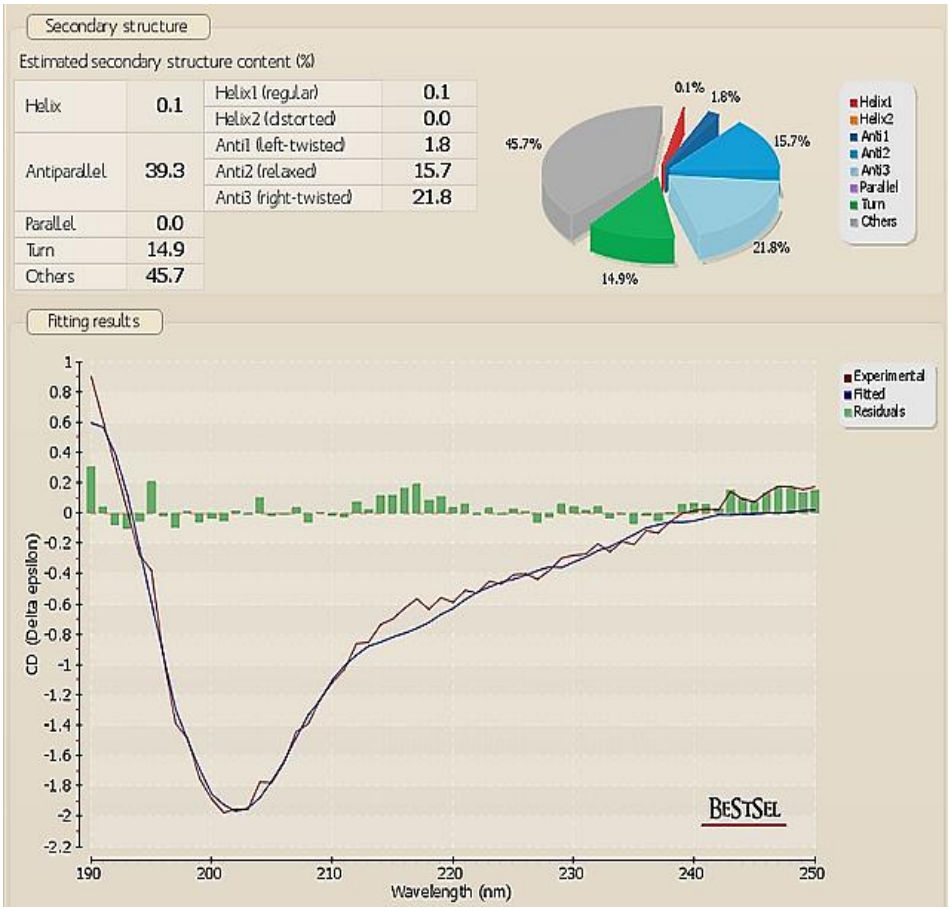
Supporting information

S1 Fig.



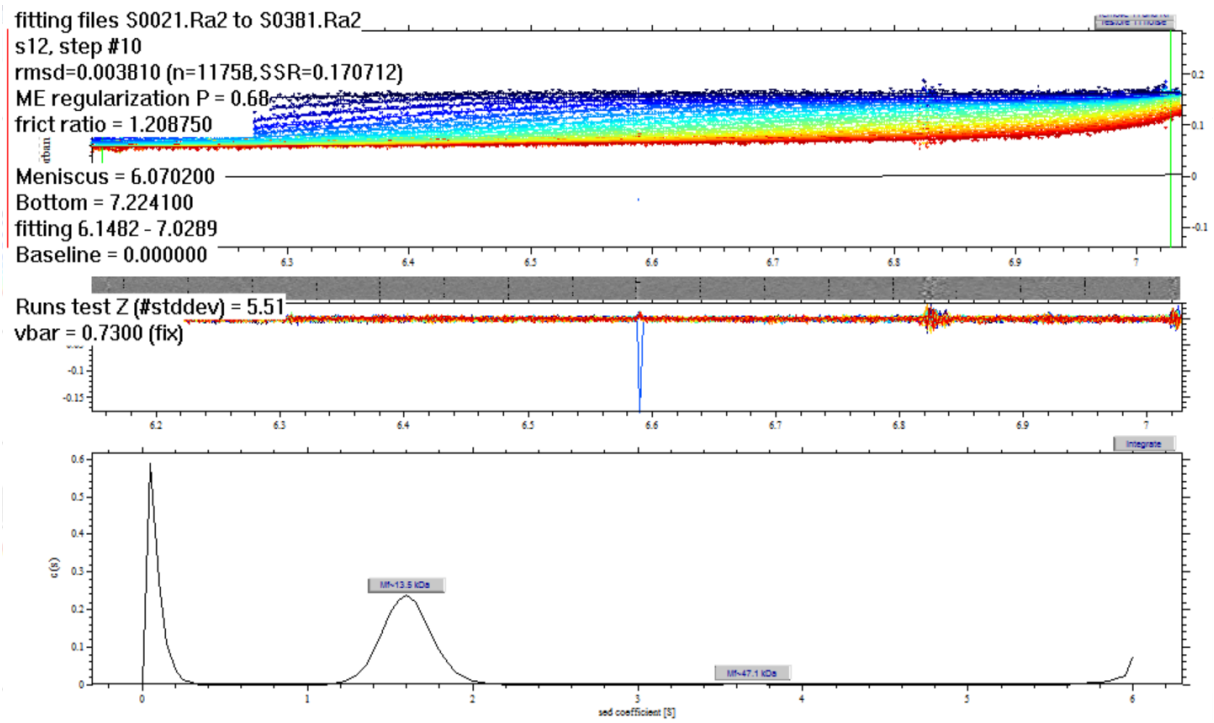
S1Fig. MALDI TOF/TOF analyses of IrSPI. Recombinant protein at 0.075 mg/mL was deposited on a MTP 384 ground steel target plate with 2,5-DHB in 50% acetonitrile, trifluoroacetic acid as matrix solution. Data were acquired using Flexcontrol software (Bruker-Daltonics, Germany) and shots were recorded in positive ion linear mode.

S2 Fig.



S2 Fig. Circular dichroism analyses of recombinant IrSPI at 0.075mg/ml. Experiments were performed in the far-UV using an Aviv CD spectrometer model 215 equipped with a water-cooled Peltier unit. Spectra were recorded in a cell width of 1-mm path length in 200µl in far-UV (between 190 to 270 nm) at 25°C. IrSPI and its cognate buffer were screened ten times successively to produce an averaged spectrum, which was corrected using buffer baselines. Data were normalized to residue molar absorption measured in mdeg (M^{-1} cm^{-1}) and expressed as delta epsilon ($\Delta\varepsilon$) allowing BestSel website algorithm treatment for secondary structure predictions.

S3 Fig.



S3 Fig. AUC analysis of the recombinant IrSPI at 0.075µg/µl in epoxy double sector cell. Cell of measurement was equilibrated for 1h30 at 20.0°C in a four-hole AN60-Ti rotor. The sample was spun for 10h and 400 scans for both Rayleigh interference and absorbance at 280 nm were recorded. Absorbance data were collected at a constant radial step size of 0.001 cm. Partial specific volume of 0.70 and the extinction coefficient ε at 280 nm of 14350 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ were theoretically calculated at 20 °C from the IrSPI amino acid sequence using Sednterp software (Spin Analytical, USA). As a control, the PBS (-Ca^{2+} and -Mg^{2+}) density ρ and viscosity η of 1.0053 $g.mL^{-1}$ and 1.018 cP respectively were also determined with Sednterp at 20°C.

S1 Table: Cytokine and chemokine concentrations (pg/ml) in splenocyte supernatants in the presence or absence of IrSPI without ConA stimulation and normalized to standards

	- IrSPI	+ IrSPI
IFN-gamma	11.2	2.4
IL-1 beta	1.8	2.2
IL-12p70	93.2	130.3
IL-13	7.7	6.7
IL-18	3.6	2.5
IL-2	302.7	186.7
IL-4	15.3	11.5
IL-5	5.9	5.6
IL-6	3.9	3.6
TNF-alpha	10.5	10.8
IL-10	1.4	0.6
IL-17A	0.8	1.2
IL-22	0.6	1.0
IL-23	0.7	0.7
IL-27	0.4	0.0
IL-9	4.0	5.4
GM-CSF	1.6	0.0
Eotaxin	1.8	2.2
Gro α KC	15.4	13.1
IP10	41.3	27.8*****
MCP1	44.4	28.8
MCP3	22.9	6.3*****
MIP1Alpha	1864.4	1642.4
MIP1Beta	1128.8	834.8*****
MIP2	51.5	52.6
RANTES	293.7	247.9*****

* significant difference as determined using Anova (P-value < 0.01) after 3 days of exposure to IrSPI. Splenocytes of each of 3 mice were evaluated separately in triplicate for each condition. Results are expressed as the mean for the 3 mice after calculating the mean of triplicate wells for each mouse. Grey lines indicate upregulated cytokines/chemokines in the presence of IrSPI.

S2 Table: Cytokine and chemokine concentrations (pg/ml) in splenocyte supernatants in the presence or absence of IrSPI after ConA stimulation and normalized to standards.

	- IrSPI	+ IrSPI
IFN-gamma	7744.2	3849.7*****
IL-1 beta	14.3	7.9*****
IL-12p70	147.2	141.8
IL-13	1000.1	248.9*****
IL-18	157.1	84.8*****
IL-2	867.3	1293.8*****
IL-4	719.9	547.2
IL-5	48.3	20.1
IL-6	134.8	60.9*****
TNF-alpha	372.1	200.5*****
IL-10	24.0	19.7
IL-17A	404.4	224.1
IL-22	15.4	5.2
IL-23	1.3	1.4
IL-27	1.4	0.1
IL-9	116.7	59.7*****
GM-CSF	537.2	150.7*****
Eotaxin	6.8	5.3*****
Gro α KC	53.3	45.9
IP10	1448.3	774.4*****
MCP1	306.4	276.7
MCP3	248.3	202.7
MIP1Alpha	9645.8	8942.3
MIP1Beta	7711.5	6328.5*****
MIP2	135.0	109.9
RANTES	1633.1	1013.7*****

* significant difference as determined using Anova (P-value < 0.01) after 3 days of exposure to IrSPI. Splenocytes of each of 3 mice were evaluated separately in triplicate for each condition. Results are expressed as the mean for the 3 mice after calculating the mean of triplicate wells for each mouse. Grey lines indicate upregulated cytokines/chemokines in the presence of IrSPI.

S3 Table: Cytokine and chemokine concentrations (pg/ml) in supernatants of activated macrophages in the presence or absence of IrSPI and normalized to standards

	- IrSPI	+ IrSPI
IFN-gamma	11319.3	10846.1
IL-1 beta	77.7	73.5
IL-12p70	261.3	234.1
IL-13	164.3	152.3
IL-18	360.1	346.9
IL-2	38.1	34.8
IL-4	22.7	21.2
IL-5	58.3	52.8*****
IL-6	5099.8	4683.6
TNF-alpha	2825.3	2606.5
IL-10	1494.8	1440.3
IL-17A	7.5	7.5
IL-22	6.0	5.6
IL-23	5.4	4.9
IL-27	203.8	189.3
IL-9	34.8	42.9
GM-CSF	114.1	109.1
Eotaxin	49.7	46.3
Gro α KC	4810.4	4302.4
IP10	15161.1	14538.4
MCP1	16765.5	16234.2
MCP3	15040.1	14643.5
MIP1Alpha	5804.3	5707.7
MIP1Beta	14476.9	14062.4
MIP2	23288.1	23188.8
RANTES	14591.7	14265.7

* significant difference as determined using Anova (P-value < 0.01) after 3 days of exposure to IrSPI. Macrophages of each of 3 mice were evaluated separately in triplicate for each condition. Results are expressed as the mean for the 3 mice after calculating the mean of duplicates wells for each mouse. Grey lines indicate upregulated cytokines/chemokines in the presence of IrSPI.

4.2.3 Etudes complémentaires

4.2.3.1 Matériel et Méthodes et Résultats

Expression du gène *IrSPI*

Outre les résultats d'expression présentés dans le manuscrit ci-avant, l'évaluation de l'expression de *IrSPI* au cours du repas sanguin a été analysée dans les glandes salivaires, l'intestin, les ovaires et la carcasse de femelles *I. ricinus* non gorgées issues de notre élevage et après 1, 2, 3, 5 et 8 jours de fixation des tiques sur des lapins de laboratoire. Six tiques ont été analysées à chaque temps suivant le même protocole que celui présenté dans le manuscrit et chaque organe et carcasse analysé individuellement. L'analyse de l'expression de *IrSPI* en qRT-PCR n'a donné aucun résultat positif quel que soit le temps ou l'organe analysé.

Détection de la protéine IrSPI par immunohistochimie

Outre la recherche de la localisation de l'expression du gène *IrSPI* dans les différents organes de la tique par qRT-PCR, nous avons voulu déterminer dans quel organe était exprimé la protéine par des d'analyses immunohistochimiques. Des tiques femelles *I. ricinus* pré-gorgées sur un lapin pendant 5 jours ont été fixées dans une solution de Carnoy (30% chloroforme, 60% éthanol, 30% acide acétique) puis déshydratées en éthanol (2 x 30 minutes en ETOH 70% puis 1h en ETOH 95%, enfin 2x1h et ETOH 100%), et les tissus ramollis grâce à des bains successifs en Butanol. Ces tiques ont ensuite été incluses en paraffine pour la réalisation de coupes de 5µM au microtome. Une coloration des coupes en HES (Hémalun Eosine Safran) a dans un premier temps été réalisée afin de visualiser les différents organes de la tique (Figure 26 A). La présence de la protéine IrSPI a été ensuite révélée par un sérum de souris anti-IrSPI obtenu 56 jours après immunisation par la protéine recombinante IrSPI (voir Matériel et méthodes du manuscrit) utilisé au 1000ème. Un sérum non immun a été utilisé comme contrôle négatif. Les anticorps primaires anti-IrSPI ont ensuite été révélés par un anticorps secondaire anti-souris de chèvre à la dilution 1/10000. Après rinçage, ces derniers sont alors révélés par une solution de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Leica). Le seul signal identifié l'a aussi été sur le témoin négatif, suggérant un probable marquage aspécifique des anticorps dirigés contre IrSPI (Figure 26B), ou des anticorps secondaires.

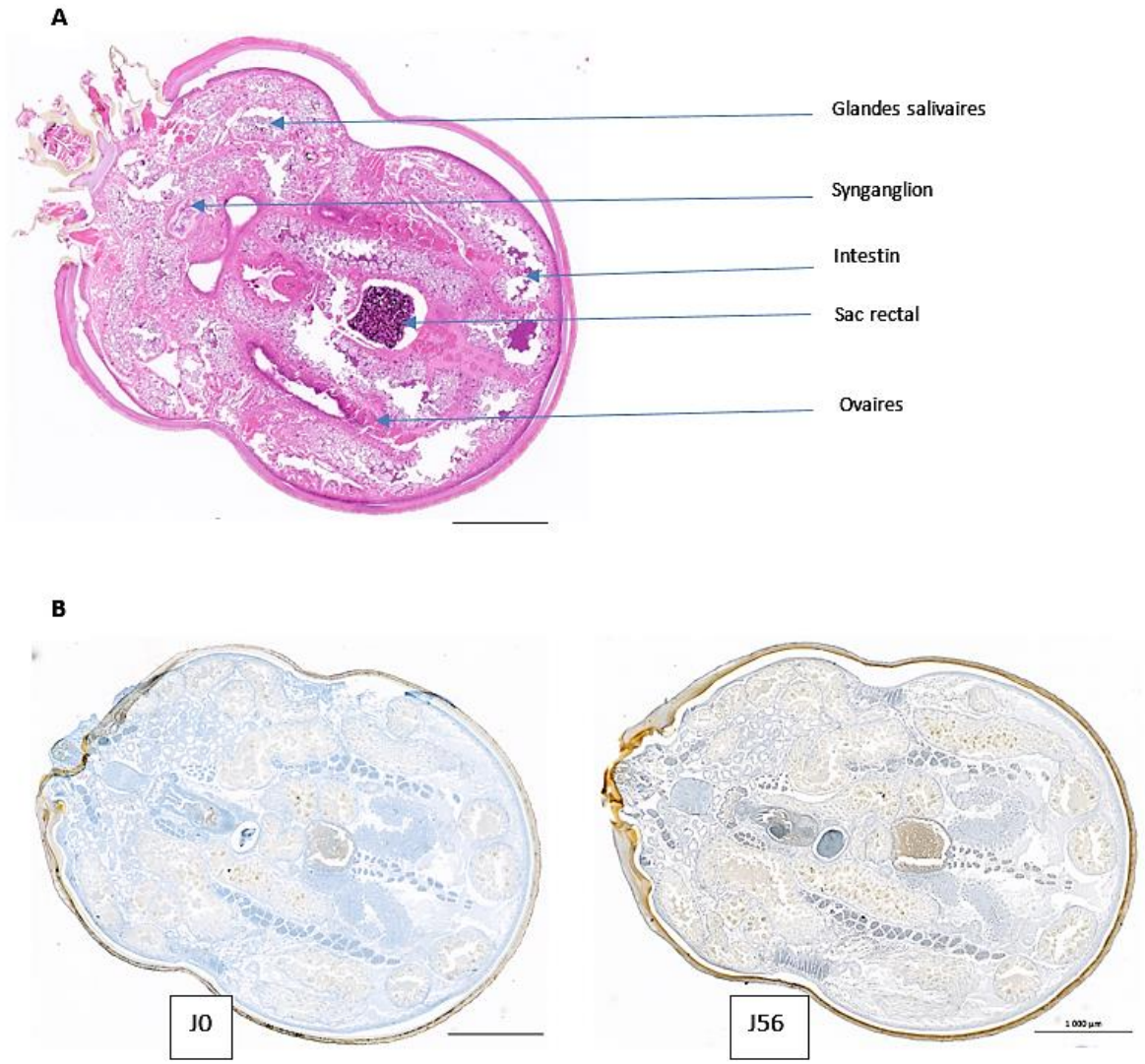


Figure 26: Coupes longitudinales de tiques femelles I. ricinus *pré-gorgées pendant 5 jours sur lapin après coloration HES (A) et marquage immunohistochimiques par des anticorps dirigés contre IrSPI (B). JO : témoin négatif avec un sérum non immun. J56 : sérum immun contre IrSPI.*

Analyse Biophysique de la protéine recombinante

Les analyses biophysiques évoquées dans le manuscrit ci-dessus lors de la caractérisation de IrSPI ont été effectuées avec la protéine recombinante synthétisée en cellules de drosophile S2. Ce système de production, utilisant des cellules d'arthropodes, a été choisi afin de se rapprocher au plus près des conditions de synthèse *in vivo* de la protéine native, notamment à cause de la présence d'une potentielle N-glycosylation que ne synthétise pas les systèmes de production procaryotes, et dont on sait qu'elle peut être requise dans l'interaction avec d'autres protéines et ainsi participer directement au rôle d'IrSPI. Les analyses bio-informatiques présentées dans le manuscrit ont permis de prédire 10 sites de phosphorylation potentiels et un site potentiel de N-glycosylation, prédictions qui ont été confrontées au résultat obtenu par spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF qui est présenté ci-dessous (Figure 27). La différence de 990 Da retrouvée entre la masse calculée et la masse observée étaient bien compatible avec la présence des modifications prédites sur la protéine recombinante, validant ainsi le choix de notre système d'expression.

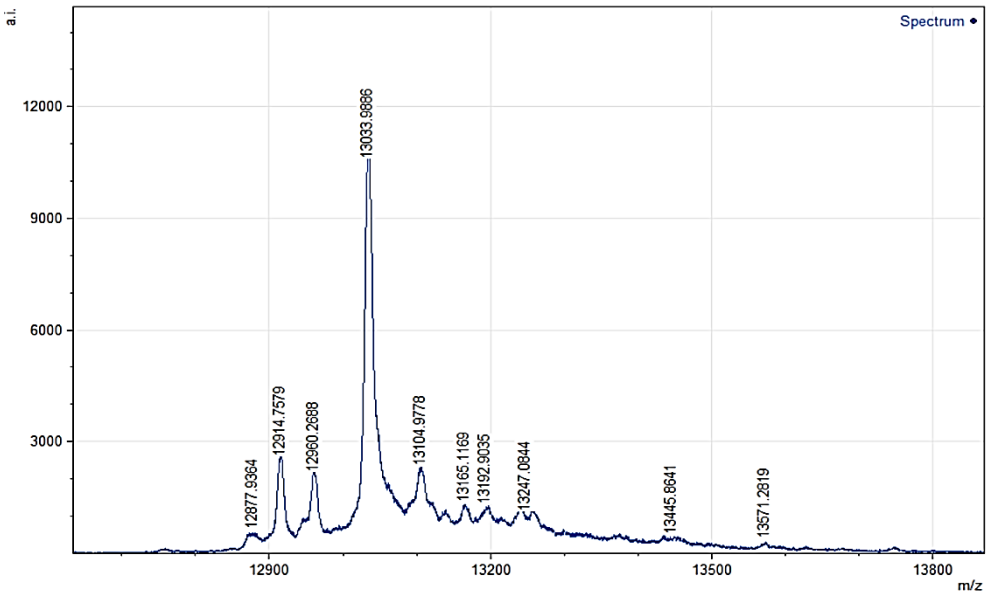


Figure 27: Spectre m/z de la protéine recombinante IrSPI après analyse en MALDI-TOF/TOF.

Par ailleurs, l'analyse des structures secondaires de la protéine recombinante *in silico* via le serveur Bestsel [246] suite à l'étude par dichroïsme circulaire, est présentée ici dans la Figure 28. Les résultats présentés dans la Figure 28 montrent l'absence totale des hélices et un pourcentage de brins β plus de deux fois supérieur par rapport aux prédictions *in silico*. Ces observations montrant clairement un problème de repliement de la protéine recombinante ont justifié une étape de « refolding » avant les tests fonctionnels.

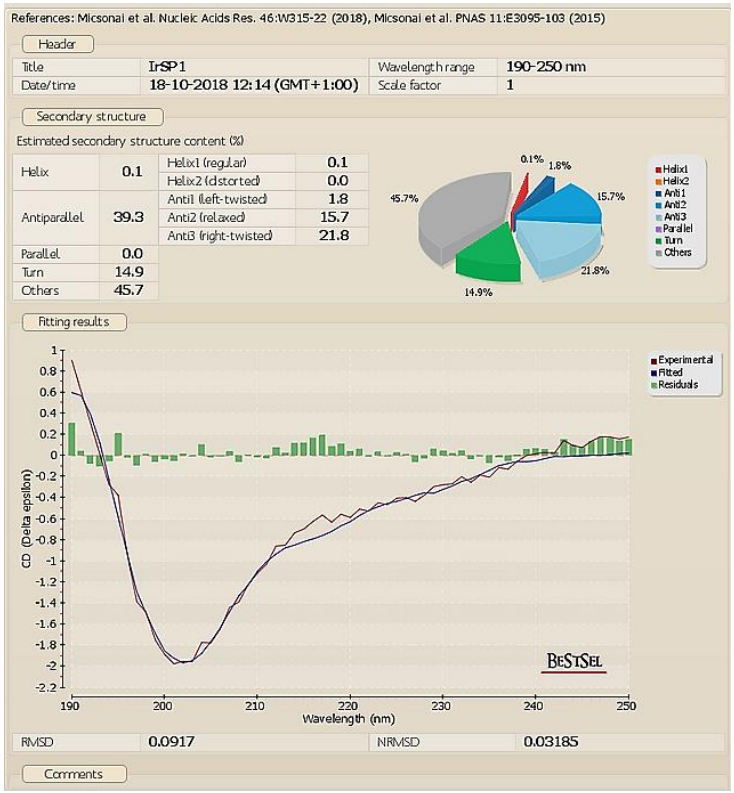


Figure 28: Prédictions des structures secondaires de la protéine recombinante IrSPI avec le serveur Bestsel à partir des données de dichroïsme circulaire obtenues avec une production de protéine IrSPI de concentration 0,075mg/ml.

Enfin, une analyse de la protéine recombinante par vitesse de sédimentation par ultra centrifugation analytique a permis de montrer qu'elle était majoritairement monomérique et globulaire à cause de ses faibles coefficients de Svenberg (1,6S) et ratio de friction (1,2). Pour confirmer ces résultats, une analyse en Dynamic Light Scattering (DLS) a été réalisée mais aucun résultat n'a pu être obtenu, sans doute en raison d'un problème au niveau des protéines en solution, problème souvent lié à la présence d'agrégats. De plus, nous avons également réalisé une analyse de viscosimétrie afin de déterminer le taux d'hydratation de notre protéine ainsi que sa « forme », pour confirmer ou non les résultats obtenus par analyse de la vitesse de sédimentation en ultra centrifugation analytique. Malheureusement, nous n'avons pas obtenu de résultats ici non plus car la protéine a semble-t-il « collé » aux paroies de l'appareil. Tous ces résultats nous montrent que notre protéine recombinante ne semble pas comporter les bonnes structures secondaires telles que prédites *in silico*, qu'elle est globulaire et monomérique mais aurait tendance malgré tout à former des agrégats probablement à cause d'un repliement incomplet. Bien que la présence de ponts disulfures n'ait pas été testée ici, il semblerait peu probable que les 3 ponts disulfures caractéristiques des domaines Kunitz, nécessaires au repliement correct d'IrSPI, soient correctement formés. En effet, l'absence d'hélices α ne permettrait pas le rapprochement adéquat des cystéines impliquées dans un pont disulfure.

Détermination des sérines protéases cibles d'IrSPI

Les résultats présentés dans le manuscrit montrent qu'une fois « refoldée », IrSPI inhibe l'élastase et très faiblement la chymotrypsine. La Figure 29 présente ici les premiers résultats d'inhibition que nous avions obtenus avec la protéine recombinante non « refoldée » sur 3 trois sérines protéases de références que sont la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase. Nos résultats n'ont montré aucune diminution de la vitesse initiale, Vi, en présence de 1µM d'IrSPI comparé au contrôle (absence d'IrSPI) et donc aucune inhibition sur l'activité de ces protéases. Ce résultat a donc validé l'utilisation d'une protéine recombinante « refoldée » grâce à la PDI pour la suite des expérimentations

.

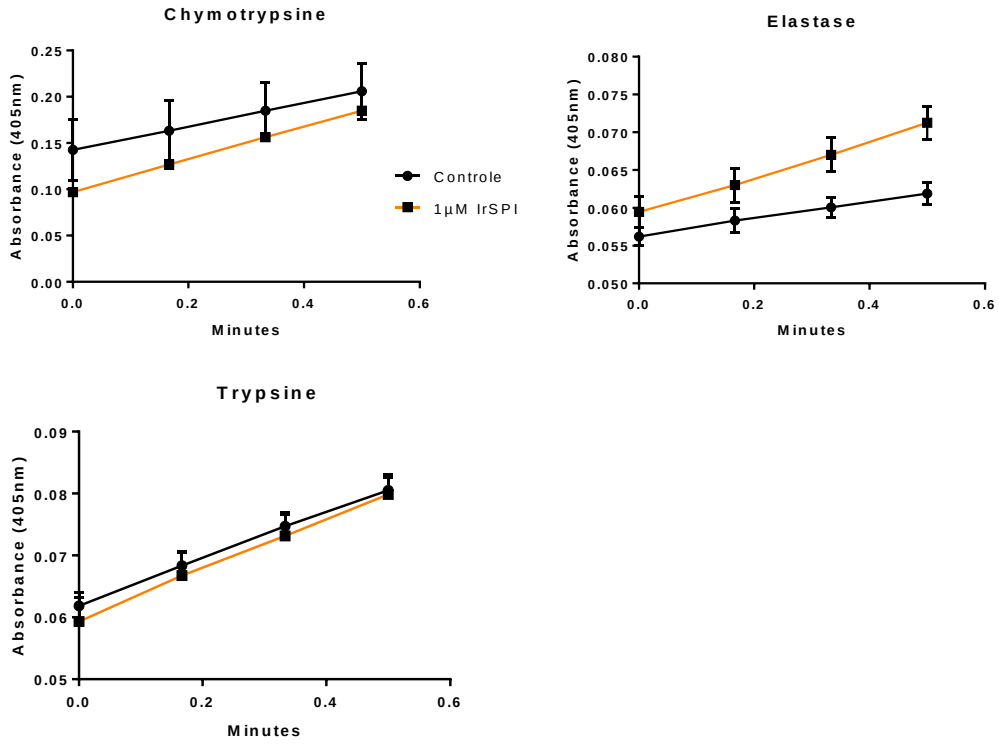


Figure 29: Inhibition de la Chymotrypsine, de la Trypsine et de l'élastase par la protéine IrSPI non refoldée. Expérience d'inhibition réalisée avec 1µM d'IrSPI et respectivement 24,6nM de trypsine, 46,5nM de chymotrypsine et 21,6nM d'élastase, dans un volume final de 100µl. Les résultats présentés sont une moyenne des absorbances à 405nm des duplicats.

Mesure de la cytotoxicité d'IrSPI sur les cellules endothéliales HSkMEC

L'impact de IrSPI sur les propriétés intrinsèques des cellules endothéliales à réaliser des structures angiogéniques a été mesuré tel que décrit dans le manuscrit présenté ci dessus. Cependant afin de s'assurer que les résultats obtenus lors de cette expérience sont exclusivement dus au caractère inhibiteur d'IrSPI et non à sa cytotoxicité, un test de viabilité cellulaire sur des cellules endothéliales HSkMEC en présence d'IrSPI a été réalisé au prélable avec des concentrations croissantes de protéine. Les résultats obtenus, non montrés dans le manuscrit sont présentées ici dans la Figure 30.

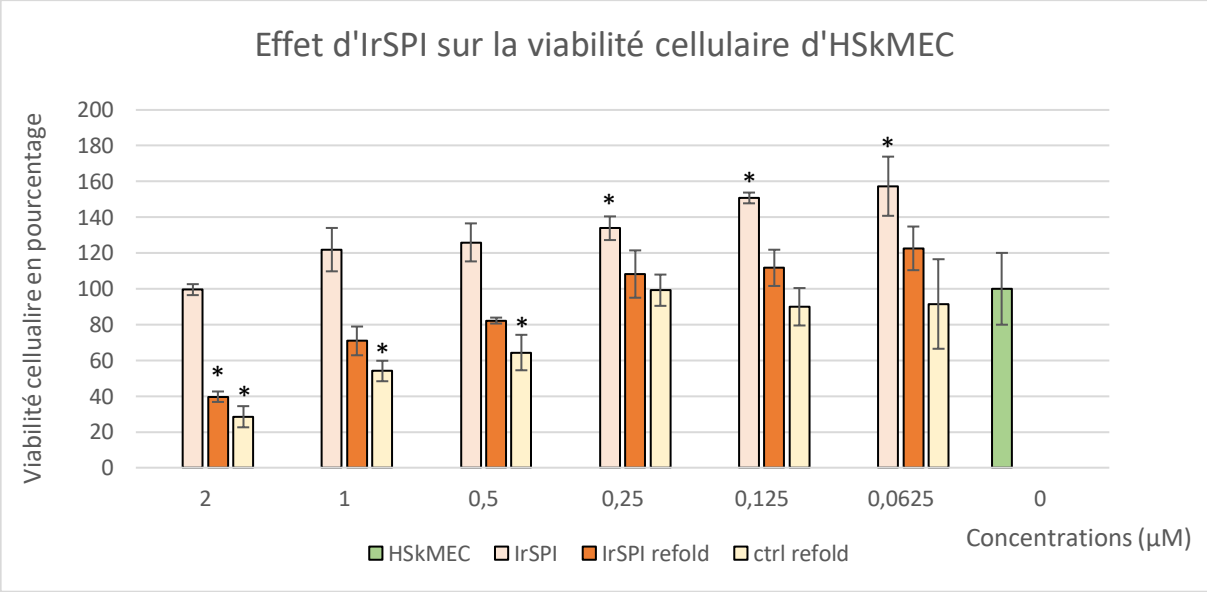


Figure 30: Mesure de la viabilité des cellules endothéliales HsKMEC en présence d'IrSPI. Les cellules HsKMEC ont été cultivées pendant 48h avec plusieurs concentrations d'IrSPI. La viabilité cellulaire est évaluée à l'aide d'une solution d'Alamar Blue et mesurée par fluorescence à 605nm. Les moyennes de triplicats pour chacune des concentrations d'IrSPI testées sont représentées. La significativité des résultats a été évaluée ici par un test student (P<0,05). IrSPI : protéine recombinante non refoldée. IrSPI refold : protéine recombinante refoldée. Ctrl refold : tampon de refolding dans lequel se trouve la protéine refoldée.

Alors qu'après 48h de culture, la protéine IrSPI non « refoldée » n'impacte pas la viabilité des cellules endothéliales HsKMEC, la protéine refoldée (dans son tampon) entraine une forte baisse de la viabilité cellulaire avec à 2µM une viabilité cellulaire qui n'est plus que de 40% (Figure 30). Cet effet semble être dû au tampon de « refolding » car les résultats montrent que, seul, il présente une action cytotoxique dose-dépendante. Les concentrations d'IrSPI de 0,5µM et 1µM n'induisant pas de diminution significative de la viabilité des cellules HsKMEC, elles ont été choisies pour réaliser l'expérience d'angiogenèse sur deux lignées de cellules endothéliales qui est présentée dans le manuscrit.

Mesure de l'impact d'IrSPI sur les macrophages dérivés de moelle osseuse de souris BALB/cJRj

Le manuscrit présente les résultats obtenus sur l'impact d'IrSPI sur la synthèse de cytokines par des macrophages de souris en culture, impact analysé par la technique Luminex. Cette expérience avait été précédée d'une analyse par qRT-PCR en évaluant l'impact de la protéine sur l'expression de certains gènes connus pour être modulés en réponse à la salive de tique [164]. L'expression des gènes codant l'IL12, l'IL-6, l'I-10, le CD86, le TNFα et l'IFNγ a été normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage RPFL19 et comparée entre les macrophages cultivés sans et avec 15µg de IrSPI pendant 24h. Les duplicats biologiques contrôles (sans IrSPI) et traités par IrSPI ont été analysés en triplicats par qRT-PCR. Malheureusement, nous n'avons observé aucun impact répétable sur l'ensemble des échantillons pour aucun des gènes sélectionnés. Ainsi, nous avons décidé dans un second temps, d'analyser les cytokines relarguées par ces macrophages en présence ou non d'IrSPI, après activation par un cocktail composé de LPS et d'IFNγ et grâce à la technique Luminex.

4.2.3.2 Discussion

L'étude de la fonction d'IrSPI dans la biologie de la tique requiert dans un premier l'analyse de l'expression du gène codant cette protéine. Ainsi, nous avons étudié au travers de nombreuses expérimentations le profil d'expression d'*IrSPI*. Les résultats antérieurs avaient démontré, d'une part l'expression du gène *IrSPI* quatre jours après le début du gorgement des tiques et, d'autre part, par ARN interférence, l'implication du produit de ce gène dans ce processus de gorgement [232]. Afin de suivre l'expression de *IrSPI* au cours des différentes phases du gorgement des tiques, nous avons utilisé des tiques pré gorgées à 6 temps différents après leur fixation dans différents organes. Aucune expression n'a pu être détectée, à aucun temps et dans aucun organe, au cours de cette expérimentation. Cette absence de résultat pourrait s'expliquer par la quantité d'ARNs recueillis par organe traité ici individuellement. Il serait donc nécessaire de renouveler cette expérience en travaillant avec un pool de plusieurs organes par temps et non plus en individuel. La détection du gène de référence *rsp4* [247] nous permet en effet de valider l'extraction d'ARN mais celui-ci étant fortement exprimé, il est possible que l'expression d'*IrSPI* soit, elle, trop faible pour être détectable dans les conditions expérimentales de l'expérience. Au-delà de ce problème expérimental, de récentes études suggèrent que des gènes homologues d'*IrSPI* chez *I. ricinus* [240, 241] comme chez *I. scapularis* [242, 243, 248, 249], auraient une expression qui ne serait pas continue et linéaire dans le temps, ce qui pourrait être le cas pour *IrSPI* et expliquer l'absence de détection aux temps analysés. Néanmoins l'hypothèse la plus vraisemblable serait bien un manque de quantité d'ARN d'*IrSPI*, puisque lors de l'expérience présentée dans le manuscrit, l'ARNm d'*IrSPI* a bien été détecté dans des pools d'organes infectés (N=17) de femelles prégorgées pendant 5 jours.

Nous avons ensuite confirmé les prédictions bio-informatiques quant à la présence de N-glycosylations et de phosphorylations sur la protéine recombinante par MALDI-TOF/TOF. Néanmoins, la faible différence de masse observée entre la prédiction d'une N-acétylglucosamine et la masse observée en MALDI-TOF/TOF avec la protéine recombinante laisse supposer une glycosylation de nature différente, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que les cellules d'insectes sont capables de synthétiser de nombreux types de N-glycosylations dont les poids moléculaires varient [250]. Nous avons vérifié par ELISA si IrSPI ne portait pas un α-galactose, sucre produit chez les tiques mais aussi par les cellules de drosophiles ayant permis la synthèse de la protéine recombinante. Les résultats négatifs démontrent que cette N-glycosylation, fréquente chez les tiques, n'est pas présente chez IrSPI. Pour être certains du

type de N-glycosylations portées par IrSPI, il faudrait digérer la protéine recombinante par la PNGase F qui permettra de cliver les sucres en présence et analyser la masse de la protéine recombinante avant et après digestion par spectrométrie de masse de type ESI avec un analyseur comme le QTOF [251], plus précis que le MALDI-TOF/TOF. De manière similaire, la déphosphorylation de la protéine recombinante IrSPI permettrai la détermination du nombre de phosphates en présence. Par ailleurs, les résultats obtenus en ultracentrifugation analytique, en DLS, en viscosimétrie et par dichroïsme circulaire convergent pour établir que la protéine recombinante IrSPI n'est pas correctement repliée, présentant notamment un déficit en hélices α et donc probablement en ponts disulfures qui sont normalement au nombre de trois chez les protéines monolaris (inhibiteurs possédant un seul domaine Kunitz). Les études fonctionnelles sur les protéines, quelles qu'elles soient, utilisent généralement des protéines recombinantes et non natives, et ces résultats montrent l'importance d'analyser la structure de ces protéines recombinantes afin de pouvoir se fier aux résultats obtenus. Ainsi, une analyse confrontant les données *in silico* et les données biophysiques obtenues à partir de protéines recombinantes néosynthétisées devrait être non pas une exception, mais une règle avant toute expérimentation [252].

Nos résultats ont en effet montré que la protéine recombinante non « refoldée » et donc mal repliée ne présentait aucune activité inhibitrice sur des protéases testées quand la forme « refoldée » en présentait une. Cela suggère que l'absence d'hélices dans la structure de la protéine recombinante a empêché la formation des ponts disulfures, ne permettant pas de former la structure du domaine Kunitz, domaine essentiel à l'activité inhibitrice d'IrSPI. Afin de contraindre la protéine recombinante à adopter une conformation équivalente à la protéine native, nous avons forcé son repliement grâce à l'enzyme Protein Disulfide Isomérase (PDI) permettant la formation de ponts disulfures corrects. Conformément à l'acide aminé qui occupe la position P1 du site actif d'IrSPI, une alanine qui confère une sélectivité envers les élastase-like [253], nous retrouvons alors effectivement que l'élastase est la principale sérine protéase inhibée par IrSPI, bien que la chymotrypsine soit elle aussi légèrement inhibée.

L'étude de l'impact d'IrSPI sur les voies homéostatiques de l'hôte a été initiée sur les cellules endothéliales car certains inhibiteurs de sérine protéases modulent négativement l'angiogenèse [94]. Afin d'être certain que les résultats obtenus étaient exclusivement dus au caractère inhibiteur d'IrSPI et non à sa cytotoxicité, un test de viabilité cellulaire des cellules endothéliales HSkMEC en présence d'IrSPI a été réalisé pendant 48h. Bien qu'IrSPI non refoldé n'ait pas entrainé de mortalité cellulaire, le tampon de repliement ainsi que la protéine

refoldée ont montré tous deux un fort impact sur la viabilité cellulaire. Il semble donc que le tampon de repliement contienne des molécules qui soient délétères pour la survie cellulaire. Ce tampon contient en effet une proportion non négligeable de glutathion oxydé et réduit (respectivement 0,2 mM et 2mM) nécessaire à l'activité de la PDI qui a été montré comme étant un facteur pro-apoptotique [254, 255]. Ces aspects pro-apoptotiques du tampon de repliement ont par ailleurs été confirmés par une analyse de l'impact d'IrSPI refoldée ou non et donc en présence ou non de tampon, sur l'induction de l'apoptose sur les cellules HsKMEC. Seul, le tampon de refolding induit plus d'apoptose chez les cellules endothéliales que la protéine IrSPI refoldée, dans ce même tampon. Ce résultat pourrait s'expliquer par une concentration plus élevée de glutathion réduit dans tampon quand l'étape de refolding réduit cette concentration.

Les marquarges immunohistochimiques réalisés sur des coupes de tiques afin de repérer la présence d'IrSPI n'ont pas donné de résultat positif. Ceci pourrait s'expliquer par un manque de spécificité des anticorps primaires utilisés, ou par un problème de mise au point expérimentale (dilutions, temps d'incubations, …). De plus, bien que de l'ARNm d'IrSPI ait été détecté chez des femelles prégorgées pendant 5 jours, une expression de la protéine au même temps n'est pas systématique. D'autres essais doivent donc être réalisés à d'autres temps en optimisant les conditions expérimentales.

4.2.4 Conclusions et perspectives

La compréhension des interactions entre les tiques, leurs hôtes et les agents pathogènes qu'elles transmettent est l'une des clés dans le développement de méthodes de lutte efficaces, durables et respectant l'environnement à la fois contre les tiques et les agents pathogènes qu'elles transmettent. Dans ce chapitre II qui s'attache à identifier les fonctions d'IrSPI, nous avons approfondi le rôle que joue IrSPI dans la biologie de la tique grâce notamment à la synthèse d'une protéine recombinante. Malgré les précautions prises lors du choix du système de production afin d'être au plus près de ses conditions de synthèse *in vivo*, des analyses bio-physiques ont montré le mauvais repliement de la protéine recombinante. Or, dans le cas des inhibiteurs de type Kunitz, le repliement de la protéine est essentiel pour que le site actif soit correctement formé pour inhiber la sérine protéase cible. Ces analyses et les résultats observés après « refolding » de la protéine démontrent l'importance de contrôler les structures d'une protéine recombinante afin d'être certain des résultats observés par la suite.

Les études antérieures ont montré la surexpression du gène *IrSPI* en réponse à l'infection de la tique par *B. henselae* après 4 jours de gorgement et révélé son implication dans le gorgement et dans la transmission de cette bactérie par la tique *I. ricinus*. L'expression de *IrSPI* lors du gorgement des tiques a ici été confirmée chez les nymphes non infectées en fin de gorgement à J5. De plus, l'expression de ce gène n'a pas été détectée chez les stades non gorgés, confirmant que l'expression de ce gène est induite par le gorgement. Malheureusement, les résultats négatifs, sans doute liés à un problème de quantité d'ARNs, obtenus lors de l'étude de la cinétique d'expression du gène au cours du gorgement chez les tiques femelles ne nous a pas permis d'approfondir cette analyse. La surexpression d'*IrSPI* lors de l'infection par la bactérie *B. henselae* initialement identifiée dans les glandes salivaires, a également été retrouvé ici dans l'intestin et les ovaires. De plus, l'expression d'*IrSPI* détectée dans les glandes salivaires, l'intestin, les ovaires et la carcasse d'un lot de femelles pré-gorgées infectées par *B. venatorum et R. helvetica* démontre l'importance probable de ce gène dans l'infection par des agents pathogènes transmis. En revanche, les résultats obtenus lors de l'infection de la tique par une bactérie non transmise, *E. coli,* ont montré qu'*IrSPI* n'intervenait pas dans les réactions immunes vis-à-vis de cette bactérie. Il serait à présent intéressant d'étudier l'expression d'*IrSPI* dans d'autres conditions d'infection avec des agents pathogènes transmis par *I. ricinus* tels que *Borrelia* sp., *Anaplasma* sp., les virus de l'encéphalite à tique ou Louping Ill, ou des *Babesia* sp.. Une recherche approfondie de la localisation de cette protéine dans les organes de la tique

pourrait ouvrir de nouvelles pistes quant à son rôle mais les marquages immunohistochimiques réalisés nécessitent encore des mises au point.

La présence d'un peptide signal et la localisation de l'ARNm d'*IrSPI* dans les acini de type II soutiennent l'hypothèse d'une sécrétion salivaire lors du repas sanguin, hypothèse vérifiée par la présence d'anticorps anti-IrSPI chez l'hôte vertébré. Ainsi, l'implication d'IrSPI dans le gorgement des tiques, validée par ARNi [232], pourrait être due à une action sur les réponses de l'hôte vertébré à la piqûre en raison de sa présence dans la salive injectée au cours de ce processus. La grande majorité des inhibiteurs de sérine protéases de tique identifiés à ce jour ont un impact sur la coagulation sanguine afin de permettre à la tique de prélever son repas sanguin dans les meilleurs conditions possibles [94]. Nos résultats ont montré que ce n'était pas le cas d'IrSPI en ce qui concerne la voie d'activation extrinsèque, voie activée après un traumatisme tissulaire, ou la fibrinolyse. Pour être certain de l'absence de propriétés anticoagulantes d'IrSPI, une évaluation de son rôle sur la voie intrinsèque et sur l'agrégation plaquettaire est à présent nécessaire pour écarter définitivement IrSPI des molécules de tiques anticoagulantes. Nos résultats montrent une absence d'action directe d'IrSPI sur l'angiogenèse et l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales. Néanmoins, une action indirecte n'est pas à écarter car en réponse à un stimulus, ces cellules sont capables d'une grande plasticité, allant jusqu'à participer aux défenses immunitaires en exprimant à leur surface les récepteurs de type CMHI et CMHII [256]. IrSPI possède une activité inhibitrice vis à vis de l'élastase, et pourrait donc agir dans la modulation de l'inflammation chez l'hôte vertébré en réponse à la piqûre de tique. La faible inhibition retrouvée sur la chymotrypsine pourrait venir renforcer ce rôle. Afin de préciser le rôle d'IrSPI dans la répression potentielle de l'inflammation, l'étude de son impact sur d'autres élastase-like telle que l'élastase de Neutrophile, la tryptase, la chymase, la cathepsine G, la matryptase, serait intéressant.

Nous avons aussi montré qu'IrSPI module négativement et significativement la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ sous stimulation, lui conférant ainsi un rôle immunomodulateur. En revanche, l'augmentation de la prolifération des lymphocytes B en absence de stimulation mérite des investigations plus précises pour comprendre les implications de cette action. Pour disséquer plus finement comment opère IrSPI sur la prolifération cellulaire essentielle dans l'activation et la réponse du système immunitaire, il serait maintenant nécessaire d'évaluer son impact sur des populations homogènes de cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T et lymphocytes B).

Cela permettra de savoir par exemple si l'action observée sur les lymphocytes est directe ou médiée par une population cellulaire contenue dans la population de splénocytes analysée.

En démontrant l'impact négatif de IrSPI sur la production des cytokines pro-inflammatoires par les splénocytes, nous avons confirmé ce rôle immunomodulateur. Ces résultats montrent en effet qu'IrSPI réprime l'activation du système immunitaire, le recrutement cellulaire au site de piqûre, et pourrait moduler indirectement la douleur ainsi que l'angiogenèse par la répression de cytokines et de chémokines impliquées dans ces voies de signalisation. Seule la production de l'IL-2 par les splénocytes a été significativement augmentée par IrSPI. Ce résultat n'est pas encore explicable en l'état actuel de nos connaissances.

Enfin, l'impact d'IrSPI sur des cellules présentatrices d'antigènes telles que les macrophages a montré que, en sa présence, seule l'IL-5 était significativement diminuée chez des macrophages activés. Cette cytokine étant un pilier de l'activation des éosinophiles, ainsi que de la croissance et de la production d'anticorps par les lymphocytes B, l'inhibition observée ici sur ces cellules présentatrices d'antigènes, contribue à renforcer les propriétés immuno-régulatrices d'IrSPI. De plus, l'IL-5 étant impliquée dans la réponse des lymphocytes T et B à l'IL-2 qui favorise la différentiation des lymphocytes en lymphocytes T cytotoxiques, sa répression par IrSPI est en faveur d'une orientation des réponses immunitaires vers la voie Th2 plutôt que Th1.

L'ensemble de ces résultats, qui démontre un rôle important d'IrSPI dans la modulation des réponses immunes de l'hôte vertébré, mérite à présent des investigations plus approfondies pour comprendre les mécanismes impliqués et ouvre de réelles perspectives dans la compréhension des interactions entre la tique et son hôte.

Chapitre III : Etude des interactions protéiques d'IrSPI par une approche de criblage double hydride en système levure

4.3.1 Introduction

La mise en évidence, au chapitre précédent, de l'expression d'*IrSPI* dans plusieurs organes de la tique *I. ricinus* (les glandes salivaires, l'intestin, les ovaires, la carcasse, le synganglion), qu'elle soit ou non infectée par un agent pathogène, démontre des rôles importants et probablement multiples chez cet arthropode. La sur-expression d'*IrSPI* sous l'influence du repas sanguin et lors d'une infection par un agent pathogène laisse supposer son implication dans ces deux processus [232] (voir Chapitre 2). Si nos résultats ont donc permis de démontrer un rôle d'IrSPI sur les réponses immunes de l'hôte au cours du gorgement, nous n'avons à ce jour aucune indication du rôle d'IrSPI sur la physiologie de la tique elle-même. Un certain nombre d'exemples rapportent l'action d'inhibiteurs de serine protéases de tiques à la fois dans la coagulation de l'hémolymphe, la digestion du repas sanguin, l'oviposition, ou encore le système immunitaire des tiques [94]. Seuls les résultats obtenus suite à une infection par *E. coli* nous ont permis de démontrer la non implication d'IrSPI dans les réponses immunes de *I. ricinus* vis-à-vis d'une infection par cette bactérie.

Il est fort probable que l'ensemble des actions d'IrSPI à la fois chez la tique et chez l'hôte vertébré s'organise au travers d'interactions avec d'autres protéines. Ainsi, la découverte de molécules interagissant directement avec IrSPI (interacteurs) devrait apporter des pistes notables quant à l'élucidation de ses fonctions. Pour découvrir ces potentiels interacteurs protéiques nous avons établi une collaboration avec l'UMR de virologie du site de Maisons-Alfort (UMR 1161) qui possède des banques d'ADNc d'hôtes vertébrés (bovin et humain) et de tique *I. ricinus*. Les banques d'ADNc ont été construites à partir de lignées de cellules A549 pulmonaires humaines, de cellules MDBK de rein bovin et de trois souches de cellules embryonnaires de tiques.

Grace à ces banques, nous avons cherché à identifier les interacteurs protéiques d'IrSPI à la fois chez les hôtes vertébrés et chez la tique *I. ricinus* en utilisant une approche par criblage double hybride en système levure.

4.3.2 Matériels et méthodes

4.3.2.1 Principe général de l'expérience de double hybride en système levure

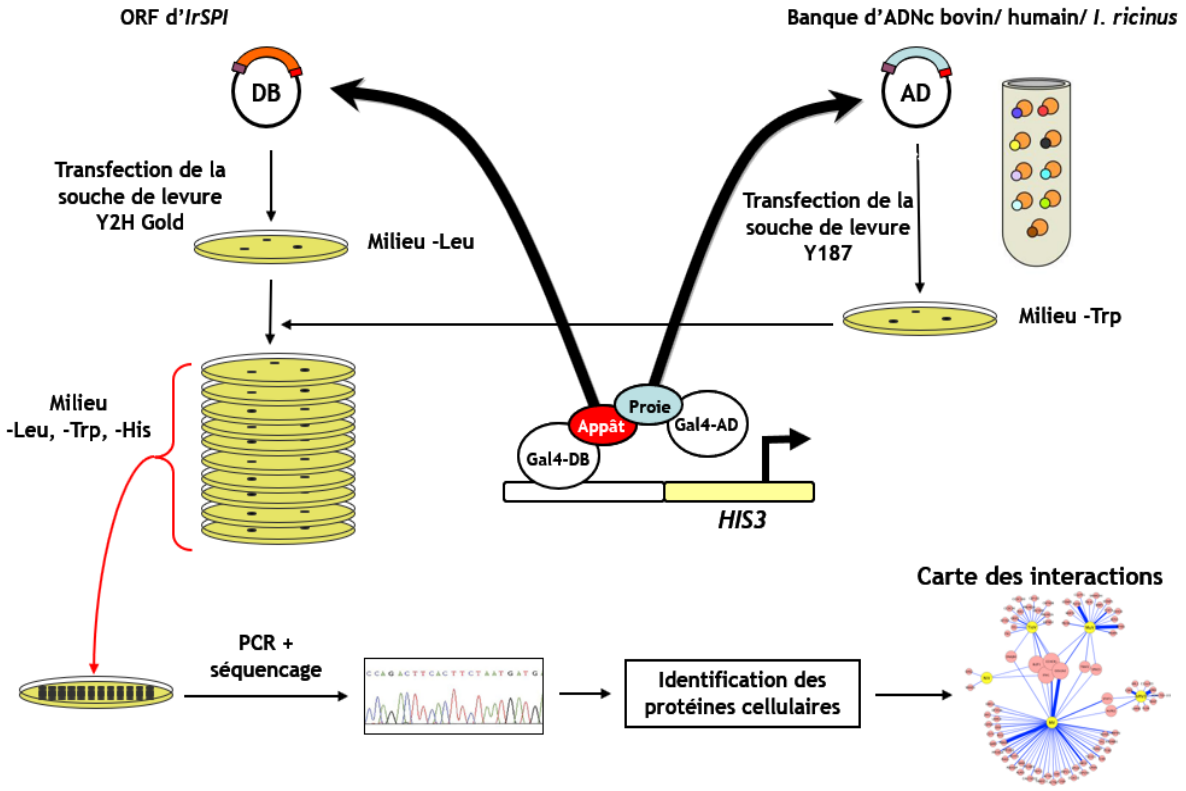


Figure 31: Principe général de l'expérience de double hybride en système levure. D'après G. Caignard, 2010 [257].

Afin d'identifier la nature des interacteurs protéiques de IrSPI chez l'hôte vertébré comme chez la tique, une approche de double hybride en système levure a été utilisée, approche qui permet d'identifier des interactions protéine-protéine (Figure 31). La mise en place de ce système de criblage à haut débit fait suite à des travaux sur les facteurs de transcription eucaryotes, qui pour certains d'entre eux, sont composés de deux domaines : un domaine de liaison à l'ADN (DB) et un domaine d'activation (AD), domaines dont l'interaction est requise pour permettre la transcription du gène dont ils entrainent l'expression. Cette propriété « bi-domaine » a été utilisée dans l'élaboration de la technique de criblage en double hybride en système levure [258]. Ainsi, afin d'identifier des interactions protéiques, le domaine DB du facteur de transcription GAL4 est fusionné à l'ADNc codant la protéine d'intérêt (ici IrSPI) et sert d'appât, alors que le domaine AD est fusionné à l'ADNc de la banque à cribler qui est considéré comme une proie. Ces deux plasmides sont respectivement introduits dans deux souches de levures de types sexuels opposés, Y2H gold et Y187, souches qui par conjugaison permettront l'interaction

entre la protéine appât et la protéine proie, conduisant à l'activation du facteur de transcription GAL4, et à l'expression du gène rapporteur *HIS3* codant l'enzyme HIS3 indispensable à la croissance des levures sur un milieu dépourvu d'histidine. Ainsi ne pousseront sur un milieu pauvre en histidine que les levures qui ont conjuguée et qui sont donc autotrophes pour l'histidine. Néanmoins, les levures exprimant, après transformation, le gène *HIS3* de manière basale, il est nécessaire pour réaliser cette sélection, d'inhiber cette expression basale par l'ajout de 3-AT (3-amino-1,2,4- triazole), un inhibiteur compétitif de l'enzyme HIS3 [259]. Ce système utilisant ces levures permet ainsi de sélectionner des interactions « fortes » entre deux partenaires protéiques, partenaires dont seul l'un est connu. Afin de déterminer l'autre acteur, les levures sélectionnées sont soumises à une amplification par PCR utilisant des amorces complémentaires des plasmides portant les ADNc des proies afin de les séquencer et les identifier.

4.3.2.3 Banques d'ADNc

Les banques d'ADNc d'origine vertébrée ont été construites à partir de lignées de cellules A549 pulmonaires humaines, et de cellules MDBK de rein bovin (*Madin-Darby bovine kidney*). Concernant la banque d'ADNc de cellules de tiques *I. ricinus*, il s'agit d'une banque hybride entre trois souches de cellules embryonnaires, les cellules IRE/CTMV20, IRE/CTMV19 et IRE/CTMV11. La construction de ces banques a été réalisée par la société Life Technologies® à partir d'ADNc issus d'ARNs isolés de culots cellulaires et par clonage dans le vecteur pDEST22 contenant le domaine AD du facteur de transcription GAL4.

4.3.2.4 Constructions plasmidiques

Principe général du système de clonage Gateway

Le système de clonage Gateway développé par Invitrogen® est basé sur la propriété des bactériophages d'utiliser des séquences particulières de génomes bactériens pour y insérer du matériel génétique par recombinaison homologue *in vitro* (Figure 32) [260]. Ce système permet le transfert efficace d'ORF entre différents plasmides tout en maintenant la phase de lecture et l'intégrité de l'ORF. L'amplification PCR avec des amorces Gateway spécifiques (att**B**1 et att**B**2) permet dans un premier temps de rajouter aux extrémités du fragment d'intérêt des séquences de recombinaison homologues dites « Gateway att ». L'enzyme BP clonase catalyse ensuite la réaction d'insertion du fragment dans un vecteur dit d'entrée par recombinaison avec les sites spécifiques att**P** du vecteur donneur (réaction de **BP**). Une fois le fragment d'ADN inséré, ces nouveaux clones, nommés clones d'entrée, possèdent des séquences de

recombinaison **L**, qui permettront à nouveau le transfert de ce fragment d'ADN vers un vecteur destination qui contient dans sa séquence les séquences de recombinaison **R** (réaction **LR)**. Ce nouveau transfert par recombinaison est catalysé par l'enzyme LR clonase.

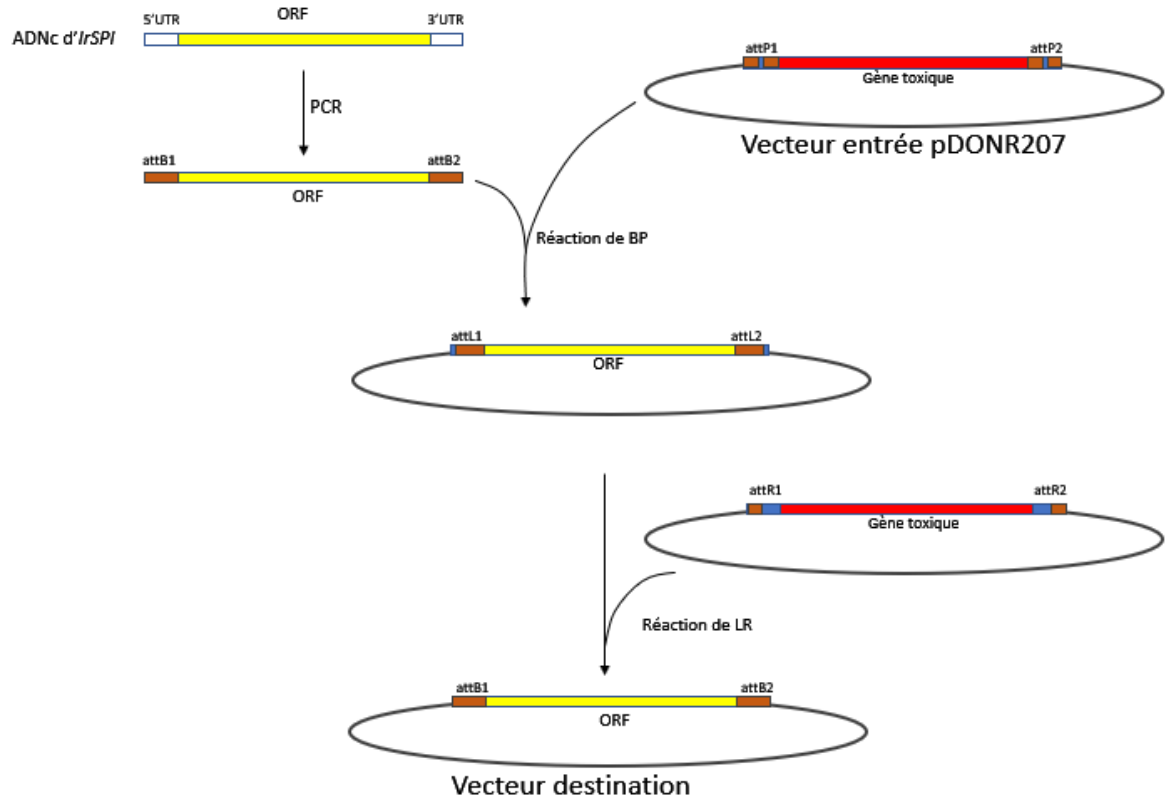


Figure 32 : Principe du système de clonage Gateway. L'ORF d'IrSPI avec ou sans la séquence du peptide signal est amplifiée par PCR grâce aux amorces spécifiques du système de clonage Gateway qui permet d'insérer par recombinaison homologue ces constructions dans le vecteur d'entrée, le pDONR 207. La présence de séquence de recombinaisons homologues permet ensuite de transférer l'ORF d'IrSPI dans un vecteur destination spécifique pour l'utilisation en double hybride dans un système levure, ici le pPC97.

Clonage de IrSPI en système Gateway

A partir du plasmide pET28 contenant la séquence de l'ADNc d'*IrSPI* à l'exception du codon stop codé par le triplet « TAA », des amorces nucléotidiques de type Gateway ont été établies afin d'amplifier la totalité de la séquence de l'ADNc, ou uniquement la partie codant la séquence de la protéine mature (sans peptide signal), afin de maximiser les possibilités d'interaction. L'amplification PCR avec ces amorces Gateway sens incluant le peptide signal (5'-ggggacaactttgtacaaaaaagttggcatgAAGGCAACCCTCGTAGCC-3'), sans peptide signal (5'-ggggacaactttgtacaaaaaagttggcatgCGGCT*G*ACT*G*AGACACAATGC-3'), et l'amorce anti sens (5'-ggggacaactttgtacaagaaagttggttaAAATGTCCCGTCGGACACC-3')

permettra l'insertion dans le vecteur d'entrée par la réaction BP. La réaction de PCR a été réalisée avec deux enzymes DNA taq polymérases différentes : l'ExTaq (Takara) et la Taq Phusion (New England Biolabs), en suivant le programme PCR suivant : une phase de dénaturation initiale à 95°C pendant 30 secondes, suivi de 35 cycles avec une dénaturation à 98° pendant 12 secondes, une hybridation à 60°C pendant 10 secondes, puis une étape d'élongation à 72°C pendant 20 secondes, et enfin 5 minutes d'élongation à 72°C. La taille des amplicons a été vérifiée par migration sur gel d'agarose à 2%.

La ligation des fragments amplifiés dans le vecteur d'entrée est réalisée à température ambiante pendant une nuit, dans un volume total de 10 µl, avec 500 ng de vecteur, 5 µl de produits de PCR purifiés grâce au kit gel and PCR clean up (Macherey Nagel), 2 µl d'eau et 2 µl de BP clonase. Des bactéries compétentes DH5α (Invitrogen®) sont alors transformées par ces vecteurs par choc thermique à 42°C pendant 30 secondes, puis incubées sur glace pendant 30 minutes. Ces bactéries ont ensuite été incubées dans 500 µl de milieu riche SOC (trypton 2%, extrait de levure 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, et glucose 20 mM) pendant 1h à 37°C. L'ensemble de la suspension bactérienne a ensuite été mis en culture à 37°C pendant une nuit sur une gélose de LB agar contenant 10 µg/ml de gentamycine pour sélectionner uniquement les bactéries qui ont été transformées par les vecteurs leur conférant une résistance à cet antibiotique. Les clones sont alors repiqués dans du milieu LB liquide avec 10 µg/ml de gentamycine dans le but d'en extraire l'ADN plasmidique à l'aide du kit Nucleo Spin plasmid (Macherey-Nagel), et de vérifier par séquençage la séquence insérée dans le plasmide.

Les clones dont les séquences ont été validées sont utilisés pour l'étape suivante qui consiste à introduire, lors de la réaction de LR, l'ORF d'*IrSPI* (avec ou sans peptide signal) dans le vecteur destination, le pPC97 qui contient une cassette de résistance à l'ampicilline. La réaction LR suit le même protocole que celui précédemment utilisé pour la réaction BP, à la différence que les bactéries NEB 5α (C2987) (New Englands Biolabs) transformées par ces constructions plasmidiques sont mises en culture sur des boîtes de Pétri avec du LB agar contenant 50 µg/ml d'ampicilline. Les clones obtenus sont tout d'abord cultivés dans du LB liquide contenant 50 µg/ml d'ampicilline, puis des extractions plasmidiques sont réalisées afin de transformer les levures.

4.3.2.5 Transformation des levures

Les levures Y2H Gold (*Matchmaker™ Gold Yeast Two-hybrid System*) sont cultivées dans du milieu liquide YPD (Yeast Peptone Dextrose) à 30°C pendant 24h et utilisées en phase exponentielle de croissance (DO comprise entre 1 et 2 à 600nm) pour leur transformation par les plasmides contenant la séquence d'*IrSPI*. Tous les milieux utilisés ici ont été préparés selon Vidalain et al. [259]. Deux lavages successifs à l'eau, puis dans une solution de TE/LiAC (Tris-HCl EDTA 1X pH 8, acétate de lithium 100 mM) ont alors été réalisés. La réaction de transformation par le vecteur pPC97 contenant l'ORF d'*IrSPI* (avec ou sans peptide signal) fusionné au domaine DB du facteur de transcription GAL4, et le gène *LEU2* permettant aux levures qui l'ont intégré de pousser sur un milieu synthétique dépourvu de Leucine (-L), est réalisée par choc thermique. Les levures sont incubées pendant 45 min à 30°C dans le TE/LiAC avec 250 ng de plasmide pPC97, 2µl d'ADN de sperme de saumon (préalablement dénaturé pendant 10 minutes à 100°C) et une solution de polyéthylène glycol (PEG) (PEG 35%, acétate de lithium 100 mM, Tris-HCl EDTA 1X pH 8). Un choc thermique à 42°C est alors réalisé et permet la transformation des levures par pPC97. Enfin, afin d'éliminer le PEG, une centrifugation a été effectuée, puis les levures ont été resuspendues dans de l'eau et étalées sur un milieu synthétique -L.

Les levures Y187 sont elles aussi cultivées dans du milieu liquide YPD et ont été transformées par les plasmides pDEST22 contenaient les banques d'ADNc humaine, bovine et de *I. ricinus*. Cette transformation a été réalisée suivant le même protocole que pour les levures Y2H Gold. Le plasmide pDEST22 contenant la séquence du gène *TRP1* qui code le tryptophane, séquence qui permettra la sélection des levures ayant intégré ce plasmide sur un milieu synthétique dépourvus de tryptophane (-W).

4.3.2.6 Criblage double hybride

La culture de la souche de levure Y2H Gold contenant la séquence codant la protéine IrSPI fusionnée au facteur DB et constituant l'appât, est relancée la veille du criblage dans du milieu YPD. La première étape du criblage est la conjugaison des levures Y2H Gold et Y187 pendant 4h30 à 30°C. Après lavage, la suspension de levures a été étalée sur 10 géloses contenant la concentration adéquate de 3-AT pour inhiber l'expression basale du gène histidine, et dépourvues des acides aminés L, W, et H, permettant ainsi de sélectionner les levures

conjuguées ayant intégré les plasmides *ad hoc*. Un étalement sur gélose - L et -W a également été réalisé afin d'évaluer le nombre de levures obtenues lors de la conjugaison, reflétant le nombre d'interactions testées au cours de cette expérience. Après 5 jours de culture à 30°C, ces levures ayant poussé sur les géloses -L, -W, -H, avec 3-AT ont été repiquées à raison de deux fois par semaine pendant trois semaines afin de sélectionner les interactions fortes qui existent entre les protéines testées. Après ces trois semaines de repiquage, la séquence des proies identifiées est amplifiée par PCR avec des amorces « universelles » encadrant le site d'insertion du plasmide pDEST22, puis séquencée (Eurofins).

4.3.2.7 Analyses des résultats

Les séquences obtenues ont alors été comparées automatiquement à des séquences de références spécifiques pour la banque considérée grâce à un algorithme développé par l'unité de Génétique Virale et Biosécurité de l'ANSES de Ploufragan. La banque de séquences de référence utilisée ici pour comparer les séquences obtenues après le criblage de la banque de tique *I. ricinus*, est issue de la tique *I. scapularis*, seule espèce de tique dont le génome est séquencé. A la suite de ces résultats nous avons arbitrairement et dans un premier temps, considéré que si un interacteur était identifié au moins 5 fois, l'interaction était comptée comme positive. Dans le cas où le nombre d'itérations était inférieur, les interactions seront traitées dans un second temps.

4.3.3 Résultats

4.3.3.1 Constructions plasmidiques

Dans le cas d'*IrSPI* qui code une protéine salivaire sécrétée chez l'hôte vertébré lors du repas sanguin, nous avons fait le choix de tester en double-hybride la séquence codant la protéine immature (avec peptide signal, IrSPI+sp) et mature (sans peptide signal, IrSPI-sp). Nous avons donc utilisé deux amorces sens et une amorce antisens pour produire par PCR les deux fragments d'ADN correspondants.

L'amplification par PCR de l'ADNc d'*IrSPI* à l'aide des amorces spécifiques Gateway a été validée sur gel d'agarose (Figure 33), permettant de visualiser des amplicons de la taille correspondant à *IrSPI* avec (340 pb) et sans peptide signal (283 pb). Les résultats montrent une plus forte intensité des bandes dans le cas d'une amplification avec la Taq polymérase Phusion en comparaison de l'ExTaq, ce sont donc ces produits PCR qui ont été sélectionnés pour la suite du clonage.

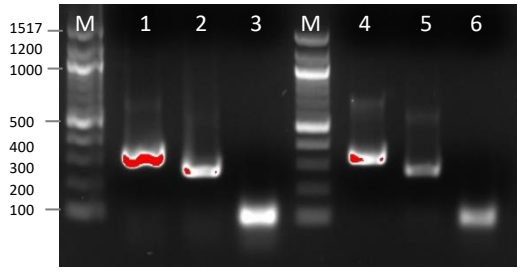


*Figure 33: Produits d'amplification par PCR à partir du plasmide pET28 contenant l'ADNc d'*IrSPI *avec les amorces spécifiques Gateway. Les puits 1,2,3 et 4,5,6 sont respectivement des produits de PCR réalisées à l'aide de la Taq Phusion (New England Biolabs) et de l'Extaq (Takara)Les puits 1 et 4 correspondent à une amplification de la séquence complète de l'ADNc d'IrSPI (avec le peptide signal), et les puits 2 et 5 correspondent à une amplification de la séquence de l'ADNc sans le peptide signal. Les puits 3 et 6 correspondent aux témoins négatifs sans ADN. M : marqueur de poids moléculaire.*

4.3.3.2 Résultats de la transformtion des bactéries DH5α avec le vecteur pDONR207.

Après l'insertion des deux fragments contenant l'ADNc avec ou sans le peptide signal d'*IrSPI* dans le plasmide pDONR207, ces constructions plasmidiques ont été introduites par choc thermique dans des bactéries DH5α. Pour ces deux expériences de clonage, nous avons obtenu un nombre de colonies similaire, et avons repiqué 6 colonies pour chaque construction pour vérifier que la séquence insérée correspondait à celle attendue. Sur les 12 colonies testées, seulement 6 ont pu être séquencées (3 avec la séquence contenant le peptide signal et 3 contenant la séquence sans peptide signal). Les résultats du séquençage ont montré une

séquence identique à celle d'*IrSPI* pour les clones sans peptide signal et que les séquences contenant le peptide signal, toutes identiques entre elles, présentaient des mutations. Il s'agit d'inversions aux positions 171 et 176, d'une adénine au lieu d'une cytosine et d'une cytosine à la place d'une guanine (Figure 34). Néanmoins, ces inversions, silencieuses, ne modifient pas les acides aminés codés (CGG et AGG codent tous deux pour une arginine, de même CTG et CTC codent pour une Leucine). Un clone avec peptide signal et un clone sans peptide signal ont donc été sélectionnés pour la suite de l'expérience.

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       110        120        130        140        150
Gène IrSPI      ---------- ---ATGAAGG CAACCCTCGT AGCCATTTGC TTCTTCGCTG
IrSPI-sp-1      CAAAAAAGTT GGCATGAAGG CAACCCTCGT AGCCATTTGC TTCTTCGCTG
IrSPI-sp-2      CAAAAAAGTT GGCATGAAGG CAACCCTCGT AGCCATTTGC TTCTTCGCTG
IrSPI-sp-4      CAAAAAAGTT GGCATGAAGG CAACCCTCGT AGCCATTTGC TTCTTCGCTG
Consensus                  ******* ********** ********** **********


                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      160        170        180        190        200
Gène IrSPI      CTGTCTCGTA CTCCATGGGG CGGCTGACTG AGACACAATG CAGATTTCCT
IrSPI-sp-1      CTGTCTCGTA CTCCATGGGG AGGCTCACTG AGACACAATG CAGATTTCCT
IrSPI-sp-2      CTGTCTCGTA CTCCATGGGG AGGCTCACTG AGACACAATG CAGATTTCCT
IrSPI-sp-4      CTGTCTCGTA CTCCATGGGG AGGCTCACTG AGACACAATG CAGATTTCCT
Consensus       ********** ********** M****S**** ********** **********
```

Figure 34: Alignement des séquences obtenues après séquençage des clones DH5α positifs ayant été transformés par le plasmide contenant la séquence d'IrSPI avec son peptide signal (IrSPI-sp-1, IrSPI-sp-2, IrSPI-sp-4) sur la séquence de IrSPI (gène IrSPI).

4.3.3.3 Réaction de LR

Les ADN plasmidiques des clones choisis ont été extraits afin de les insérer dans le vecteur destination, le pPC97, utilisé ensuite pour transformer les bactéries NEB 5α. Nous avons obtenu un nombre équivalent de clones pour chacune des constructions. Afin d'augmenter la quantité de matériel nécessaire pour la transformation des levures, 10 colonies de chaque expérience ont été cultivées séparément en milieu LB liquide. Après extraction des plasmides, les quantités d'ADN ont été évaluées : le plasmide pPC97-IrSPI-sp-1 avait une concentration de 968 ng/µl, alors que le plasmide pPC97-IrSPI-2 avait une concentration de 810 ng/µl.

4.3.3.4 Test d'auto-induction de l'HIS3

Une fois les levures transformées, un test d'auto activation du gène *HIS3* est réalisé afin de connaitre la dose de drogue 3-AT à appliquer aux cultures sur gélose lors du criblage.

Dans un premier temps la croissance des levures Y2H Gold transformées est observée en absence de l'antagoniste 3-AT du gène *HIS3*. Dans cette condition, on observe que les colonies de levures Y2H Gold transformées avec la séquence de l'ORF d'*IrSPI* contenant le peptide signal ou non poussent de manière identique, démontrant l'absence de toxicité de la protéine synthétisée pour les levures. Lorsque 5 mM de 3-AT sont appliqués, plus aucune colonie n'est observée (Figure 35). Les criblages en double hybride ont donc été réalisés avec 5 mM de 3-AT sur des géloses -L-W-H.

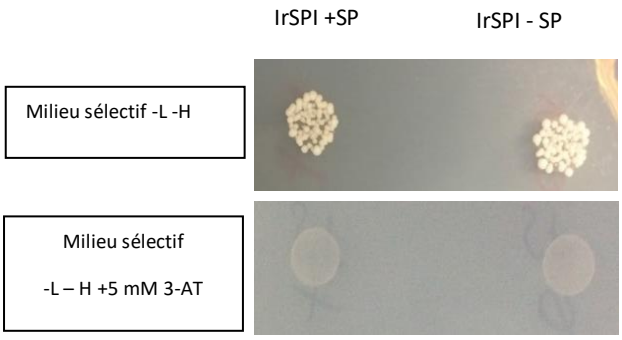


Figure 35: levures Y2H Gold transformées avec les plasmides pPC97 contenant les séquences avec et sans peptide signal de l'ORF codant IrSPI *en culture sur milieu avec et sans 3-AT.*

4.3.3.5 Criblage double hybride

Dans un premier temps, l'évaluation de l'efficacité du criblage a été effectuée en comptant, sur une gélose dépourvue de leucine et de tryptophane, le nombre de colonies de levure ayant poussé. Une moyenne de 750 diploïdes par boite a été estimée, ce qui représente un total de 75 millions d'interactions testées par banque au cours du criblage. La diversité des banques étant estimée à 3 millions d'ADNc, chaque interaction appât-proie est donc testée approximativement 25 fois au cours du criblage.

Une fois les conditions expérimentales optimisées, le criblage des banques d'ADNc bovine, humaine et de tique *I. ricinus* par IrSPI sans le peptide signal (IrSPI-sp) et IrSPI avec peptide signal (IrSPI+sp) a été réalisé. Après 5 jours de culture, seuls les clones avec IrSPI et son peptide signal avaient poussé, nous n'avons obtenu aucun clone pour le criblage d'IrSPI sans peptide

signal avec aucune des trois banques. Après 3 semaines de repiquage, nous avons obtenu, pour les banques bovine et humaine un total de 100 clones et 300 clones pour le criblage de la banque de tique, tous répartis de façon homogène par boîte. Cent clones par banque ont été testés par PCR afin de vérifier la présence d'un insert dans le vecteur « proie ». Les Figures 36-38 montrent les résultats de ces amplifications pour les banques humaine, bovine et de tique montrant que chaque levure résulte d'une conjugaison au cours de laquelle une interaction entre IrSPI+sp et une protéine inconnue a eut lieu, permettant ainsi aux deux domaines du facteur de transcription GAL4 de reconstituer un facteur de transcription fonctionnel, aboutissant à la synthèse du gène *HIS3*.

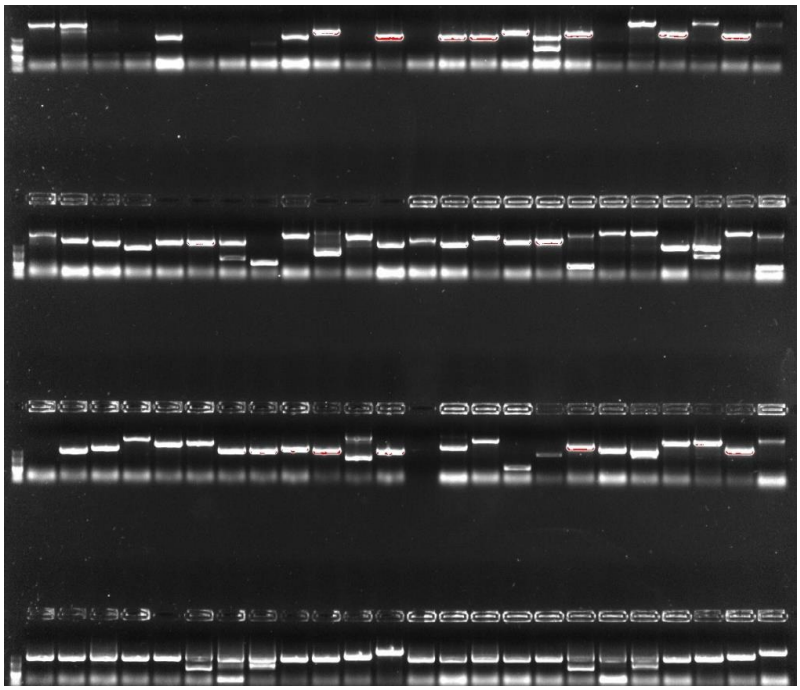


Figure 36: Amplification par PCR des inserts portés par le vecteur pDEST22 contenant un ADNc issu de la banque humaine.

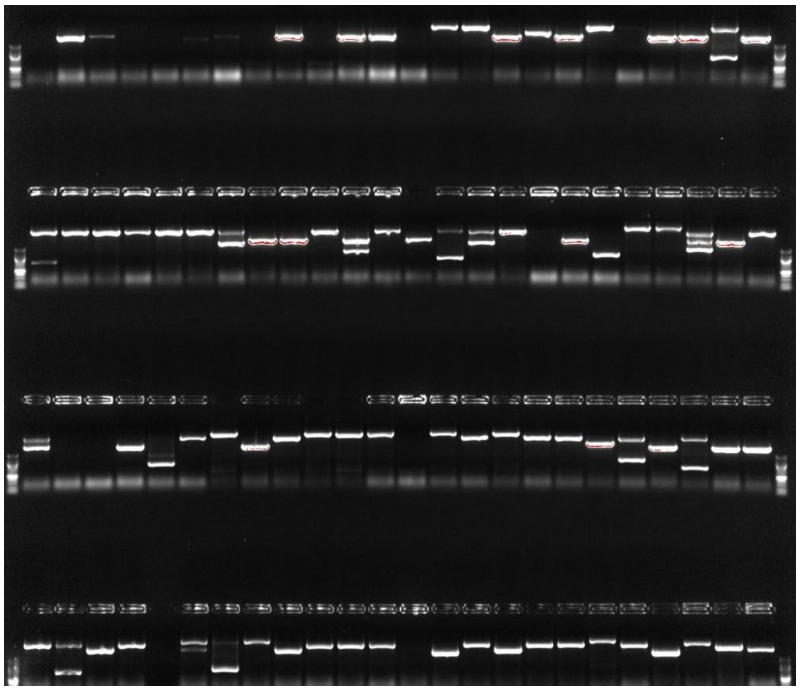


Figure 37: Amplification par PCR des inserts portés par le vecteur pDEST22 contenant un ADNc issu de la banque bovine.

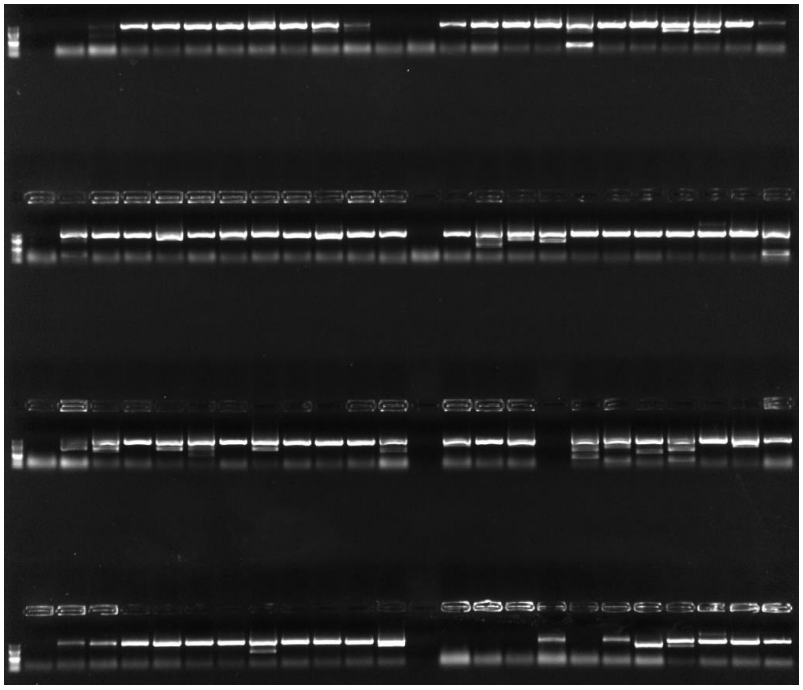


Figure 38: Amplification par PCR des inserts portés par le vecteur pDEST22 contenant un ADNc issu de la banque I. ricinus.

Seuls 96 des produits de PCR des clones obtenus pour chacune des banques ont été séquencés. Après comparaison de l'ensemble des séquences obtenues (Tableau 10 en annexe) avec les bases de données de référence des hôtes testés seuls quatre interacteurs ont été retenus pour la banque humaine : BAG6, UBQLN4, UBQLN1, LMNB1, codant respectivement les protéines BCL2 associated athanogene 6, l'ubiquiline 4, l'ubiquiline 1, et la Lamine B1 (Tableau 7). Concernant la banque bovine, cinq interacteurs ont également été identifiées : F1MPN0, A7YY47, F1N1A3, F1N6D3, Q0V8E0 codant respectivement la fibronectine type III domaine 3B, la lamine B1, l'ubiquiline 4, l'ubiquiline 1, et HLA-B associated transcript-3 (BAT3) (Tableau 7). Enfin, pour la banque tique, un seul interacteur a été identifié comme positif, il s'agit d'une protéine sécrétée dont le numéro d'accession est B7Q815, protéine sécrétée codée par le gène *sgt e*t identifiée chez la tique *I. scapularis* [261].

Tableau 7 : Interacteurs identifiés pour IrSPI après les criblages par double hybride en système levure de banques humaine, bovine et de tique. Pour chaque banque d'ADNc, sont mentionnés les interacteurs identifiés, le nombre de fois qu'ils ont été trouvés, le gène correspondant, et la protéine spécifiée.

	Interacteurs	Itérations	Gène	Protéine codée
ADNc Humain	ENSP00000404299.1	27	BAG6	BCL2 associated athanogene 6 protein
	ENSP00000357292.3	20	UBQLN4	ubiquilin 4
	ENSP00000257468.7	15	UBQLN1	ubiquilin 1
	ENSP00000261366.5	12	LMNB1	Lamin B1
ADNc Bovin	F1MPN0_BOVIN	13	FNDC3B	fibronectin type III domain containing 3B
	A7YY47_BOVIN	11	LMNB1	Lamin B1
	F1N6D3_BOVIN	8	UBQLN4	Ubiquilin 4
	F1N1A3_BOVIN	7	UBQLN1	Ubiquilin 1
	Q0V8E0_BOVIN	5	BAT3	HLA-B associated transcript-3 protein
ADNc *I. ricinus*	ISCW010489-PA	58	Sgt	Secreted protein

4.3.4 Discussion

L'identification des partenaires protéiques d'IrSPI peut représenter une étape clé dans la caractérisation des fonctions de cette protéine. De plus, IrSPI apparait, d'après nos prédictions bio-informatiques, comme étant phosphorylée et N-glycosylée, information qui semble être confirmée par l'analyse du temps de vol en MALDI-TOF/TOF de la protéine recombinante. En plus de participer à la bonne structuration de la protéine [262, 263], ces modifications post traductionnelles sont toutes deux impliquées dans des interactions protéine-protéine [263, 264], laissant ainsi supposer qu'IrSPI pourrait être engagée dans de telles interactions.

Dans le but d'identifier ces interactions potentielles, nous avons choisi d'utiliser le criblage double-hybride en système levure, technique déjà en place et maitrisée en routine dans l'UMR de virologie avec laquelle nous avons collaboré. Ce choix a également été motivé par la capacité des levures à produire des modifications post-traductionnelles (phosphorylations et glycosylations, modifications post traductionnelles impliquées dans les interactions entre protéines) absentes chez les procaryotes, mais présentes sur nos protéines eucaryotes d'intérêt dont IrSPI. De plus, cette technique de criblage ne nécessite pas la purification des protéines, étape qui peut être relativement complexe en fonction des protéines étudiées. Enfin, ce type de criblage présente un aspect haut débit très intéressant car des millions d'interactions avec des protéines d'une banque choisie peuvent être testées simultanément et sans à priori pour une protéine d'intérêt donnée.

Contrôlé au cours de l'expérience, le risque d'obtenir de faux positifs est par ailleurs faible. En revanche, le risque d'obtenir de faux négatifs semble être plus important notamment car il n'est pas contrôlé au cours de l'expérience [259]. En effet, la sensibilité de la technique est estimée entre 20 et 30%. Cela signifie que n'est, en moyenne, détecté par cette méthode de criblage qu'un maximum d'une interaction existante sur quatre. Cette faible sensibilité peut être la conséquence de nombreux paramètres dont certains peuvent être anticipés comme par exemple un encombrement stérique important. En effet, un appât ayant un fort encombrement stérique peut interagir avec sa proie mais ne pas permettre la synthèse du gène rapporteur. Pour pallier à ces effets dans le cas de protéines volumineuses, il est recommandé de tester des fragments de cette protéine en plus de la protéine entière, en particulier si elle arbore des domaines de liaison spécifique. De plus il n'est pas rare qu'un mauvais repliement dans le système d'expression qu'est la levure empêche toute possibilité d'interaction avec un partenaire

protéique. Il est également possible que l'absence de modifications post traductionnelles, ou bien une mauvaise localisation cellulaire entrainent l'absence d'interaction.

Les résultats du criblage réalisé ici par cette méthode nous a néanmoins permis d'obtenir un nombre de clones globalement en accord avec celui observé habituellement lors, par exemple, d'un criblage d'une protéine virale qui possède de nombreux partenaires cellulaires (jusqu'à 200 interactions possible, Caignard, G. communication personnelle). Nous avons néanmoins identifié un nombre total d'interacteurs relativement faible pour les banques bovine et tique (respectivement 62 et 60). Ces faibles résultats sont probablement à attribuer à des problèmes lors de l'amplification par PCR, problèmes dus à l'effet de bord car les puits les plus externes d'une plaque ne bénéficient pas des meilleures conditions de réaction dans le thermocycleur en comparaison des puits qui sont les plus au centre.

Nous n'avons obtenu aucun clone pour les levures transformées avec la séquence d'*IrSPI* sans peptide signal. Un mauvais repliement de la protéine due à l'absence du peptide signal dont on sait qu'il participe à sa stabilité de la protéine et à son repliement dans les levures [265], pourrait expliquer ce résultat et l'absence de levures sur milieu pauvre en histidine. En effet, un mauvais repliement de la protéine IrSPI peut compromettre sa faculté à interagir avec des partenaires protéiques, ne permettant alors plus la formation du facteur de transcription GAL4 et la synthèse de l'histidine.

Nos résultats ayant démontré l'expression d'*IrSPI* dans divers tissus chez la tique d'une part et en réponse aux stimuli du repas sanguin et de l'infection par un agent pathogène transmis d'autre part, nous émettons l'hypothèse que ce gène pourrait avoir un rôle important dans la physiologie de la tique. Le rôle d'IrSPI au sein de la tique pourrait par ailleurs nécessiter l'interaction avec d'autres protéines, et c'est donc pour apporter des réponses à cette question qu'a été criblée une banque d'ADNc de tique *I. ricinus* par double-hybride en levure. Il s'avère que 96% des interactions identifiées ciblent une seule protéine, avec 58 itérations sur 60 interactions retrouvées ; les deux autres interactions n'ayant été retrouvées qu'une seule fois chacune, nous avons décidé de ne pas les considérer pour le moment (RpL12 et RpS24, deux protéines ribosomales). Cet unique interacteur identifié dans la banque de tique, est une protéine homologue à B7Q815 identifiée pour la première fois chez la tique *I. scapularis* et codée par le gène *sgt* [261]. A ce jour, cette protéine, supposée secrétée, n'est pas caractérisée et son rôle n'est pas établi chez *I. scapularis*. L'étude de Vilar à partir de données transcriptomiques, métabolomiques et protéomiques de cellules de la tique *I. scapularis* en réponse à l'infection par *A. phagocytophilum*, a montré que, bien que le gène soit exprimé, l'infection par cette

bactérie n'influence pas significativement son expression ni le niveau de protéine produite par les cellules [261].

Plus récemment, Perner et al. [266], ont identifié un homologue de *Sgt* chez *I. ricinus* en comparant, à 72h, deux méthodes de gorgement de tiques sans mettre en évidence de différence significative entre gorgement sur membrane et gorgement sur lapin. Ce gène étant exprimé au cours du gorgement des tiques, il est donc envisageable de penser que son produit pourrait interagir avec IrSPI lors de ce processus. Une analyse de la séquence protéique de cette protéine nous a par ailleurs permis d'identifier, via le serveur PFAM, la présence d'un domaine SGTA en N-terminal et de deux domaines Tetratricopeptide repeat (TPR) qui ont été rapportés comme impliqués dans de diverses interactions protéiques notamment en lien avec le contrôle qualité des protéines dans la cellule [267, 268]. La protéine sgt de *I. scapularis*, dont la protéine orthologue chez l'humain, chez *C. elegans* et chez les levures semblent interagir avec HSP70 et HSP90 via ces domaines TPR, participerait ainsi au bon repliement des protéines [269, 270]. Elle participerait chez ces organismes, en tant qu'acteur du contrôle qualité de la machinerie de production protéique, à la dégradation de protéines mal repliées par la voie ERAD ubiquitine dépendante [271].

Dans un second temps, le gène *IrSPI* étant le plus surexprimé dans les glandes salivaires à 4 jours après le début du gorgement chez des tiques infectées par *B. henselae* [232], et la protéine IrSPI appartenant au cocktail salivaire injecté à l'hôte vertébré (Chapitre 2 du présent mémoire), nous avons émis l'hypothèse de son implication dans la réponse de l'hôte à la piqûre de tique. Les premières études fonctionnelles par ARN interférence avaient en effet permis de démontrer le rôle d'IrSPI dans le gorgement des tiques [232], et nos résultats ont démontré le rôle immunomodulateur de cette protéine. Ainsi, la compréhension de son action chez l'hôte vertébré, notamment sur son système immunitaire, peut passer par la recherche d'interacteurs protéiques chez des hôtes vertébrés naturellement infestés par la tique *I. ricinus* tels que le bovin ou l'homme chez qui elle pourrait interagir avec des protéines différentes. Pour ce faire, nous avons donc réalisé des criblages de banques d'ADNc bovine et humaine par double hybride. De plus, les deux banques utilisées ici ont été construites à partir de tissus différents (à partir de cellules de poumon pour la banque humaine et de cellules de rein pour la banque bovine) et représentent donc une large diversité de cibles potentielles.

Néanmoins, alors qu'IrSPI est un inhibiteur de sérine protéase et que le système de criblage double-hydride permet normalement de détecter les interactions de type enzyme/substrat, nous n'avons pas identifié de partenaire qui s'apparente à une sérine protéase. Cela pose la question de savoir si, IrSPI étant un inhibiteur de l'élastase, les sérine protéases telles que les élastase-like, sont suffisamment représentées dans les banques d'ADNc.

Pour les deux banques de vertébrés criblées, nous obtenons néanmoins des résultats très similaires au niveau des protéines identifiées ; cohérence qui nous permet d'avoir une certaine confiance dans les résultats obtenus. En effet, les protéines retrouvées dans les deux banques d'ADNc sont l'Ubiquilin 4, l'Ubiquilin 1 et la Lamine B1 ainsi que BAG6 chez l'humain et son homologue BAT3 chez le bovin. Outre ces protéines, la fibronectine type III ayant un extra domaine B a aussi été identifiée dans la banque bovine.

Tous deux membres de la famille des "HLA-B–associated transcript 3", BAT3 (banque bovine) et BAG6 (banque humaine) [272] font respectivement partie d'un complexe hétéro dimérique composé de TRC35 et de la protéine ubiquitine-like 4A, complexe qui joue un rôle prépondérant dans le contrôle qualité des protéines membranaires, mais aussi dans l'apoptose, la régulation d'expression de gènes et dans l'immuno-régulation [273-275]. Plus précisemment, il participe à la survie des cellules de type Th1 [276], et joue un rôle important dans l'expression des molécules de CMH de classe II [277] et dans l'activation de la fonction cytotoxique des cellules NK par fixation à leurs récepteurs NCR3 [278, 279]. De plus, ce complexe participe à la dégradation des protéines mal repliées, voie métabolique médiée par l'ubiquitine via l'action du protéasome, ses constituants protéines tels que BAG6 et BAT3 fonctionnent donc tels des médiateurs de la présentation antigénique [280]. Ces deux facteurs sont également pro-apoptotiques en activant la cascade des caspases par clivage de la caspase 3 [281]. Bien que ne sachant pas comment pourrait agir IrSPI sur ces deux facteurs, il s'avère possible, compte tenu des activités immuno-activatrices de BAG6 et de BAT3, qu'IrSPI régule négativement les actions de ces deux gènes expliquant ainsi son activité immunodépressive.

L'Ubiquiline 1 et 4 identifiées à la fois dans les banques bovine et humaine appartiennent à la famille des *Ubiquitines*, et comme les membres de cette famille, pourraient être impliquées dans la dégradation protéique par la voie du protéasome, participant au contrôle qualité des protéines. Elles sont considérées comme étant des adaptateurs permettant la liaison de l'ubiquitine au protéasome, particulièrement l'Ubiquiline 1 [282]. L'ubiquiline 4 identifiée ici apparait être également une protéine adaptatrice dans la liaison de l'Ubiquiline1 à la machinerie de l'autophagie et en particulier à la protéine LC3 [283].

L'ubiquiline 1 est également un acteur dans la maturation des autophagosomes [284]. Comme médiateur de la voie de dégradation des protéines mal repliées, l'Ubiquiline 1 participe au contrôle qualité intracellulaire des protéines [285]. Nous savons également que l'Ubiquiline 1 interagit avec la kinase mTOR dont le rôle est crucial dans la progression du cycle cellulaire, mais aussi dans l'expression de gènes, dans le métabolisme du sucre et dans l'autophagie [286]. Le rôle de l'Ubiquiline 1 dans la médiation des réponses immunitaires a été montré par son implication dans l'élimination des protéines membranaires mitochondriales qui étaient adressées par erreur à la membrane, provoquant alors un arrêt dans le cycle cellulaire [287]. IrSPI, en interagissant avec l'Ubiquiline 4 et 1, interagirait donc aussi avec les voies de dégradation de protéines et la machinerie de l'autophagie. Il semble donc envisageable que notre protéine d'intérêt réprime ces deux voies métaboliques qui participent toutes les deux à la présentation antigénique et donc à l'activation du système immunitaire adaptatif.

La lamine B1, identifiée dans les banques humaine et bovine, est comme toutes les autres lamines, une protéine nucléaire qui participe à la structuration du noyau de la cellule et à ses fonctions, notamment lors des phénomènes de mitose avec la condensation et le réarrangement chromosomique [288]. La Lamine B1 est impliquée dans la régulation de l'expression génique interagissant directement avec les molécules d'ADN, et également dans la prolifération et la sénescence cellulaire au travers de la modulation de la voie de relargage des espèces réactives de l'oxygène [289]. Il apparait en réalité que le rôle de la lamine B1 n'est pas cantonné dans le noyau des cellules, il peut s'exercer bien au-delà. En effet, même si la protéine est physiquement assignée au noyau, le ratio entre la lamine A et la lamine B conditionne de nombreux paramètres de trafic cellulaire chez les cellules hématopoïétiques. De la rigidité du noyau, déterminé par ce ratio, dépend la capacité cellulaire à migrer au travers de tels ou tels épithéliums ou via des micropores [290]. De plus, la lamine B1 participe, lorsqu'elle est exposée (dans le cas de cellules en apoptose par exemple) à réduire l'activation des plaquettes par interaction avec le récepteur à l'insuline situé à leur surface. Une fois internalisé, ce récepteur ne peut plus activer les plaquettes, la Lamine B1 jouant le rôle d'antagoniste [291]. Dans le cas de la lamine B1, IrSPI pourrait ainsi en s'y liant, augmenter la rigidité nucléaire afin de ne plus permettre l'hématopoïèse de certains types cellulaires comme les cellules de l'immunité par exemple.

Concernant la fibronectine de type III qui possède un extra domaine de type III B, seulement identifiée dans la banque bovine, est une protéine exprimée uniquement lors de l'embryogénèse, de la cicatrisation et de la tumorigénèse [292]. Bien que l'intégrine β1 soit capable de lier l'extra-domaine IIIB (EDB), aucun récepteur spécifique n'a pour l'heure été identifié.

Néanmoins, il s'avère que cet extra-domaine, augmente l'expression du « vascular endothelial growth factor » (VEGF), mais aussi la prolifération des cellules endothéliales et la formation de tubes par ces cellules. La fibronectine de type III induit donc l'angiogenèse des cellules endothéliales [293]. Ainsi, il est difficile d'émettre des hypothèses quant au résultat de l'interaction entre IrSPI et cette protéine, puisque IrSPI n'a pas démontré de propriétés anti-angiogéniques lorsqu'elle a été co-cultivée avec les cellules endothéliales. Il serait néanmoins intéressant de tester l'effet angiogénique de l'extra-domaine B lorsqu'il est co-cultivé avec IrSPI sur des fibroblastes.

4.3.5 Conclusions et Perspectives

Notre étude fait partie des rares études utilisant le système de criblage double-hybride pour déterminer des interactions entre protéines chez les tiques. La première d'entre elles, en 2001, a permis l'identification chez *I. scapularis* du récepteur TROSPA, récepteur utilisé par la bactérie responsable de la maladie de Lyme, *B. burgdorferi*, et lui permettant d'adhérer à l'intestin de la tique pour coloniser cet organe [85]. Plus récemment, une étude de de la Fuente et al. [294] a permis de démontrer l'importance de la subolesin dans le développement des œufs de la tique *I. scapularis* en interagissant avec des protéines régulatrices.

Bien qu'en règle générale les banques d'ADNc soient établies de sorte à couvrir au maximum le protéome de l'organisme ou du tissu duquel elles dérivent, il arrive que la protéine partenaire ou que son isoforme ne soit pas présente dans la banque criblée. Ainsi, afin de contourner ce problème l'enrichissement du réseau protéique requiert souvent l'utilisation de plusieurs banques de tissus ou d'organismes différents, et c'est pourquoi deux banques d'ADNc ont été utilisées ici. Néanmoins le choix de ces deux banques n'était pas nécessairement le plus adapté car les cellules pulmonaires ou rénales n'interagissent jamais avec les molécules de la salive de tique dans un contexte d'infestation naturelle. Il est donc probable que les protéines majoritairement ciblées par les molécules salivaires de tiques ne soient pas présentes dans les banques testées, cependant seules ces banques d'ADNc étaient disponibles pour notre étude. A l'avenir, une perspective intéressante serait de cribler de manière similaire une banque de cellules de la peau de vertébré afin d'identifier les interactions qui peuvent se produire *in vivo*.

Malgré les précautions prises dans l'interprétation de nos résultats en ayant admis une interaction comme positive uniquement au-delà de 5 itérations, les interactions identifiées ici restent à être validées par au moins une méthode alternative. L'idéal serait de tester à la suite de ces expériences de double-hybride, par des méthodes telles que la GST *pull-down* ou la co-immuno précipitation la véracité biologique des interactions identifiées. En complément, une analyse fonctionnelle cherchant à vérifier que cette interaction a du sens sur le plan biologique pourrait être envisagée, mais cela dépend néanmoins de la nature de l'interacteur identifié et de nos connaissances sur la fonction de celui-ci. Par exemple ici, la majeure partie des interacteurs identifiés étant impliqués dans la voie du contrôle qualité des protéines, nous pourrions comparer les phénotypes cellulaires de lignées sauvage et KO pour le gène codant ces protéines et observer l'effet de l'exposition à IrSPI en mesurant l'induction de l'apoptose, puisque l'anormale accumulation de protéines mal repliées entraine la mort cellulaire par apoptose.

Conclusion Générale

5. Conclusion générale

Comme présenté dans l'introduction de ce manuscrit de thèse, il existe à l'heure actuelle, une réelle urgence à développer de nouveaux moyens de lutte contre les tiques. Ce développement passe notamment par une meilleure compréhension des interactions qu'entretient la tique avec son hôte mais aussi avec les agents pathogènes qu'elle est à même de transmettre. C'est donc à cet aspect que s'intéresse le présent travail de thèse.

Ce travail a porté sur l'espèce de tique ayant le plus d'importance en santé animale et humaine en Europe, *I. ricinus*. En effet, cette espèce de tique dure est à même de transmettre un grand nombre d'agents pathogènes (bactéries, parasites et virus), dont l'incidence est actuellement reconnue comme augmentant en Europe [96, 100, 295-297]. Parmi les agents pathogènes les plus importants qu'elle transmet aux animaux, on retrouve ceux responsables de l'anaplasmose ou de la babésiose chez les bovins, du virus de l'encéphalite infectieuse équine et de l'anaplasmose aux équidés. Chez l'homme, elle est responsable de la transmission des agents de la maladie de Lyme, de l'anaplasmose et des rickettsioses pour les bactéries, du virus de l'encéphalite à tique, et des babésioses pour les parasites. De plus, des études récentes de transcriptomique via des approches à haut débit réalisées sur des *I. ricinus* collectées dans l'est de la France ont mis en évidence, dans ces tiques, la présence de bactéries, parasites et virus inattendus ou inconnus qui, dans l'avenir, pourraient devenir émergents [298-300]. Comme pour les autres espèces de tiques, la transmission de ces agents pathogènes par *I. ricinus* se fait majoritairement par le biais de l'injection de la salive lors de la piqûre, salive qui, outre son rôle indispensable dans la prise du repas sanguin, facilite cette transmission grâce à ses propriétés protéolytiques, anticoagulantes, anti-inflammatoires et immunomodulatrices [109].

Des travaux de thèse antérieurs basés sur une approche transcriptomique comparée de glandes salivaires de femelles *I. ricinus* infectées ou non par la bactérie *B. henselae*, ont permis d'identifier *IrSPI*, comme un gène impliqué à la fois dans le gorgement des tiques et l'infection bactérienne dans les glandes salivaires chez cette espèce de tique [232]. Ainsi cette double implication dans la physiologie des tiques et dans la transmission d'agents pathogènes, fait d'*IrSPI* un candidat idéal pour le développement d'un vaccin contre les tiques et les agents pathogènes transmis. Outre ces aspects vaccinaux qui font l'objet d'un contrat de recherche au laboratoire, la présente thèse s'attache à identifier et à comprendre les rôles d'*IrSPI* dans la biologie des tiques *I. ricinus* et dans la transmission d'agents pathogènes. Ce travail a été divisé en trois grandes parties dont la première concerne l'étude de la structure du gène *IrSPI* dans le

but, entre autres, d'étudier sa variabilité antigénique dans une optique vaccinale. La seconde traite de l'identification des rôles d'IrSPI dans la biologie de la tique et la transmission d'agents pathogènes. Enfin, la troisième partie s'intéresse à l'identification de partenaires protéiques à la fois chez l'hôte vertébré mais aussi chez la tique.

Concernant la détermination de la structure du gène *IrSPI* et de sa séquence, des travaux antérieurs avaient établi que ce gène était composé d'un minima de 2 exons et d'un intron mais la séquence du gène en 3' restait inconnue. Nous avons tenté de déterminer cette séquence inconnue à la fois par le biais d'amplifications PCR et par l'utilisation d'une méthode de capture de fragments d'ADN basée sur des billes magnétiques, mais, malheureusement, cela s'est révélé infructueux. Néanmoins, par des analyses *in silico* nous avons pu approcher la structure supposée du gène *IrSPI*, structure qui serait composée de 4 exons et 3 introns. Cette hypothèse semble cependant en désaccord avec la structure des protéines possédant un domaine Kunitz décrites par Dai *et al.* qui mentionne que les gènes codant ces protéines, n'auraient que 3 exons [244]. Ainsi, et sous réserve de vérification, ce résultat pourrait faire d'*IrSPI* et de ses orthologues chez *I. scapularis* des gènes non encore caractérisés. Par ailleurs, le travail expérimental réalisé pour identifier et capturer la séquence en 3' du gène a sans doute été rendu difficile en raison des nombreux homologues identifiés chez *I. ricinus* comme chez *I. scapularis*, suggérant l'appartenance d'*IrSPI* à une famille multigénique. L'avancée qui, aujourd'hui, permettrait de répondre à ces questions serait le séquençage du génome complet d'*I. ricinus*. Un tel projet nommé GENERIC, piloté par l'UMR BIOEPAR (Nantes, France), et financé par France génomique est actuellement en cours.

Dans un second chapitre nous avons cherché à déterminer la fonction d'IrSPI. La première étape pour cela a été d'identifier les conditions d'expression de ce gène. Nous avons ainsi montré qu'*IrSPI* était exprimé dans des pools de glandes salivaires, d'intestin, d'ovaires, de synganglion et de carcasses de femelles pré-gorgées pendant 5 jours sur un lapin dont au moins une tique du pool était infectée par *B. venatorum* et *R. helvetica*. Ces résultats démontrent, en plus du rôle d'IrSPI dans le repas sanguin, et au travers de l'expression dans plusieurs organes, l'importance probable d'IrSPI dans la biologie de la tique voire la transmission des agents pathogènes. L'expression d'*IrSPI* observée ici laisse en effet présager de multiples implications, comme décrit pour d'autres inhibiteurs de sérine protéases de tiques, comme dans la digestion du sang [301, 302] en raison de son expression dans le tube digestif, ou l'oviposition [303, 304] en raison de son expression dans les ovaires.

Par ailleurs, son expression dans la carcasse pourrait présager d'une implication au sein de l'hémolymphe, dans la coagulation ou les défenses immunitaires de la tique comme démontré pour d'autres inhibiteurs [305, 306]. Quant au rôle d'*IrSPI* dans le synganglion, il reste encore mystérieux. Concernant un possible rôle dans la transmission des agents pathogènes, il est établi que l'infection des tiques par ces agents entraine une modulation de l'expression de certains gènes de tique, dont certains codant des protéines à domaines Kunitz [53]. Les précédents résultats obtenus par ARN interférence suggèrent l'implication d'IrSPI soit dans l'adhésion, l'invasion et/ou la multiplication de *B. henselae* dans les glandes salivaires, soit dans le système de défense chez cette tique [232]. Outre la confirmation de la surexpression de *IrSPI* dans les glandes salivaires de la tique lors d'une infection par *B. henselae*, nous avons ici démontré cette même surexpression dans le tube digestif et, dans une moindre mesure, dans les ovaires. Ces observations pourraient refléter un rôle d'*IrSPI* dans la migration de *B. henselae* de l'intestin vers les glandes salivaires suite au stimulus du repas sanguin ou encore dans l'immunité de la tique, vis-à-vis par exemple, de bactéries en compétition avec *B. henselae*. Cette surexpression d'*IrSPI* n'a pas été retrouvée chez des nymphes infectées par la bactérie *B. birtlesii*, laissant sous-entendre un lien spécifique entre *B. henselae* et *IrSPI*. L'hypothèse qu'IrSPI pourrait être impliqué dans le système de défense des tiques contre des bactéries pathogènes a été éprouvée en évaluant son expression lors d'une infection par une bactérie non transmise, *E. coli*. Nos résultats négatifs sont en faveur d'une absence d'implication d'IrSPI dans la réponse immune vis-à-vis de cette bactérie, à l'inverse de la *défensine 6*. L'absence de détection de l'expression d'*IrSPI* chez des femelles pré-gorgées à différents temps après fixation des tiques, reste mystérieuse. Ces analyses ayant été faites en individuel, il est fort probable que la quantité des ARNs d'*IrSPI* n'ait pas été suffisante pour une détection dans nos conditions expérimentales, notamment car une expression a bien été trouvée dans des pools de plusieurs organes à 5 jours après la fixation des tiques. Cependant, il n'est pas impossible que les jours de gorgement choisis correspondent à des phases du gorgement au cours desquelles *IrSPI* est peu exprimé. En effet, des études ont montré que l'expression chez *I. ricinus* de certains ISP notamment codant des protéines à domaines Kunitz, n'ont pas une expression linéaire au cours du gorgement, dans les glandes salivaires comme dans l'intestin [240, 307].

Notre étude fonctionnelle d'IrSPI a été réalisée grâce à une protéine recombinante synthétisée en cellules de drosophile afin d'obtenir une protéine au plus près de la protéine native. Les résultats obtenus en dichroïsme circulaire, DLS, vitesse de sédimentation par ultracentrifugation analytique et viscosimétrie, ont cependant montré que cette dernière n'était

pas repliée correctement. Une absence de structure Kunitz empêche nécessairement la reconnaissance du site actif de la sérine protéase cible et donc l'inhibition de celle-ci. En revanche, si une boucle ou une partie non structurée de la protéine recombinante a un effet sur un récepteur cellulaire par exemple, son action ne devrait pas être modifiée, que la protéine soit bien repliée ou non. Cette hypothèse a été confirmée lors des analyses d'inhibition *in vitro* pour lesquelles aucun résultat avec la protéine IrSPI non refoldée n'a été obtenu alors qu'un effet de cette protéine a été observé par exemple sur la prolifération de splénocytes. Ces observations soulèvent donc l'importance de vérifier la structure de toute protéine recombinante dans le cadre de son utilisation pour des tests fonctionnels. Bien que de nombreux inhibiteurs de sérines protéases de tiques aient été rapportés comme impliqués dans les voies de la coagulation [94], nous avons démontré ici que ce n'était pas le cas pour IrSPI, du moins concernant la voie extrinsèque et la fibrinolyse. Ce résultat pouvait néanmoins être attendu puisque l'ensemble des sérine protéases de ces voies de coagulation sont des trypsin-like et que nous avons démontré que IrSPI ciblait l'élastase. Cependant, pour totalement écarter IrSPI des molécules anticoagulantes de tiques, il serait maintenant nécessaire de tester son implication dans la modulation de la voie intrinsèque ainsi que dans l'agrégation plaquettaire. De même, et alors que certains des inhibiteurs salivaires de tiques participent à la modulation de l'angiogenèse chez l'hôte vertébré [152, 306], nous avons montré ici qu'IrSPI n'avait pas non plus d'action directe sur cette voie.

IrSPI possède une alanine en position P1 dans son site actif, orientant ainsi son action inhibitrice vers les élastase-like [253], sérines protéases impliquées dans la modulation de l'inflammation chez l'hôte vertébré. En démontrant qu'IrSPI inhibe l'élastase et faiblement la chymotrypsine, nos résultats suggérent donc un rôle de cette molécule dans la modulation de l'inflammation au site de piqure de la tique. Nous avons ainsi démontré que, à l'instar d'autres inhibiteurs de sérine protéases identifiés dans la salive de plusieurs espèces de tiques [308-310], IrSPI possède une activité immunomodulatrice et réprime les réponses immunes de l'hôte qui sont générées lors de la piqûre de la tique. En effet, des expériences sur des splénocytes murins ont révélé qu'IrSPI réprimait la prolifération des lymphocytes T CD4 stimulés. Néanmoins, les splénocytes étant une population cellulaire très hétérogène, nous ne pouvons affirmer que les effets observés sont directement liés à l'action d'IrSPI sur les lymphocytes ; il peut s'avérer possible qu'il agisse indirectement sur ces cellules suite à un impact sur des cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages ou les cellules dendritiques par exemple. Afin d'appréhender les mécanismes impliqués dans l'action d'IrSPI, nous avons analysé les

cytokines produites par ces splénocytes, et montré que, en présence d'IrSPI, la grande majorité des cytokines/chémokines pro-inflammatoires étaient réprimées. Seule l'IL-2 est retrouvée sur-exprimée suite à l'exposition à IrSPI dans la cadre d'une stimulation par la Concanavalin A, résultats que nous ne savons toujours pas expliquer aujourd'hui. L'impact d'IrSPI sur la sécrétion de cytokines par des macrophages a également été investigué, et nous avons montré que malgré une répression de l'ensemble des cytokines testées, seule l'IL-5 l'était significativement après 24h d'exposition. Ces résultats nous montrent donc qu'IrSPI agit à la fois sur la prolifération des cellules de l'immunité telles que les lymphocytes mais aussi sur l'activation et la capacité de cellules de l'immunité innée (macrophages) et adaptative (lymphocytes) à promouvoir une réponse immune efficace.

Il est tout à fait envisageable que l'action d'IrSPI, chez la tique comme chez l'hôte vertébré, passe par une liaison avec des protéines. Identifier de tels partenaires apporterait des informations essentielles dans la compréhension de son rôle. Grace à la technique du double hybride, nous avons ici mis en évidence certaines de ces protéines à la fois chez des hôtes vertébrés d'*I. ricinus* et chez la tique elle-même. Les protéines identifiées chez les vertébrés sont dans leur majorité redondantes entre l'hôte humain et l'hôte bovin (Lamine B1, Ubiquiline 1 et 4 et les gènes BAT3/BAG6), et s'organisent autour de la voie du contrôle qualité des protéines. Les gènes BAT3/BAG6 pourraient également être impliqués dans l'apoptose et l'immuno-régulation, renforçant potentiellement le rôle d'IrSPI dans l'immuno-modulation chez l'hôte. De plus, et bien que nos résultats n'aient pas montré d'implication directe d'IrSPI dans l'angiogenèse et la prolifération des cellules endothéliales, l'identification de la fibronectine de type III chez le bovin pourrait suggérer une possible implication indirecte d'IrSPI dans ces phénomènes biologiques. Chez la tique, IrSPI interagirait avec la protéine sgt impliquée dans le bon repliement des protéines.

En conclusion, ce travail a permis d'apporter des connaissances supplémentaires sur l'identification des molécules composant la salive de tique qui lui permettent, en manipulant le système immunitaire de son hôte vertébré, de prélever son repas sanguin. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le rôle d'IrSPI sur les cellules du système immunitaire nécessite à présent des investigations complémentaires. La mise en évidence, chez les hôtes vertébrés, de partenaires protéiques liés au rôle identifié d'IrSPI représente en ce sens une voie de recherche très prometteuse. La découverte d'une nouvelle biomolécule immunomodulatrice comme IrSPI pourrait ouvrir des perspectives de recherche en médecine humaine et vétérinaire.

Par ailleurs, nos résultats permettent d'envisager qu'IrSPI, en tant qu'inhibiteur impliqué à la fois dans la biologie de la tique et dans la transmission d'agents pathogènes pourrait être un excellent candidat vaccinal pour lutter contre la tique *I. ricinus*. Néanmoins, la probable appartenance d'IrSPI à une famille multigénique démontrée ici, avec de possibles redondances fonctionnelles, pourrait représenter un frein à une telle utilisation. Ainsi, il serait nécessaire d'intégrer cet antigène à un « cocktail » de plusieurs autres molécules afin d'espérer une efficacité protectrice dans le cadre d'une approche vaccinale.

Bibliographie

[1] S. Tirard, "J. B. S. Haldane and the origin of life," *J Genet,* vol. 96, pp. 735-739, Nov 2017.

[2] Z. Q. Zhang, "Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (Addenda 2013)," *Zootaxa,* vol. 3703, pp. 1-82, 2013.

[3] K. A. Lanier, A. S. Petrov, and L. D. Williams, "The Central Symbiosis of Molecular Biology: Molecules in Mutualism," *J Mol Evol,* vol. 85, pp. 8-13, Aug 2017.

[4] V. Ahmadjian and J. B. Jacobs, "Relationship between fungus and alga in the lichen Cladonia cristatella Tuck," *Nature,* vol. 289, p. 169, 01/15/online 1981.

[5] F. Backhed, R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson, and J. I. Gordon, "Host-bacterial mutualism in the human intestine," *Science,* vol. 307, pp. 1915-20, Mar 25 2005.

[6] B. J. Mans, D. de Klerk, R. Pienaar, and A. A. Latif, "Nuttalliella namaqua: a living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for the evolution of blood-feeding in ticks," *PLoS One,* vol. 6, p. e23675, 2011.

[7] J. de la Fuente, "The fossil record and the origin of ticks (Acari: Parasitiformes: Ixodida)," *Exp Appl Acarol,* vol. 29, pp. 331-44, 2003.

[8] E. Penalver, A. Arillo, X. Delclos, D. Peris, D. A. Grimaldi, S. R. Anderson*, et al.*, "parasitised feathered dinosaurs as revealed by Cretaceous amber assemblages," *Nat Commun,* vol. 8, p. 1924, Dec 12 2017.

[9] F. Van Oefele, "Studien Über Die Altägyptische Parasitologie," *Arch. Parsitol* vol. 04, pp. 481-530, 1901.

[10] H. Hoogstraal, "Bibliography of ticks and tickborne diseases : from Homer (about 800 B.C.) to 31 December 1986," 1970-1986 1986.

[11] T. Smith and F. L. Kilbourne, "Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever.," *Bur Anim Ind Bull,* vol. 1, pp. 301-324, 1893.

[12] B. Pomerantsev, "Basic directions of evolution in the Ixodoidea," *Parazitologicheskii Sbornik,* vol. 10, pp. 5-19, 1948.

[13] J.-L. Camicas and P. Morel, "Position systématique et classification des tiques (Acarida: Ixodida)," *Acarologia,* vol. 18, pp. 410-420, 1977.

[14] S. C. Barker and A. Murrell, "Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names," *Parasitology,* vol. 129 Suppl, pp. S15-36, 2004.

[15] F. Jongejan and G. Uilenberg, "The global importance of ticks," *Parasitology,* vol. 129 Suppl, pp. S3-14, 2004.

[16] J. de la Fuente, A. Estrada-Pena, J. M. Venzal, K. M. Kocan, and D. E. Sonenshine, "Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals," *Front Biosci,* vol. 13, pp. 6938-46, May 1 2008.

[17] E. Lindgren, Y. Andersson, J. E. Suk, B. Sudre, and J. C. Semenza, "Public health. Monitoring EU emerging infectious disease risk due to climate change," *Science,* vol. 336, pp. 418-9, Apr 27 2012.

[18] A. R. Walker, "Amblyomma tick feeding in relation to host health," *Trop Anim Health Prod,* vol. 28, pp. 26S-28S, May 1996.

[19] R. Gothe, K. Kunze, and H. Hoogstraal, "The mechanisms of pathogenicity in the tick paralyses," *J Med Entomol,* vol. 16, pp. 357-69, Nov 23 1979.

[20] J. C. Bessot, M. C. Kopferschmitt, F. de Blay, A. Dietemann, A. Nirrengarten, N. Hutt*, et al.*, "Chocs anaphylactiques après morsure de tiques de pigeon (Argas reflexus). À propos de douze cas," *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique,* vol. 37, pp. 431-437, 1997/06/01/ 1997.

[21] A. Guillier, A. Fauconneau, F. De Barruel, S. Guez, and M. S. Doutre, "Allergic hypersensitivity to red meat induced by tick bites: a French case report," *Eur J Dermatol,* vol. 25, p. 277, May-Jun 2015.

[22] J. W. Steinke, T. A. E. Platts-Mills, and S. P. Commins, "The alpha-gal story: Lessons learned from connecting the dots," *Journal of Allergy and Clinical Immunology,* vol. 135, pp. 589-596, 2015.
[23] K. E. Jones, N. G. Patel, M. A. Levy, A. Storeygard, D. Balk, J. L. Gittleman*, et al.*, "Global trends in emerging infectious diseases," *Nature,* vol. 451, pp. 990-3, Feb 21 2008.
[24] J. de la Fuente, S. Antunes, S. Bonnet, A. Cabezas-Cruz, A. G. Domingos, A. Estrada-Pena*, et al.*, "Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases," *Front Cell Infect Microbiol,* vol. 7, p. 114, 2017.
[25] S. Bonnet, K. Huber, G. Joncour, M. René-Martellet, F. Stachurski, and L. Zenner, "Biologie des tiques," in *Tiques et Maladies à tiques, : une introduction multidisciplinaire*, N. Boulanger and K. McCoy, Eds., ed Marseille, France: IRD, 2016, p. 336.
[26] A. Rizzoli, C. Silaghi, A. Obiegala, Ivo Rudolf, Zdenek Hubálek, G. Földvári*, et al.*, "*Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. ," *Frontiers in Public Health,* vol. 2, 2014.
[27] R. Farkas, A. Estrada-Peña, T. Jaenson, I. Pascucci, and M. Madder, "Basic biology and geographical distribution of tick species involved in the transmission of animal pathogens, including zoonoses.," in *Ticks tick-borne Dis. Geogr. Distrib. Control Strateg. euro-asia Reg.*, M. Salman and J. T-C, Eds., ed: CAB international, 2013, pp. 6–26
[28] S. Moutailler, J.-C. George, Y. Hansmann, B. Degeilh, G. Joncour, E. Jourdain*, et al.*, "Principales Maladies Transmises par les Tiques: Epidemiologie, Clinique Et Diagnostic " in *Tiques et Maladies à tiques, : une introduction multidisciplinaire*, N. Boulanger and K. McCoy, Eds., ed Marseille, France: IRD, 2016, p. 336.
[29] S. Bonnet, M. Jouglin, L. Malandrin, C. Becker, A. Agoulon, M. L'Hostis*, et al.*, "Transstadial and transovarial persistence of Babesia divergens DNA in Ixodes ricinus ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique," *Parasitology,* vol. 134, pp. 197-207, Feb 2007.
[30] K. L. Mansfield, N. Johnson, L. P. Phipps, J. R. Stephenson, A. R. Fooks, and T. Solomon, "Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis," *J Gen Virol,* vol. 90, pp. 1781-94, Aug 2009.
[31] V. Cotte, S. Bonnet, D. Le Rhun, E. Le Naour, A. Chauvin, H. J. Boulouis*, et al.*, "Transmission of Bartonella henselae by Ixodes ricinus," *Emerg Infect Dis,* vol. 14, pp. 1074-80, Jul 2008.
[32] C. Reis, M. Cote, D. Le Rhun, B. Lecuelle, M. L. Levin, M. Vayssier-Taussat*, et al.*, "Vector competence of the tick Ixodes ricinus for transmission of Bartonella birtlesii," *PLoS Negl Trop Dis,* vol. 5, p. e1186, 2011.
[33] J. Ohnishi, J. Piesman, and A. M. de Silva, "Antigenic and genetic heterogeneity of Borrelia burgdorferi populations transmitted by ticks," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 98, pp. 670-5, Jan 16 2001.
[34] L. Eisen, "Pathogen transmission in relation to duration of attachment by Ixodes scapularis ticks," *Ticks Tick Borne Dis,* vol. 9, pp. 535-542, Mar 2018.
[35] P. A. Dahm, "Toxic effects produced in insects by organophosphorus compounds," *Bull World Health Organ,* vol. 44, pp. 215-9, 1971.
[36] J. E. George, "Present and future technologies for tick control," *Ann N Y Acad Sci,* vol. 916, pp. 583-8, 2000.
[37] L. G. Costa, "The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides," *Handb Clin Neurol,* vol. 131, pp. 135-48, 2015.
[38] H. Mehlhorn, B. Schumacher, A. Jatzlau, F. Abdel-Ghaffar, K. A. Al-Rasheid, S. Klimpel*, et al.*, "Efficacy of deltamethrin (Butox(R) 7.5 pour on) against nymphs and adults of ticks (Ixodes ricinus, Rhipicephalus sanguineus) in treated hair of cattle and sheep," *Parasitol Res,* vol. 108, pp. 963-71, Apr 2011.
[39] J. B. Prullage, H. V. Tran, P. Timmons, J. Harriman, S. T. Chester, and K. Powell, "The combined mode of action of fipronil and amitraz on the motility of Rhipicephalus sanguineus," *Vet Parasitol,* vol. 179, pp. 302-10, Jul 15 2011.

[40] P. R. de Oliveira, I. B. Calligaris, P. H. Nunes, G. H. Bechara, and M. I. Camargo-Mathias, "Fluazuron-induced morphological changes in Rhipicephalus sanguineus Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) nymphs: An ultra-structural evaluation of the cuticle formation and digestive processes," *Acta Trop,* vol. 133, pp. 45-55, May 2014.

[41] L. V. Gomes, W. D. Lopes, B. C. Cruz, W. F. Teixeira, G. Felippelli, W. G. Maciel*, et al.*, "Acaricidal effects of fluazuron (2.5 mg/kg) and a combination of fluazuron (1.6 mg/kg) + ivermectin (0.63 mg/kg), administered at different routes, against Rhipicephalus (Boophilus) microplus parasitizing cattle," *Exp Parasitol,* vol. 153, pp. 22-8, Jun 2015.

[42] J. F. Graf, R. Gogolewski, N. Leach-Bing, G. A. Sabatini, M. B. Molento, E. L. Bordin*, et al.*, "Tick control: an industry point of view," *Parasitology,* vol. 129 Suppl, pp. S427-42, 2004.

[43] E. N. Mwangi, S. M. Hassan, G. P. Kaaya, and S. Essuman, "The impact of Ixodiphagus hookeri, a tick parasitoid, on Amblyomma variegatum (Acari: Ixodidae) in a field trial in Kenya," *Exp Appl Acarol,* vol. 21, pp. 117-26, Feb 1997.

[44] M. Sun, Q. Ren, G. Guan, Y. Li, X. Han, C. Ma*, et al.*, "Effectiveness of Beauveria bassiana sensu lato strains for biological control against Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) in China," *Parasitol Int,* vol. 62, pp. 412-5, Oct 2013.

[45] E. A. Suleiman, M. T. Shigidi, and S. M. Hassan, "Metarhizium anisopliae as a biological control agent against Hyalomma anatolicum (Acari: Ixodidae)," *Pak J Biol Sci,* vol. 16, pp. 1943-9, Dec 15 2013.

[46] M. Samish, H. Ginsberg, and I. Glazer, "Biological control of ticks," *Parasitology,* vol. 129 Suppl, pp. S389-403, 2004.

[47] D. E. Sonenshine, T. Adams, S. A. Allan, J. McLaughlin, and F. X. Webster, "Chemical composition of some components of the arrestment pheromone of the black-legged tick, Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae) and their use in tick control," *J Med Entomol,* vol. 40, pp. 849-59, Nov 2003.

[48] Z. Hubalek, J. Halouzka, Z. Juricova, S. Sikutova, and I. Rudolf, "Effect of forest clearing on the abundance of Ixodes ricinus ticks and the prevalence of Borrelia burgdorferi s.l," *Med Vet Entomol,* vol. 20, pp. 166-72, Jun 2006.

[49] A. Milne, "Pasture improvement and the control of sheep tick, Ixodes ricinus L," *Ann Appl Biol,* vol. 35, pp. 369-78, Sep 1948.

[50] J. de la Fuente, C. Almazan, V. Naranjo, E. F. Blouin, J. M. Meyer, and K. M. Kocan, "Autocidal control of ticks by silencing of a single gene by RNA interference," *Biochem Biophys Res Commun,* vol. 344, pp. 332-8, May 26 2006.

[51] J. de la Fuente and O. Merino, "Vaccinomics, the new road to tick vaccines," *Vaccine,* vol. 31, pp. 5923-9, Dec 5 2013.

[52] P. A. Nuttall, A. R. Trimnell, M. Kazimirova, and M. Labuda, "Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases," *Parasite Immunol,* vol. 28, pp. 155-63, Apr 2006.

[53] X. Y. Liu and S. I. Bonnet, "Hard tick factors implicated in pathogen transmission," *PLoS Negl Trop Dis,* vol. 8, p. e2566, 2014.

[54] J. R. Allen and S. J. Humphreys, "Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks," *Nature,* vol. 280, pp. 491-3, Aug 9 1979.

[55] W. Trager, "Acquired Immunity to Ticks," *The Journal of Parasitology,* vol. 25, pp. 57-81, 1939.

[56] J. A. Roberts, "Resistance of cattle to the tick boophilus microplus (canestrini). II. Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifest," *J Parasitol,* vol. 54, pp. 667-73, Aug 1968.

[57] P. Willadsen, R. V. McKenna, and G. A. Riding, "Isolation from the cattle tick, Boophilus microplus, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host," *Int J Parasitol,* vol. 18, pp. 183-9, Mar 1988.

[58] J. de la Fuente, C. Almazan, M. Canales, J. M. Perez de la Lastra, K. M. Kocan, and P. Willadsen, "A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle," *Anim Health Res Rev,* vol. 8, pp. 23-8, Jun 2007.
[59] P. Willadsen, P. Bird, G. S. Cobon, and J. Hungerford, "Commercialisation of a recombinant vaccine against Boophilus microplus," *Parasitology,* vol. 110 Suppl, pp. S43-50, 1995.
[60] M. Canales, A. Enriquez, E. Ramos, D. Cabrera, H. Dandie, A. Soto*, et al.*, "Large-scale production in Pichia pastoris of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick," *Vaccine,* vol. 15, pp. 414-22, Mar 1997.
[61] R. Andreotti, "Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using crossbreed bovines in stall test," *Rev Bras Parasitol Vet,* vol. 15, pp. 97-100, Jul-Sep 2006.
[62] J. C. Garcia-Garcia, C. Montero, M. Redondo, M. Vargas, M. Canales, O. Boue*, et al.*, "Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, Boophilus microplus," *Vaccine,* vol. 18, pp. 2275-87, Apr 28 2000.
[63] S. Ghosh, D. D. Ray, Vanlahmuaka, G. Das, N. K. Singh, J. K. Sharma*, et al.*, "Progress in development of vaccine against Hyalomma anatolicum anatolicum-Indian scenario," *Vaccine,* vol. 26 Suppl 6, pp. G40-7, Dec 19 2008.
[64] H. Fragoso, P. H. Rad, M. Ortiz, M. Rodriguez, M. Redondo, L. Herrera*, et al.*, "Protection against Boophilus annulatus infestations in cattle vaccinated with the B. microplus Bm86-containing vaccine Gavac. off," *Vaccine,* vol. 16, pp. 1990-2, Dec 1998.
[65] D. Odongo, L. Kamau, R. Skilton, S. Mwaura, C. Nitsch, A. Musoke*, et al.*, "Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in Boophilus decoloratus," *Vaccine,* vol. 25, pp. 1287-96, Jan 26 2007.
[66] M. Canales, C. Almazan, V. Naranjo, F. Jongejan, and J. de la Fuente, "Vaccination with recombinant Boophilus annulatus Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against B. annulatus and B. microplus infestations," *BMC Biotechnol,* vol. 9, p. 29, Mar 31 2009.
[67] L. Jeyabal, P. Azhahianambi, K. Susitha, D. D. Ray, P. Chaudhuri, Vanlahmuaka*, et al.*, "Efficacy of rHaa86, an orthologue of Bm86, against challenge infestations of Hyalomma anatolicum anatolicum," *Transbound Emerg Dis,* vol. 57, pp. 96-102, Apr 2010.
[68] A. M. Nijhof, J. A. Balk, M. Postigo, A. M. Rhebergen, A. Taoufik, and F. Jongejan, "Bm86 homologues and novel ATAQ proteins with multiple epidermal growth factor (EGF)-like domains from hard and soft ticks," *Int J Parasitol,* vol. 40, pp. 1587-97, Dec 2010.
[69] O. Hajdusek, D. Sojka, P. Kopacek, V. Buresova, Z. Franta, I. Sauman*, et al.*, "Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 106, pp. 1033-8, Jan 27 2009.
[70] O. Hajdusek, C. Almazan, G. Loosova, M. Villar, M. Canales, L. Grubhoffer*, et al.*, "Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations," *Vaccine,* vol. 28, pp. 2993-8, Apr 9 2010.
[71] R. C. Galindo, E. Doncel-Perez, Z. Zivkovic, V. Naranjo, C. Gortazar, A. J. Mangold*, et al.*, "Tick subolesin is an ortholog of the akirins described in insects and vertebrates," *Dev Comp Immunol,* vol. 33, pp. 612-7, Apr 2009.
[72] J. de la Fuente, J. A. Moreno-Cid, M. Canales, M. Villar, J. M. de la Lastra, K. M. Kocan*, et al.*, "Targeting arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission," *Vet Parasitol,* vol. 181, pp. 17-22, Sep 8 2011.
[73] K. M. Kocan, R. Manzano-Roman, and J. de la Fuente, "Transovarial silencing of the subolesin gene in three-host ixodid tick species after injection of replete females with subolesin dsRNA," *Parasitol Res,* vol. 100, pp. 1411-5, May 2007.
[74] J. de la Fuente, C. Almazan, E. F. Blouin, V. Naranjo, and K. M. Kocan, "Reduction of tick infections with Anaplasma marginale and A. phagocytophilum by targeting the tick protective antigen subolesin," *Parasitol Res,* vol. 100, pp. 85-91, Dec 2006.

[75] O. Merino, C. Almazan, M. Canales, M. Villar, J. A. Moreno-Cid, R. C. Galindo*, et al.*, "Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by Anaplasma marginale and Babesia bigemina," *Vaccine,* vol. 29, pp. 8575-9, Nov 3 2011.

[76] M. Bensaci, D. Bhattacharya, R. Clark, and L. T. Hu, "Oral vaccination with vaccinia virus expressing the tick antigen subolesin inhibits tick feeding and transmission of Borrelia burgdorferi," *Vaccine,* vol. 30, pp. 6040-6, Sep 14 2012.

[77] O. Merino, C. Almazan, M. Canales, M. Villar, J. A. Moreno-Cid, A. Estrada-Pena*, et al.*, "Control of Rhipicephalus (Boophilus) microplus infestations by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in ticks fed on cattle," *Vaccine,* vol. 29, pp. 2248-54, Mar 9 2011.

[78] A. R. Trimnell, R. S. Hails, and P. A. Nuttall, "Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens," *Vaccine,* vol. 20, pp. 3560-8, Oct 4 2002.

[79] A. R. Trimnell, G. M. Davies, O. Lissina, R. S. Hails, and P. A. Nuttall, "A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine," *Vaccine,* vol. 23, pp. 4329-41, Jul 29 2005.

[80] M. Labuda, A. R. Trimnell, M. Lickova, M. Kazimirova, G. M. Davies, O. Lissina*, et al.*, "An antivector vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen," *PLoS Pathog,* vol. 2, p. e27, Apr 2006.

[81] A. Mulenga, M. Sugino, M. Nakajima, C. Sugimoto, and M. Onuma, "Tick-Encoded serine proteinase inhibitors (serpins); potential target antigens for tick vaccine development," *J Vet Med Sci,* vol. 63, pp. 1063-9, Oct 2001.

[82] S. Imamura, I. da Silva Vaz Junior, M. Sugino, K. Ohashi, and M. Onuma, "A serine protease inhibitor (serpin) from Haemaphysalis longicornis as an anti-tick vaccine," *Vaccine,* vol. 23, pp. 1301-11, Jan 26 2005.

[83] S. Imamura, B. Namangala, T. Tajima, M. E. Tembo, J. Yasuda, K. Ohashi*, et al.*, "Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against Rhipicephalus appendiculatus ticks," *Vaccine,* vol. 24, pp. 2230-7, Mar 20 2006.

[84] S. Imamura, S. Konnai, S. Vaz Ida, S. Yamada, C. Nakajima, Y. Ito*, et al.*, "Effects of anti-tick cocktail vaccine against Rhipicephalus appendiculatus," *Jpn J Vet Res,* vol. 56, pp. 85-98, Aug 2008.

[85] U. Pal, X. Li, T. Wang, R. R. Montgomery, N. Ramamoorthi, A. M. Desilva*, et al.*, "TROSPA, an Ixodes scapularis receptor for Borrelia burgdorferi," *Cell,* vol. 119, pp. 457-68, Nov 12 2004.

[86] J. Dai, P. Wang, S. Adusumilli, C. J. Booth, S. Narasimhan, J. Anguita*, et al.*, "Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent," *Cell Host Microbe,* vol. 6, pp. 482-92, Nov 19 2009.

[87] S. Narasimhan, B. Sukumaran, U. Bozdogan, V. Thomas, X. Liang, K. DePonte*, et al.*, "A tick antioxidant facilitates the Lyme disease agent's successful migration from the mammalian host to the arthropod vector," *Cell Host Microbe,* vol. 2, pp. 7-18, Jul 12 2007.

[88] J. Dai, S. Narasimhan, L. Zhang, L. Liu, P. Wang, and E. Fikrig, "Tick histamine release factor is critical for Ixodes scapularis engorgement and transmission of the lyme disease agent," *PLoS Pathog,* vol. 6, p. e1001205, Nov 24 2010.

[89] T. J. Schuijt, J. Coumou, S. Narasimhan, J. Dai, K. Deponte, D. Wouters*, et al.*, "A tick mannose-binding lectin inhibitor interferes with the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the lyme disease agent," *Cell Host Microbe,* vol. 10, pp. 136-46, Aug 18 2011.

[90] T. J. Schuijt, S. Narasimhan, S. Daffre, K. DePonte, J. W. Hovius, C. Van't Veer*, et al.*, "Identification and characterization of Ixodes scapularis antigens that elicit tick immunity using yeast surface display," *PLoS One,* vol. 6, p. e15926, Jan 5 2011.

[91] S. I. Bonnet, F. Binetruy, A. M. Hernandez-Jarguin, and O. Duron, "The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission," *Front Cell Infect Microbiol,* vol. 7, p. 236, 2017.

[92] N. M. Abraham, L. Liu, B. L. Jutras, A. K. Yadav, S. Narasimhan, V. Gopalakrishnan*, et al.*, "Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 114, pp. E781-E790, Jan 31 2017.
[93] S. Narasimhan and E. Fikrig, "Tick microbiome: the force within," *Trends Parasitol,* vol. 31, pp. 315-23, Jul 2015.
[94] A. A. Blisnick, T. Foulon, and S. I. Bonnet, "Serine Protease Inhibitors in Ticks: An Overview of Their Role in Tick Biology and Tick-Borne Pathogen Transmission," *Front Cell Infect Microbiol,* vol. 7, p. 199, 2017.
[95] L. Talleklint and T. G. Jaenson, "Increasing geographical distribution and density of Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in central and northern Sweden," *J Med Entomol,* vol. 35, pp. 521-6, Jul 1998.
[96] J. M. Medlock, K. M. Hansford, A. Bormane, M. Derdakova, A. Estrada-Pena, J. C. George*, et al.*, "Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe," *Parasit Vectors,* vol. 6, p. 1, Jan 2 2013.
[97] E. Leger, G. Vourc'h, L. Vial, C. Chevillon, and K. D. McCoy, "Changing distributions of ticks: causes and consequences," *Exp Appl Acarol,* vol. 59, pp. 219-44, Feb 2013.
[98] A. Estrada-Pena, J. M. Venzal, and C. Sanchez Acedo, "The tick Ixodes ricinus: distribution and climate preferences in the western Palaearctic," *Med Vet Entomol,* vol. 20, pp. 189-97, Jun 2006.
[99] R. Lauterbach, K. Wells, R. B. O'Hara, E. K. Kalko, and S. C. Renner, "Variable strength of forest stand attributes and weather conditions on the questing activity of Ixodes ricinus ticks over years in managed forests," *PLoS One,* vol. 8, p. e55365, 2013.
[100] M. Daniel, M. Maly, V. Danielova, B. Kriz, and P. Nuttall, "Abiotic predictors and annual seasonal dynamics of Ixodes ricinus, the major disease vector of Central Europe," *Parasit Vectors,* vol. 8, p. 478, Sep 18 2015.
[101] R. D. Mitchell, 3rd, J. Zhu, A. L. Carr, A. Dhammi, G. Cave, D. E. Sonenshine*, et al.*, "Infrared light detection by the haller's organ of adult american dog ticks, Dermacentor variabilis (Ixodida: Ixodidae)," *Ticks Tick Borne Dis,* vol. 8, pp. 764-771, Aug 2017.
[102] D. E. Sonenshine and R. M. Roe, "Biology of ticks," vol. 1, pp. 74-96, 2014.
[103] C. Pérez-Eid, "Les tiques: identification, Biologie, Imortance Médicale et Vétérinaire," 2007.
[104] N. Inoue, K. Hanada, N. Tsuji, I. Igarashi, H. Nagasawa, T. Mikami*, et al.*, "Characterization of phagocytic hemocytes in Ornithodoros moubata (Acari: Ixodidae)," *J Med Entomol,* vol. 38, pp. 514-9, Jul 2001.
[105] D. Taylor, "Innate Immunity in Ticks: A review," vol. 15, pp. 109-127, 2006.
[106] L. simo, D. E. Sonenshine, Y. Park, and D. Žitňan, "The nervous and sensory systems: structure, function, proteomics and genomics," in *Biology of Ticks Volume 1*, ed: Oxford University Press, 2014, p. 560 p.
[107] L. Simo, D. Zitnan, and Y. Park, "Neural control of salivary glands in ixodid ticks," *J Insect Physiol,* vol. 58, pp. 459-66, Apr 2012.
[108] W. J. L'Amoreaux, L. Junaid, and S. Trevidi, "Morphological evidence that salivary gland degeneration in the American dog tick, Dermacentor variabilis (Say), involves programmed cell death," *Tissue Cell,* vol. 35, pp. 95-9, Apr 2003.
[109] L. Simo, M. Kazimirova, J. Richardson, and S. I. Bonnet, "The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission," *Front Cell Infect Microbiol,* vol. 7, p. 281, 2017.
[110] G. J. C. Bonnet S., Boulanger N., "L'interaction tique- hôte et la transmission des pathogènes," in *Tiques et maladies à tiques*, I. editions, Ed., ed, 2016, p. 336.
[111] D. Sojka, Z. Franta, M. Horn, C. R. Caffrey, M. Mares, and P. Kopacek, "New insights into the machinery of blood digestion by ticks," *Trends Parasitol,* vol. 29, pp. 276-85, Jun 2013.
[112] D. E. Sonenshine, "Tick pheromones and their use in tick control," *Annu Rev Entomol,* vol. 51, pp. 557-80, 2006.

[113] J. L. Olivier, "relationships among feeding, gametogenesis, mating, and syngamiy in ticks," in *Host regulated developmental mechanisms in vector arthropds*, S. A. Borosvsky D., Ed., ed, 1986, pp. 93-99.
[114] A. D. Lees and J. W. Beament, "An egg-waxing organ in ticks," *Q J Microsc Sci,* vol. 89, pp. 291-322, Sep 1948.
[115] J. Dmitry A. Apanaskevich and James H. Oliver, " Life Cycles and Natural History of Ticks," in *Biology of Ticks* vol. Volume 1, D. E. S. a. R. M. Roe, Ed., ed, 2014.
[116] A. R. Van Oosten, D. J. Heylen, and E. Matthysen, "Host specificity of a bird-specialised endophilic ectoparasite, the tree-hole tick Ixodes arboricola," *Parasitol Res,* vol. 113, pp. 4397-405, Dec 2014.
[117] A. C. Steere, F. Strle, G. P. Wormser, L. T. Hu, J. A. Branda, J. W. Hovius*, et al.*, "Lyme borreliosis," *Nat Rev Dis Primers,* vol. 2, p. 16090, Dec 15 2016.
[118] I. Krupka and R. K. Straubinger, "Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with Borrelia burgdorferi sensu stricto," *Vet Clin North Am Small Anim Pract,* vol. 40, pp. 1103-19, Nov 2010.
[119] N. M. Allen and H. Jungbluth, "Lyme Neuroborreliosis: A Potentially Preventable Cause of Stroke," *J Pediatr,* vol. 170, pp. 334-e1, Mar 2016.
[120] E. B. Breitschwerdt, "Bartonellosis: one health perspectives for an emerging infectious disease," *ILAR J,* vol. 55, pp. 46-58, 2014.
[121] U. Okaro, A. Addisu, B. Casanas, and B. Anderson, "Bartonella Species, an Emerging Cause of Blood-Culture-Negative Endocarditis," *Clin Microbiol Rev,* vol. 30, pp. 709-746, Jul 2017.
[122] S. S. Breitschwerdt E. B., Hopkins S., "Neurological Manifestations of Bartonellosis in Immunocompetent Patients: A Composite of Reports from 2005–2012," 2012.
[123] Z. Woldehiwet, "The natural history of Anaplasma phagocytophilum," *Vet Parasitol,* vol. 167, pp. 108-22, Feb 10 2010.
[124] J. S. Dumler, K. S. Choi, J. C. Garcia-Garcia, N. S. Barat, D. G. Scorpio, J. W. Garyu*, et al.*, "Human granulocytic anaplasmosis and Anaplasma phagocytophilum," *Emerg Infect Dis,* vol. 11, pp. 1828-34, Dec 2005.
[125] J. S. Bakken and J. S. Dumler, "Human granulocytic anaplasmosis," *Infect Dis Clin North Am,* vol. 29, pp. 341-55, Jun 2015.
[126] J. Celli and T. C. Zahrt, "Mechanisms of Francisella tularensis intracellular pathogenesis," *Cold Spring Harb Perspect Med,* vol. 3, p. a010314, Apr 1 2013.
[127] S. I. Bonnet, R. E. Paul, E. Bischoff, M. Cote, and E. Le Naour, "First identification of Rickettsia helvetica in questing ticks from a French Northern Brittany Forest," *PLoS Negl Trop Dis,* vol. 11, p. e0005416, Mar 2017.
[128] K. Nilsson, O. Lindquist, and C. Pahlson, "Association of Rickettsia helvetica with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death," *Lancet,* vol. 354, pp. 1169-73, Oct 2 1999.
[129] E. Ghigo, L. Pretat, B. Desnues, C. Capo, D. Raoult, and J. L. Mege, "Intracellular life of Coxiella burnetii in macrophages," *Ann N Y Acad Sci,* vol. 1166, pp. 55-66, May 2009.
[130] D. Raoult, T. Marrie, and J. Mege, "Natural history and pathophysiology of Q fever," *Lancet Infect Dis,* vol. 5, pp. 219-26, Apr 2005.
[131] A. C. Salamand, F. Collart, T. Caus, J. P. Casalta, A. Mouly-Bandini, J. R. Monties*, et al.*, "Q fever endocarditis: over 14 years of surgical experience in a referral center for rickettsioses," *J Heart Valve Dis,* vol. 11, pp. 84-90, Jan 2002.
[132] A. Chauvin, E. Moreau, S. Bonnet, O. Plantard, and L. Malandrin, "Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission," *Vet Res,* vol. 40, p. 37, Mar-Apr 2009.
[133] J. J. Yusuf, "Review on Bovine Babesiosis and its Economical Importance," *Journal of Veterinary Medicine and Research,* 2017.
[134] M. K. Gorenflot A. , Precigout E., Carcy B. & Schetters T. P. M., "Human babesiosis,"*, Annals of Tropical Medicine & Parasitology,,* vol. 92:4, , pp. 489-501, 1998.

[135] T. S. Gritsun, V. A. Lashkevich, and E. A. Gould, "Tick-borne encephalitis," *Antiviral Res,* vol. 57, pp. 129-46, Jan 2003.
[136] H. Reid, "Louping-ill," *In Practice,* vol. 13, pp. 157-160, 1991-07-01 00:00:00 1991.
[137] C. L. Jeffries, K. L. Mansfield, L. P. Phipps, P. R. Wakeley, R. Mearns, A. Schock*, et al.*, "Louping ill virus: an endemic tick-borne disease of Great Britain," *J Gen Virol,* vol. 95, pp. 1005-14, May 2014.
[138] J. Suppan, B. Engel, M. Marchetti-Deschmann, and S. Nurnberger, "Tick attachment cement - reviewing the mysteries of a biological skin plug system," *Biol Rev Camb Philos Soc,* vol. 93, pp. 1056-1076, May 2018.
[139] M. M. Lavoipierre, "Feeding mechanism of blood-sucking arthropods," *Nature,* vol. 208, pp. 302-3, Oct 16 1965.
[140] Z. Franta, H. Frantova, J. Konvickova, M. Horn, D. Sojka, M. Mares*, et al.*, "Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick Ixodes ricinus," *Parasit Vectors,* vol. 3, p. 119, Dec 14 2010.
[141] J. W. Jelinski, "Painless Hematophagy: The Functional Role of Novel Tick Metalloproteases in Pain Suppression," 2016.
[142] J. M. Ribeiro and T. N. Mather, "Ixodes scapularis: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase," *Exp Parasitol,* vol. 89, pp. 213-21, Jun 1998.
[143] S. Sangamnatdej, G. C. Paesen, M. Slovak, and P. A. Nuttall, "A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva," *Insect Mol Biol,* vol. 11, pp. 79-86, Feb 2002.
[144] G. C. Paesen, P. L. Adams, K. Harlos, P. A. Nuttall, and D. I. Stuart, "Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure," *Mol Cell,* vol. 3, pp. 661-71, May 1999.
[145] R. F. De Jongh, K. C. Vissers, T. F. Meert, L. H. Booij, C. S. De Deyne, and R. J. Heylen, "The role of interleukin-6 in nociception and pain," *Anesth Analg,* vol. 96, pp. 1096-103, table of contents, Apr 2003.
[146] J. Li, Y. P. Zhang, and R. S. Kirsner, "Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix," *Microsc Res Tech,* vol. 60, pp. 107-14, Jan 1 2003.
[147] M. S. Neal, "Angiogenesis: is it the key to controlling the healing process?," *J Wound Care,* vol. 10, pp. 281-7, Jul 2001.
[148] I. M. Francischetti, T. N. Mather, and J. M. Ribeiro, "Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis," *Thromb Haemost,* vol. 94, pp. 167-74, Jul 2005.
[149] M. Slovak, I. Stibraniova, V. Hajnicka, and P. A. Nuttall, "Antiplatelet-derived growth factor (PDGF) activity in the saliva of ixodid ticks is linked with their long mouthparts," *Parasite Immunol,* vol. 36, pp. 32-42, Jan 2014.
[150] V. Hajnicka, I. Vancova-Stibraniova, M. Slovak, P. Kocakova, and P. A. Nuttall, "Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors," *Int J Parasitol,* vol. 41, pp. 213-23, Feb 2011.
[151] C. Kramer, Z. Nahmias, D. D. Norman, T. A. Mulvihill, L. B. Coons, and J. A. Cole, "Dermacentor variabilis: regulation of fibroblast migration by tick salivary gland extract and saliva," *Exp Parasitol,* vol. 119, pp. 391-7, Jul 2008.
[152] M. K. Islam, N. Tsuji, T. Miyoshi, M. A. Alim, X. Huang, T. Hatta*, et al.*, "The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick blood-feeding success," *PLoS Pathog,* vol. 5, p. e1000497, Jul 2009.
[153] S. Fukumoto, T. Sakaguchi, M. You, X. Xuan, and K. Fujisaki, "Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis," *Microvasc Res,* vol. 71, pp. 218-21, May 2006.
[154] Y. Decrem, J. Beaufays, V. Blasioli, K. Lahaye, M. Brossard, L. Vanhamme*, et al.*, "A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick Ixodes ricinus," *FEBS J,* vol. 275, pp. 1485-99, Apr 2008.
[155] S. Palta, R. Saroa, and A. Palta, "Overview of the coagulation system," *Indian J Anaesth,* vol. 58, pp. 515-23, Sep 2014.

[156] I. M. Francischetti, T. N. Mather, and J. M. Ribeiro, "Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, Ixodes scapularis," *Thromb Haemost,* vol. 91, pp. 886-98, May 2004.
[157] I. M. Francischetti, J. G. Valenzuela, J. F. Andersen, T. N. Mather, and J. M. Ribeiro, "Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, Ixodes scapularis: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex," *Blood,* vol. 99, pp. 3602-12, May 15 2002.
[158] Y. Decrem, G. Rath, V. Blasioli, P. Cauchie, S. Robert, J. Beaufays*, et al.*, "Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick Ixodes ricinus, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis," *J Exp Med,* vol. 206, pp. 2381-95, Oct 26 2009.
[159] P. P. Prevot, B. Adam, K. Z. Boudjeltia, M. Brossard, L. Lins, P. Cauchie*, et al.*, "Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick Ixodes ricinus," *J Biol Chem,* vol. 281, pp. 26361-9, Sep 8 2006.
[160] N. Kato, S. Iwanaga, T. Okayama, H. Isawa, M. Yuda, and Y. Chinzei, "Identification and characterization of the plasma kallikrein-kinin system inhibitor, haemaphysalin, from hard tick, Haemaphysalis longicornis," *Thromb Haemost,* vol. 93, pp. 359-67, Feb 2005.
[161] T. J. Schuijt, K. Bakhtiari, S. Daffre, K. Deponte, S. J. Wielders, J. A. Marquart*, et al.*, "Factor Xa activation of factor V is of paramount importance in initiating the coagulation system: lessons from a tick salivary protein," *Circulation,* vol. 128, pp. 254-66, Jul 16 2013.
[162] Anisuzzaman, M. K. Islam, M. A. Alim, T. Miyoshi, T. Hatta, K. Yamaji*, et al.*, "Longistatin, a plasminogen activator, is key to the availability of blood-meals for ixodid ticks," *PLoS Pathog,* vol. 7, p. e1001312, Mar 2011.
[163] I. M. Francischetti, T. N. Mather, and J. M. Ribeiro, "Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector Ixodes scapularis," *Biochem Biophys Res Commun,* vol. 305, pp. 869-75, Jun 13 2003.
[164] J. Kotal, H. Langhansova, J. Lieskovska, J. F. Andersen, I. M. Francischetti, T. Chavakis*, et al.*, "Modulation of host immunity by tick saliva," *J Proteomics,* vol. 128, pp. 58-68, Oct 14 2015.
[165] M. Kazimirova and I. Stibraniova, "Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission," *Front Cell Infect Microbiol,* vol. 3, p. 43, 2013.
[166] S. S. Maxwell, T. A. Stoklasek, Y. Dash, K. R. Macaluso, and S. K. Wikel, "Tick modulation of the in-vitro expression of adhesion molecules by skin-derived endothelial cells," *Ann Trop Med Parasitol,* vol. 99, pp. 661-72, Oct 2005.
[167] I. Vancova, V. Hajnicka, M. Slovak, and P. A. Nuttall, "Anti-chemokine activities of ixodid ticks depend on tick species, developmental stage, and duration of feeding," *Vet Parasitol,* vol. 167, pp. 274-8, Feb 10 2010.
[168] I. Vancova, V. Hajnicka, M. Slovak, P. Kocakova, G. C. Paesen, and P. A. Nuttall, "Evasin-3-like anti-chemokine activity in salivary gland extracts of ixodid ticks during blood-feeding: a new target for tick control," *Parasite Immunol,* vol. 32, pp. 460-3, Jun 2010.
[169] J. Beaufays, B. Adam, C. Menten-Dedoyart, L. Fievez, A. Grosjean, Y. Decrem*, et al.*, "Ir-LBP, an ixodes ricinus tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function," *PLoS One,* vol. 3, p. e3987, 2008.
[170] N. B. Wasala and D. C. Jaworski, "Dermacentor variabilis: characterization and modeling of macrophage migration inhibitory factor with phylogenetic comparisons to other ticks, insects and parasitic nematodes," *Exp Parasitol,* vol. 130, pp. 232-8, Mar 2012.
[171] A. Hidano, S. Konnai, S. Yamada, N. Githaka, M. Isezaki, H. Higuchi*, et al.*, "Suppressive effects of neutrophil by Salp16-like salivary gland proteins from Ixodes persulcatus Schulze tick," *Insect Mol Biol,* vol. 23, pp. 466-74, Aug 2014.
[172] A. Frauenschuh, C. A. Power, M. Deruaz, B. R. Ferreira, J. S. Silva, M. M. Teixeira*, et al.*, "Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick Rhipicephalus sanguineus," *J Biol Chem,* vol. 282, pp. 27250-8, Sep 14 2007.

[173] M. Deruaz, A. Frauenschuh, A. L. Alessandri, J. M. Dias, F. M. Coelho, R. C. Russo*, et al.*, "Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity," *J Exp Med,* vol. 205, pp. 2019-31, Sep 1 2008.
[174] R. N. Ramachandra and S. K. Wikel, "Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production," *J Med Entomol,* vol. 29, pp. 818-26, Sep 1992.
[175] Y. Tian, W. Chen, G. Mo, R. Chen, M. Fang, G. Yedid*, et al.*, "An Immunosuppressant Peptide from the Hard Tick Amblyomma variegatum," *Toxins (Basel),* vol. 8, May 3 2016.
[176] T. Kishimoto, "Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine," *Arthritis Res Ther,* vol. 8 Suppl 2, p. S2, 2006.
[177] J. M. Ribeiro, J. J. Weis, and S. R. Telford, 3rd, "Saliva of the tick Ixodes dammini inhibits neutrophil function," *Exp Parasitol,* vol. 70, pp. 382-8, May 1990.
[178] C. D. Kramer, N. M. Poole, L. B. Coons, and J. A. Cole, "Tick saliva regulates migration, phagocytosis, and gene expression in the macrophage-like cell line, IC-21," *Exp Parasitol,* vol. 127, pp. 665-71, Mar 2011.
[179] C. Turni, R. P. Lee, and L. A. Jackson, "Effect of salivary gland extracts from the tick, Boophilus microplus, on leucocytes from Brahman and Hereford cattle," *Parasite Immunol,* vol. 24, pp. 355-61, Jul 2002.
[180] X. Guo, C. J. Booth, M. A. Paley, X. Wang, K. DePonte, E. Fikrig*, et al.*, "Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins," *Infect Immun,* vol. 77, pp. 2320-9, Jun 2009.
[181] J. Kopecky and M. Kuthejlova, "Suppressive effect of Ixodes ricinus salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro," *Parasite Immunol,* vol. 20, pp. 169-74, Apr 1998.
[182] S. Urioste, L. R. Hall, S. R. Telford, 3rd, and R. G. Titus, "Saliva of the Lyme disease vector, Ixodes dammini, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2-dependent mechanism," *J Exp Med,* vol. 180, pp. 1077-85, Sep 1 1994.
[183] B. R. Ferreira and J. S. Silva, "Saliva of Rhipicephalus sanguineus tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity," *Vet Immunol Immunopathol,* vol. 64, pp. 279-93, Jul 31 1998.
[184] M. Kubes, N. Fuchsberger, M. Labuda, E. Zuffova, and P. A. Nuttall, "Salivary gland extracts of partially fed Dermacentor reticulatus ticks decrease natural killer cell activity in vitro," *Immunology,* vol. 82, pp. 113-6, May 1994.
[185] M. Kubes, P. Kocakova, M. Slovak, M. Slavikova, N. Fuchsberger, and P. A. Nuttall, "Heterogeneity in the effect of different ixodid tick species on human natural killer cell activity," *Parasite Immunol,* vol. 24, pp. 23-8, Jan 2002.
[186] C. Menten-Dedoyart, C. Faccinetto, M. Golovchenko, I. Dupiereux, P. B. Van Lerberghe, S. Dubois*, et al.*, "Neutrophil extracellular traps entrap and kill Borrelia burgdorferi sensu stricto spirochetes and are not affected by Ixodes ricinus tick saliva," *J Immunol,* vol. 189, pp. 5393-401, Dec 1 2012.
[187] J. Chmelar, C. J. Oliveira, P. Rezacova, I. M. Francischetti, Z. Kovarova, G. Pejler*, et al.*, "A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation," *Blood,* vol. 117, pp. 736-44, Jan 13 2011.
[188] G. C. Paesen, C. Siebold, K. Harlos, M. F. Peacey, P. A. Nuttall, and D. I. Stuart, "A tick protein with a modified Kunitz fold inhibits human tryptase," *J Mol Biol,* vol. 368, pp. 1172-86, May 11 2007.
[189] D. D. Metcalfe, D. Baram, and Y. A. Mekori, "Mast cells," *Physiol Rev,* vol. 77, pp. 1033-79, Oct 1997.
[190] V. Hajnicka, I. Vancova, P. Kocakova, M. Slovak, J. Gasperik, M. Slavikova*, et al.*, "Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission," *Parasitology,* vol. 130, pp. 333-42, Mar 2005.
[191] I. Vancova, M. Slovak, V. Hajnicka, M. Labuda, L. Simo, K. Peterkova*, et al.*, "Differential anti-chemokine activity of Amblyomma variegatum adult ticks during blood-feeding," *Parasite Immunol,* vol. 29, pp. 169-77, Apr 2007.

[192] J. G. Valenzuela, R. Charlab, T. N. Mather, and J. M. Ribeiro, "Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, Ixodes scapularis," *J Biol Chem,* vol. 275, pp. 18717-23, Jun 23 2000.
[193] H. Schroeder, V. Daix, L. Gillet, J. C. Renauld, and A. Vanderplasschen, "The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by Ixodes ricinus ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species," *Microbes Infect,* vol. 9, pp. 247-50, Feb 2007.
[194] K. Tyson, C. Elkins, H. Patterson, E. Fikrig, and A. de Silva, "Biochemical and functional characterization of Salp20, an Ixodes scapularis tick salivary protein that inhibits the complement pathway," *Insect Mol Biol,* vol. 16, pp. 469-79, Aug 2007.
[195] B. J. Mans and J. M. Ribeiro, "Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins," *Insect Biochem Mol Biol,* vol. 38, pp. 841-52, Sep 2008.
[196] M. A. Nunn, A. Sharma, G. C. Paesen, S. Adamson, O. Lissina, A. C. Willis*, et al.*, "Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick Ornithodoros moubata," *J Immunol,* vol. 174, pp. 2084-91, Feb 15 2005.
[197] R. F. Guo and P. A. Ward, "Role of C5a in inflammatory responses," *Annu Rev Immunol,* vol. 23, pp. 821-52, 2005.
[198] V. Daix, H. Schroeder, N. Praet, J. P. Georgin, I. Chiappino, L. Gillet*, et al.*, "Ixodes ticks belonging to the Ixodes ricinus complex encode a family of anticomplement proteins," *Insect Mol Biol,* vol. 16, pp. 155-66, Apr 2007.
[199] T. M. Carvalho-Costa, M. T. Mendes, M. V. da Silva, T. A. da Costa, M. G. Tiburcio, A. C. Anhe*, et al.*, "Immunosuppressive effects of Amblyomma cajennense tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells," *Parasit Vectors,* vol. 8, p. 22, Jan 14 2015.
[200] C. J. Oliveira, K. A. Cavassani, D. D. More, G. P. Garlet, J. C. Aliberti, J. S. Silva*, et al.*, "Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1alpha and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5," *Int J Parasitol,* vol. 38, pp. 705-16, May 2008.
[201] A. Sa-Nunes, A. Bafica, D. A. Lucas, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, J. F. Andersen*, et al.*, "Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in Ixodes scapularis saliva," *J Immunol,* vol. 179, pp. 1497-505, Aug 1 2007.
[202] M. Slamova, A. Skallova, J. Palenikova, and J. Kopecky, "Effect of tick saliva on immune interactions between Borrelia afzelii and murine dendritic cells," *Parasite Immunol,* vol. 33, pp. 654-60, Dec 2011.
[203] K. R. Macaluso and S. K. Wikel, "Dermacentor andersoni: effects of repeated infestations on lymphocyte proliferation, cytokine production, and adhesion-molecule expression by BALB/c mice," *Ann Trop Med Parasitol,* vol. 95, pp. 413-27, Jun 2001.
[204] S. Hannier, J. Liversidge, J. M. Sternberg, and A. S. Bowman, "Ixodes ricinus tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes," *Parasite Immunol,* vol. 25, pp. 27-37, Jan 2003.
[205] J. Anguita, N. Ramamoorthi, J. W. Hovius, S. Das, V. Thomas, R. Persinski*, et al.*, "Salp15, an ixodes scapularis salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation," *Immunity,* vol. 16, pp. 849-59, Jun 2002.
[206] N. Mejri, N. Franscini, B. Rutti, and M. Brossard, "Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to Ixodes ricinus instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations," *Parasite Immunol,* vol. 23, pp. 61-9, Feb 2001.
[207] T. Rolnikova, M. Kazimirova, and M. Buc, "Modulation of human lymphocyte proliferation by salivary gland extracts of ixodid ticks (Acari: Ixodidae): effect of feeding stage and sex," *Folia Parasitol (Praha),* vol. 50, pp. 305-12, Dec 2003.
[208] R. D. Gillespie, M. C. Dolan, J. Piesman, and R. G. Titus, "Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, Ixodes scapularis," *J Immunol,* vol. 166, pp. 4319-26, Apr 1 2001.

[209] H. Inokuma, T. Aita, K. Ohno, and T. Onishi, "Effects of infestation by Rhipicephalus sanguineus on lymphocyte blastogenic responses to mitogens in dogs," *J Vet Med Sci,* vol. 60, pp. 1013-6, Sep 1998.
[210] F. Ganapamo, B. Rutti, and M. Brossard, "In vitro production of interleukin-4 and interferon-gamma by lymph node cells from BALB/c mice infested with nymphal Ixodes ricinus ticks," *Immunology,* vol. 85, pp. 120-4, May 1995.
[211] S. K. Wikel, "Influence of Dermacentor andersoni infestation on lymphocyte responsiveness to mitogens," *Ann Trop Med Parasitol,* vol. 76, pp. 627-32, Dec 1982.
[212] L. Kovar, J. Kopecky, and B. Rihova, "Salivary gland extract from Ixodes ricinus tick polarizes the cytokine profile toward Th2 and suppresses proliferation of T lymphocytes in human PBMC culture," *J Parasitol,* vol. 87, pp. 1342-8, Dec 2001.
[213] L. Kovar, J. Kopecky, and B. Rihova, "Salivary gland extract from Ixodes ricinus tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokine profile," *Parasitol Res,* vol. 88, pp. 1066-72, Dec 2002.
[214] J. Wu, Y. Wang, H. Liu, H. Yang, D. Ma, J. Li*, et al.*, "Two immunoregulatory peptides with antioxidant activity from tick salivary glands," *J Biol Chem,* vol. 285, pp. 16606-13, May 28 2010.
[215] P. Gwakisa, K. Yoshihara, T. Long To, H. Gotoh, F. Amano, and E. Momotani, "Salivary gland extract of Rhipicephalus appendiculatus ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells," *Vet Parasitol,* vol. 99, pp. 53-61, Jul 31 2001.
[216] D. M. Heinze, S. K. Wikel, S. Thangamani, and F. J. Alarcon-Chaidez, "Transcriptional profiling of the murine cutaneous response during initial and subsequent infestations with Ixodes scapularis nymphs," *Parasit Vectors,* vol. 5, p. 26, Feb 6 2012.
[217] V. Rodrigues, B. Fernandez, A. Vercoutere, L. Chamayou, A. Andersen, O. Vigy*, et al.*, "Immunomodulatory Effects of Amblyomma variegatum Saliva on Bovine Cells: Characterization of Cellular Responses and Identification of Molecular Determinants," *Front Cell Infect Microbiol,* vol. 7, p. 521, 2017.
[218] D. K. Boppana, G. Dhinakar Raj, L. John, S. K. Wikel, B. R. Latha, and S. Gomathinayagam, "In vivo immunomodulatory effects of ixodid ticks on ovine circulating T- and B-lymphocytes," *Parasite Immunol,* vol. 26, pp. 83-93, Feb 2004.
[219] J. M. Ribeiro, G. T. Makoul, J. Levine, D. R. Robinson, and A. Spielman, "Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, Ixodes dammini," *J Exp Med,* vol. 161, pp. 332-44, Feb 1 1985.
[220] V. D. Boppana, S. Thangamani, F. J. Alarcon-Chaidez, A. J. Adler, and S. K. Wikel, "Blood feeding by the Rocky Mountain spotted fever vector, Dermacentor andersoni, induces interleukin-4 expression by cognate antigen responding CD4+ T cells," *Parasit Vectors,* vol. 2, p. 47, Oct 8 2009.
[221] K. M. Bonnet S., Richardson J. , Šimo L. , "Tick Saliva and Its Role in Pathogen Transmission," *Skin and arthropod vectors,* pp. 121-192, 2017.
[222] P. A. Nuttall and M. Labuda, "Tick-host interactions: saliva-activated transmission," *Parasitology,* vol. 129 Suppl, pp. S177-89, 2004.
[223] L. D. Jones, E. Hodgson, and P. A. Nuttall, "Enhancement of virus transmission by tick salivary glands," *J Gen Virol,* vol. 70 (Pt 7), pp. 1895-8, Jul 1989.
[224] S. Nazario, S. Das, A. M. de Silva, K. Deponte, N. Marcantonio, J. F. Anderson*, et al.*, "Prevention of Borrelia burgdorferi transmission in guinea pigs by tick immunity," *Am J Trop Med Hyg,* vol. 58, pp. 780-5, Jun 1998.
[225] S. K. Wikel, R. N. Ramachandra, D. K. Bergman, T. R. Burkot, and J. Piesman, "Infestation with pathogen-free nymphs of the tick Ixodes scapularis induces host resistance to transmission of Borrelia burgdorferi by ticks," *Infect Immun,* vol. 65, pp. 335-8, Jan 1997.

[226] B. Sukumaran, S. Narasimhan, J. F. Anderson, K. DePonte, N. Marcantonio, M. N. Krishnan*, et al.*, "An Ixodes scapularis protein required for survival of Anaplasma phagocytophilum in tick salivary glands," *J Exp Med,* vol. 203, pp. 1507-17, Jun 12 2006.
[227] J. Pechova, G. Stepanova, L. Kovar, and J. Kopecky, "Tick salivary gland extract-activated transmission of Borrelia afzelii spirochaetes," *Folia Parasitol (Praha),* vol. 49, pp. 153-9, 2002.
[228] Z. Krocova, A. Macela, L. Hernychova, M. Kroca, J. Pechova, and J. Kopecky, "Tick salivary gland extract accelerates proliferation of Francisella tularensis in the host," *J Parasitol,* vol. 89, pp. 14-20, Feb 2003.
[229] M. Labuda, L. D. Jones, T. Williams, and P. A. Nuttall, "Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts," *Med Vet Entomol,* vol. 7, pp. 193-6, Apr 1993.
[230] L. M. Porter, Z. M. Radulovic, and A. Mulenga, "A repertoire of protease inhibitor families in Amblyomma americanum and other tick species: inter-species comparative analyses," *Parasit Vectors,* vol. 10, p. 152, Mar 22 2017.
[231] L. F. Parizi, A. Ali, L. Tirloni, D. P. Oldiges, G. A. Sabadin, M. L. Coutinho*, et al.*, "Peptidase inhibitors in tick physiology," *Med Vet Entomol,* vol. 32, pp. 129-144, Jun 2018.
[232] X. Y. Liu, J. de la Fuente, M. Cote, R. C. Galindo, S. Moutailler, M. Vayssier-Taussat*, et al.*, "IrSPI, a tick serine protease inhibitor involved in tick feeding and Bartonella henselae infection," *PLoS Negl Trop Dis,* vol. 8, p. e2993, Jul 2014.
[233] X. Y. Liu, M. Cote, R. E. Paul, and S. I. Bonnet, "Impact of feeding system and infection status of the blood meal on Ixodes ricinus feeding," *Ticks Tick Borne Dis,* vol. 5, pp. 323-8, Apr 2014.
[234] S. Bonnet and X. Y. Liu, "Laboratory artificial infection of hard ticks: a tool for the analysis of tick-borne pathogen transmission," *Acarologia,* vol. 52, pp. 453-464, 2012-12-20 2012.
[235] C. B. Burge and S. Karlin, "Finding the genes in genomic DNA," *Curr Opin Struct Biol,* vol. 8, pp. 346-54, Jun 1998.
[236] C. B. Burge, "Modeling dependencies in pre-mRNA splicing signals," in *Computational Methods in Molecular Biology*, S. Salzberg, Searls, D. and Kasif, S., eds, Ed., ed: Elsevier Science, Amsterdam, 1998, pp. 127-163.
[237] R. E. Paul, M. Cote, E. Le Naour, and S. I. Bonnet, "Environmental factors influencing tick densities over seven years in a French suburban forest," *Parasit Vectors,* vol. 9, p. 309, May 27 2016.
[238] B. S. Almazán C., Cote M., Slovák M., Park Y. , Šimo L., "A Versatile Model of Hard Tick Infestation on Laboratory Rabbits," *Jove video journal,* 2018.
[239] M. Gulia-Nuss, A. B. Nuss, J. M. Meyer, D. E. Sonenshine, R. M. Roe, R. M. Waterhouse*, et al.*, "Genomic insights into the Ixodes scapularis tick vector of Lyme disease," *Nature Communications,* vol. 7, p. 10507, 02/09/online 2016.
[240] A. Schwarz, B. M. von Reumont, J. Erhart, A. C. Chagas, J. M. Ribeiro, and M. Kotsyfakis, "De novo Ixodes ricinus salivary gland transcriptome analysis using two next-generation sequencing methodologies," *FASEB J,* vol. 27, pp. 4745-56, Dec 2013.
[241] M. Kotsyfakis, A. Schwarz, J. Erhart, and J. M. Ribeiro, "Tissue- and time-dependent transcription in Ixodes ricinus salivary glands and midguts when blood feeding on the vertebrate host," *Sci Rep,* vol. 5, p. 9103, Mar 13 2015.
[242] J. G. Valenzuela, I. M. Francischetti, V. M. Pham, M. K. Garfield, T. N. Mather, and J. M. Ribeiro, "Exploring the sialome of the tick Ixodes scapularis," *J Exp Biol,* vol. 205, pp. 2843-64, Sep 2002.
[243] J. M. Ribeiro, F. Alarcon-Chaidez, I. M. Francischetti, B. J. Mans, T. N. Mather, J. G. Valenzuela*, et al.*, "An annotated catalog of salivary gland transcripts from Ixodes scapularis ticks," *Insect Biochem Mol Biol,* vol. 36, pp. 111-29, Feb 2006.
[244] S. X. Dai, A. D. Zhang, and J. F. Huang, "Evolution, expansion and expression of the Kunitz/BPTI gene family associated with long-term blood feeding in Ixodes Scapularis," *BMC Evol Biol,* vol. 12, p. 4, Jan 14 2012.

[245] G. C. Paesen, C. Siebold, M. L. Dallas, C. Peers, K. Harlos, P. A. Nuttall*, et al.*, "An ion-channel modulator from the saliva of the brown ear tick has a highly modified Kunitz/BPTI structure," *J Mol Biol,* vol. 389, pp. 734-47, Jun 19 2009.
[246] A. Micsonai, F. Wien, L. Kernya, Y. H. Lee, Y. Goto, M. Refregiers*, et al.*, "Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 112, pp. E3095-103, Jun 16 2015.
[247] J. Koci, L. Simo, and Y. Park, "Validation of internal reference genes for real-time quantitative polymerase chain reaction studies in the tick, Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae)," *J Med Entomol,* vol. 50, pp. 79-84, Jan 2013.
[248] J. M. C. Ribeiro, Alarcon-Chaidez,F., Mans,B., Francischetti,I.M.,Mather,T., Valenzuela,J.G. and Wikel,S.K., "Title," unpublished|.
[249] T. K. Kim, L. Tirloni, A. F. Pinto, J. Moresco, J. R. Yates, 3rd, I. da Silva Vaz, Jr.*, et al.*, "Ixodes scapularis Tick Saliva Proteins Sequentially Secreted Every 24 h during Blood Feeding," *PLoS Negl Trop Dis,* vol. 10, p. e0004323, Jan 2016.
[250] T. Katoh and M. Tiemeyer, "The N's and O's of Drosophila glycoprotein glycobiology," *Glycoconj J,* vol. 30, pp. 57-66, Jan 2013.
[251] D. J. Harvey, D. R. Wing, B. Kuster, and I. B. Wilson, "Composition of N-linked carbohydrates from ovalbumin and co-purified glycoproteins," *J Am Soc Mass Spectrom,* vol. 11, pp. 564-71, Jun 2000.
[252] B. Raynal, P. Lenormand, B. Baron, S. Hoos, and P. England, "Quality assessment and optimization of purified protein samples: why and how?," *Microb Cell Fact,* vol. 13, p. 180, Dec 30 2014.
[253] S. Ranasinghe and D. P. McManus, "Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors," *Dev Comp Immunol,* vol. 39, pp. 219-27, Mar 2013.
[254] M. L. Circu and T. Y. Aw, "Glutathione and apoptosis," *Free radical research,* vol. 42, pp. 689-706, 2008.
[255] O. Zitka, S. Skalickova, J. Gumulec, M. Masarik, V. Adam, J. Hubalek*, et al.*, "Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients," *Oncology letters,* vol. 4, pp. 1247-1253, 2012.
[256] J. Mai, A. Virtue, J. Shen, H. Wang, and X.-F. Yang, "An evolving new paradigm: endothelial cells – conditional innate immune cells," *Journal of Hematology & Oncology,* vol. 6, p. 61, August 22 2013.
[257] G. Caignard, "Cartographie des intéractions entre protéines virales codées par le gène P des Paramyxoviridae et protéines cellulaires," Paris 7 2010.
[258] S. Fields and O. Song, "A novel genetic system to detect protein-protein interactions," *Nature,* vol. 340, pp. 245-6, Jul 20 1989.
[259] P. O. Vidalain, Y. Jacob, M. C. Hagemeijer, L. M. Jones, G. Neveu, J. P. Roussarie*, et al.*, "A field-proven yeast two-hybrid protocol used to identify coronavirus-host protein-protein interactions," *Methods Mol Biol,* vol. 1282, pp. 213-29, 2015.
[260] F. Katzen, "Gateway((R)) recombinational cloning: a biological operating system," *Expert Opin Drug Discov,* vol. 2, pp. 571-89, Apr 2007.
[261] M. Villar, N. Ayllon, P. Alberdi, A. Moreno, M. Moreno, R. Tobes*, et al.*, "Integrated Metabolomics, Transcriptomics and Proteomics Identifies Metabolic Pathways Affected by Anaplasma phagocytophilum Infection in Tick Cells," *Mol Cell Proteomics,* vol. 14, pp. 3154-72, Dec 2015.
[262] H. S. Lee, Y. Qi, and W. Im, "Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study," *Sci Rep,* vol. 5, p. 8926, Mar 9 2015.
[263] H. Nishi, K. Hashimoto, and A. R. Panchenko, "Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function," *Structure,* vol. 19, pp. 1807-15, Dec 7 2011.
[264] B. J. Arey, "The Role of Glycosylation in Receptor Signaling," in *Glycosylation*, S. Petrescu, Ed., ed, 2012, pp. 273-286.

[265] S. Goda, K. Takano, Y. Yamagata, Y. Katakura, and K. Yutani, "Effect of extra N-terminal residues on the stability and folding of human lysozyme expressed in Pichia pastoris," *Protein Eng,* vol. 13, pp. 299-307, Apr 2000.
[266] J. Perner, S. Kropackova, P. Kopacek, and J. M. C. Ribeiro, "Sialome diversity of ticks revealed by RNAseq of single tick salivary glands," *PLoS Negl Trop Dis,* vol. 12, p. e0006410, Apr 2018.
[267] A. L. Cortajarena and L. Regan, "Ligand binding by TPR domains," *Protein Sci,* vol. 15, pp. 1193-8, May 2006.
[268] J. W. Chartron, D. G. VanderVelde, and W. M. Clemons, Jr., "Structures of the Sgt2/SGTA dimerization domain with the Get5/UBL4A UBL domain reveal an interaction that forms a conserved dynamic interface," *Cell Rep,* vol. 2, pp. 1620-32, Dec 27 2012.
[269] L. J. Worrall, M. A. Wear, A. P. Page, and M. D. Walkinshaw, "Cloning, purification and characterization of the Caenorhabditis elegans small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein," *Biochim Biophys Acta,* vol. 1784, pp. 496-503, Mar 2008.
[270] S. T. Liou and C. Wang, "Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein is composed of three structural units with distinct functions," *Arch Biochem Biophys,* vol. 435, pp. 253-63, Mar 15 2005.
[271] M. Kaneko and Y. Nomura, "ER signaling in unfolded protein response," *Life Sci,* vol. 74, pp. 199-205, Dec 5 2003.
[272] T. Spies, M. Bresnahan, and J. L. Strominger, "Human major histocompatibility complex contains a minimum of 19 genes between the complement cluster and HLA-B," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 86, pp. 8955-8, Nov 1989.
[273] J. Binici and J. Koch, "BAG-6, a jack of all trades in health and disease," *Cell Mol Life Sci,* vol. 71, pp. 1829-37, May 2014.
[274] H. Kawahara, R. Minami, and N. Yokota, "BAG6/BAT3: emerging roles in quality control for nascent polypeptides," *J Biochem,* vol. 153, pp. 147-60, Feb 2013.
[275] J. G. Lee and Y. Ye, "Bag6/Bat3/Scythe: a novel chaperone activity with diverse regulatory functions in protein biogenesis and degradation," *Bioessays,* vol. 35, pp. 377-85, Apr 2013.
[276] M. Rangachari, C. Zhu, K. Sakuishi, S. Xiao, J. Karman, A. Chen*, et al.*, "Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion," *Nat Med,* vol. 18, pp. 1394-400, Sep 2012.
[277] R. K. Pai, D. Askew, W. H. Boom, and C. V. Harding, "Regulation of class II MHC expression in APCs: roles of types I, III, and IV class II transactivator," *J Immunol,* vol. 169, pp. 1326-33, Aug 1 2002.
[278] V. R. Simhadri, K. S. Reiners, H. P. Hansen, D. Topolar, V. L. Simhadri, K. Nohroudi*, et al.*, "Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function," *PLoS One,* vol. 3, p. e3377, 2008.
[279] E. Pogge von Strandmann, V. R. Simhadri, B. von Tresckow, S. Sasse, K. S. Reiners, H. P. Hansen*, et al.*, "Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells," *Immunity,* vol. 27, pp. 965-74, Dec 2007.
[280] K. L. Rock and A. L. Goldberg, "Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides," *Annu Rev Immunol,* vol. 17, pp. 739-79, 1999.
[281] Y. H. Wu, S. F. Shih, and J. Y. Lin, "Ricin triggers apoptotic morphological changes through caspase-3 cleavage of BAT3," *J Biol Chem,* vol. 279, pp. 19264-75, Apr 30 2004.
[282] I. Marin, "The ubiquilin gene family: evolutionary patterns and functional insights," *BMC Evol Biol,* vol. 14, p. 63, Mar 28 2014.
[283] D. Y. Lee, D. Arnott, and E. J. Brown, "Ubiquilin4 is an adaptor protein that recruits Ubiquilin1 to the autophagy machinery," *EMBO Rep,* vol. 14, pp. 373-81, Apr 2013.
[284] E. N. N'Diaye, J. Debnath, and E. J. Brown, "Ubiquilins accelerate autophagosome maturation and promote cell survival during nutrient starvation," *Autophagy,* vol. 5, pp. 573-5, May 2009.

[285] C. Zhang and A. J. Saunders, "An emerging role for Ubiquilin 1 in regulating protein quality control system and in disease pathogenesis," *Discov Med,* vol. 8, pp. 18-22, Jun 2009.
[286] S. Wu, A. Mikhailov, H. Kallo-Hosein, K. Hara, K. Yonezawa, and J. Avruch, "Characterization of ubiquilin 1, an mTOR-interacting protein," *Biochim Biophys Acta,* vol. 1542, pp. 41-56, Jan 30 2002.
[287] A. M. Whiteley, M. A. Prado, I. Peng, A. R. Abbas, B. Haley, J. A. Paulo*, et al.*, "Ubiquilin1 promotes antigen-receptor mediated proliferation by eliminating mislocalized mitochondrial proteins," *Elife,* vol. 6, Sep 21 2017.
[288] J. Camps, M. R. Erdos, and T. Ried, "The role of lamin B1 for the maintenance of nuclear structure and function," *Nucleus,* vol. 6, pp. 8-14, 2015.
[289] T. Shimi, V. Butin-Israeli, S. A. Adam, R. B. Hamanaka, A. E. Goldman, C. A. Lucas*, et al.*, "The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence," *Genes Dev,* vol. 25, pp. 2579-93, Dec 15 2011.
[290] J. W. Shin, K. R. Spinler, J. Swift, J. A. Chasis, N. Mohandas, and D. E. Discher, "Lamins regulate cell trafficking and lineage maturation of adult human hematopoietic cells," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 110, pp. 18892-7, Nov 19 2013.
[291] M.-S. Christin-Piché, "Étude du rôle régulateur de la lamine B1 dans l'activation plaquettaire : base moléculaire de la thromboprotection chez les patients porteurs d'anticoagulant lupique et d'anti-lamine B1," Université de Montréal, 2008.
[292] J. H. Peters, G. E. Chen, and R. O. Hynes, "Fibronectin isoform distribution in the mouse. II. Differential distribution of the alternatively spliced EIIIB, EIIIA, and V segments in the adult mouse," *Cell Adhes Commun,* vol. 4, pp. 127-48, Aug 1996.
[293] Z. A. Khan, B. M. Chan, S. Uniyal, Y. P. Barbin, H. Farhangkhoee, S. Chen*, et al.*, "EDB fibronectin and angiogenesis -- a novel mechanistic pathway," *Angiogenesis,* vol. 8, pp. 183-96, 2005.
[294] J. de la Fuente, C. Maritz-Olivier, V. Naranjo, P. Ayoubi, A. M. Nijhof, C. Almazan*, et al.*, "Evidence of the role of tick subolesin in gene expression," *BMC Genomics,* vol. 9, p. 372, Aug 2 2008.
[295] A. Rizzoli, C. Silaghi, A. Obiegala, I. Rudolf, Z. Hubalek, G. Foldvari*, et al.*, "Ixodes ricinus and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health," *Front Public Health,* vol. 2, p. 251, 2014.
[296] J. S. Gray, H. Dautel, A. Estrada-Pena, O. Kahl, and E. Lindgren, "Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in europe," *Interdiscip Perspect Infect Dis,* vol. 2009, p. 593232, 2009.
[297] E. Lindgren, L. Talleklint, and T. Polfeldt, "Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick Ixodes ricinus," *Environ Health Perspect,* vol. 108, pp. 119-23, Feb 2000.
[298] M. Vayssier-Taussat, S. Moutailler, L. Michelet, E. Devillers, S. Bonnet, J. Cheval*, et al.*, "Next generation sequencing uncovers unexpected bacterial pathogens in ticks in western Europe," *PLoS One,* vol. 8, p. e81439, 2013.
[299] S. Bonnet, L. Michelet, S. Moutailler, J. Cheval, C. Hebert, M. Vayssier-Taussat*, et al.*, "Identification of parasitic communities within European ticks using next-generation sequencing," *PLoS Negl Trop Dis,* vol. 8, p. e2753, Mar 2014.
[300] S. Moutailler, I. Popovici, E. Devillers, M. Vayssier-Taussat, and M. Eloit, "Diversity of viruses in Ixodes ricinus, and characterization of a neurotropic strain of Eyach virus," *New Microbes New Infect,* vol. 11, pp. 71-81, May 2016.
[301] T. Miyoshi, N. Tsuji, M. K. Islam, M. A. Alim, T. Hatta, K. Yamaji*, et al.*, "A Kunitz-type proteinase inhibitor from the midgut of the ixodid tick, Haemaphysalis longicornis, and its endogenous target serine proteinase," *Mol Biochem Parasitol,* vol. 170, pp. 112-5, Apr 2010.
[302] S. Narasimhan, O. Perez, S. Mootien, K. DePonte, R. A. Koski, E. Fikrig*, et al.*, "Characterization of Ixophilin, a thrombin inhibitor from the gut of Ixodes scapularis," *PLoS One,* vol. 8, p. e68012, 2013.

[303] A. S. Tanaka, R. Andreotti, A. Gomes, R. J. Torquato, M. U. Sampaio, and C. A. Sampaio, "A double headed serine proteinase inhibitor--human plasma kallikrein and elastase inhibitor--from Boophilus microplus larvae," *Immunopharmacology,* vol. 45, pp. 171-7, Dec 1999.
[304] R. Andreotti, K. C. Malavazi-Piza, S. D. Sasaki, R. J. Torquato, A. Gomes, and A. S. Tanaka, "Serine proteinase inhibitors from eggs and larvae of tick Boophilus microplus: purification and biochemical characterization," *J Protein Chem,* vol. 20, pp. 337-43, Jul 2001.
[305] S. M. Ceraul, S. M. Dreher-Lesnick, A. Mulenga, M. S. Rahman, and A. F. Azad, "Functional characterization and novel rickettsiostatic effects of a Kunitz-type serine protease inhibitor from the tick Dermacentor variabilis," *Infect Immun,* vol. 76, pp. 5429-35, Nov 2008.
[306] C. A. Lima, R. J. Torquato, S. D. Sasaki, G. Z. Justo, and A. S. Tanaka, "Biochemical characterization of a Kunitz type inhibitor similar to dendrotoxins produced by Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) hemocytes," *Vet Parasitol,* vol. 167, pp. 279-87, Feb 10 2010.
[307] M. Kotsyfakis, A. Schwarz, J. Erhart, and J. M. C. Ribeiro, "Tissue- and time-dependent transcription in Ixodes ricinus salivary glands and midguts when blood feeding on the vertebrate host," *Scientific Reports,* vol. 5, p. 9103, 03/13/online 2015.
[308] G. Leboulle, M. Crippa, Y. Decrem, N. Mejri, M. Brossard, A. Bollen*, et al.*, "Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from Ixodes ricinus ticks," *J Biol Chem,* vol. 277, pp. 10083-9, Mar 22 2002.
[309] J. J. Valdes, A. Schwarz, I. Cabeza de Vaca, E. Calvo, J. H. Pedra, V. Guallar*, et al.*, "Tryptogalinin is a tick Kunitz serine protease inhibitor with a unique intrinsic disorder," *PLoS One,* vol. 8, p. e62562, 2013.
[310] K. Toyomane, S. Konnai, A. Niwa, N. Githaka, M. Isezaki, S. Yamada*, et al.*, "Identification and the preliminary in vitro characterization of IRIS homologue from salivary glands of Ixodes persulcatus Schulze," *Ticks Tick Borne Dis,* vol. 7, pp. 119-125, Feb 2016.

Annexes

Annexes

Tableau 8: liste des amorces utilisées lors des PCR du chapitre 1.

Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')
1F	TCTACCGTTCAAGATGAAGG
1R	AGGCAGCCAGCGAGATCTTA
2F	TCTCGTACTCCATGGGGCGGC
2R	TCTAAGTTTAGCCCCTTCGGC
3F	TGACTGAGACACAATGCAGA
3R	TTAAAATGTCCCGTCGGAGA
4R	TTCCGTACGGACATTCCCGC
5F	ACATCTACCGTTCAAGATGAAG
ID23882	TCTAAGTGCCTTGCAGTAGTC
F1 intron	CTACCAAGCATCTTGCTCATG
F2 intron	GAGTTTGGCGATGACGAAGTA
F3 intron	TCGCCACGCCATCTCCTTG
F4 intron	GGCACACTTCTGGTTCACG
F5 intron	CGTCTAGTTCACAACCGG
F6 intron	CACTGTGGCGTCACCACGC
F7 intron	CTCACGCGAGAAAGAGCGG
F1 RACE	GCGAGCCTTGAAGGGGAGC
F2 RACE	CGGCAAGGTGTCCGACGGG
R2	GCTGCCTCTGGAGAAAGGGTT
R3	AGGGTTCTGCGGAGACTACTGC
ADAPTO PRIMER	GACTCGAGTCGACATCGA

Tableau 9: tableau récapitulatif des conditions de PCR utilisées dans le chapitre 1

Couple d'amorce	**Programme PCR utilisé**
3F-1R	95°C, 5' ; 40x (98°C 15'' ; 58°C 30'' ; 72°C 40'') 72°C 5'
3F-ID23822	95°C, 5' ; 40x (98°C 15'' ; 57°C 30'' ; 72°C 40'') 72°C 5'
3F-4R	95°C, 5' ; 40x (98°C 15'' ; 56°C 30'' ; 72°C 40'') 72°C 5'
SP6-T7	95°C, 5' ; 40x (98°C 12'' ; 55°C 30'' ; 72°C 60'') 72°C 5'
5F-4R	95°C, 8' ; 35x (95°C 60'' ; 55°C 60'' ; 72°C 3') 72°C 5'
PCR asymétrique 4R	95°C, 2' ; 40x (98°C 15'' ; 61°C 30'' ; 72°C 40'') 72°C 5'
F2-intron – ID23822	95°C, 2' ; 40x (95°C 30'' ; 56°C 30'' ; 72°C 30'') 72°C 5'
F1-intron – ID23822	95°C, 2' ; 35x (95°C 30'' ; 56°C 30'' ; 72°C 30'') 72°C 5'
F1-intron – R2	95°C, 30'' ; 35x (98°C 12'' ; 57°C 30'' ; 72°C 40'') 72°C 5'
F2-intron – R2	95°C, 30'' ; 35x (98°C 12'' ; 57°C 30'' ; 72°C 40'') 72°C 5'
F3-intron – R2	95°C, 30'' ; 40x (98°C 12'' ; 56°C 30'' ; 72°C 40'') 72°C 5'
F3-intron – ID23822	95°C, 30'' ; 40x (98°C 12'' ; 55°C 30'' ; 72°C 60'') 72°C 5'
F4-intron – R2	95°C, 30'' ; 40x (98°C 12'' ; 57°C 30'' ; 72°C 60'') 72°C 5'
F4-intron – ID23822	95°C, 30'' ; 40x (98°C 12'' ; 56°C 30'' ; 72°C 60'') 72°C 5'
F5-intron – R2	95°C, 30'' ; 40x (98°C 12'' ; 56°C 30'' ; 72°C 60'') 72°C 5'
F5-intron – ID23822	95°C, 30'' ; 40x (98°C 12'' ; 55°C 30'' ; 72°C 60'') 72°C 5'
F6-intron – R2	95°C, 30'' ; 40x (98°C 12'' ; 58,5°C 30'' ; 72°C 60'') 72°C 5'
F6-intron – ID23822	95°C, 30'' ; 40x (98°C 12'' ; 56,5°C 30'' ; 72°C 60'') 72°C 5'
F7-intron – R2	95°C, 30'' ; 40x (98°C 12'' ; 57,5°C 30'' ; 72°C 60'') 72°C 5'
F7-intron – ID23822	95°C, 30'' ; 40x (98°C 12'' ; 55,5°C 30'' ; 72°C 60'') 72°C 5'
1F-1R (touchdown)	98°C, 2' ; 5x (98°C,10'' ;58°C à 53°C 30'' ;72°C 10'') 33x (98°C 10'' ; 53°C 30'' ; 72°C 5') 72°C 5'
F2-intron – R2 et F2-intron – ID23822 (touchdown)	95°C, 30'' ; 10x (98°C,12'' ;60°C à 55°C 30'' ;72°C 35'') 30x (98°C 10'' ; 55°C 30'' ; 72°C 5') 72°C 5'
F1-intron – R2 et F1-intron – ID23822 (touchdown)	95°C, 30'' ; 10x (98°C,12'' ;60°C à 55°C 30'' ;72°C 35'') 30x (98°C 10'' ; 55°C 30'' ; 72°C 5') 72°C 5'
3' RACE PCR F1 RACE/F2 RACE-adapto primer	95°C, 30'' ; 40x (98°C 12'' ; 60°C 30'' ; 72°C 60'') 72°C 5'

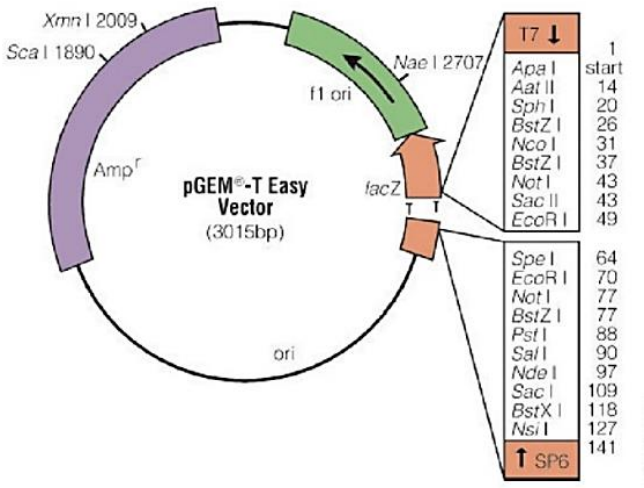


Figure 39: Représentation schématique du vecteur de clonage pGEM-T easy (Promega). Ce plasmide possède le gène de résistance à l'ampicilline (violet) et une origine de réplication (vert).

Tableau 10: Résultats des interacteurs identifiés après les criblages double hybride pour les banques humaine, bovine et I. ricinus

Banque Humaine

Gène	Numéro accession	Description	Itérations
BAG6	ENSP00000404299.1	BCL2 associated athanogene 6	27
UBQLN4	ENSP00000357292.3	ubiquilin 4	20
UBQLN1	ENSP00000257468.7	ubiquilin 1	15
LMNB1	ENSP00000261366.5	lamin B1	12
PKN1	ENSP00000468497.1	protein kinase N1	4
SF3B1	ENSP00000335321.5	splicing factor 3b subunit 1	2
FAT1	ENSP00000406229.2	FAT atypical cadherin 1	2
PNKD	ENSP00000248451.3	paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia	1
PFDN5	ENSP00000334188.4	prefoldin subunit 5	1

Banque Bovine

Gène	Numéro accession	Description	Itérations
F1MPN0	F1MPN0_BOVIN	fibronectin type III domain containing 3B	13
A7YY47	A7YY47_BOVIN	LMNB1 protein	11
F1N1A3	F1N1A3_BOVIN	ubiquilin 1	7
F1N6D3	F1N6D3_BOVIN	Ubiquilin 4	8
Q0V8E0	Q0V8E0_BOVIN	HLA-B associated transcript-3	5
F1N0Z9	F1N0Z9_BOVIN	early lactation protein precursor	4
A6QQA2	A6QQA2_BOVIN	transmembrane and coiled-coil domain family 1	3
Q32LM2	SGTA_BOVIN	small glutamine rich tetratricopeptide repeat containing alpha	2
Q3MIC0	RL37A_BOVIN	ribosomal protein L37a	2
F1MY28	F1MY28_BOVIN	BCL2 associated athanogene 6	2
Q17R00	EMX2_BOVIN	empty spiracles homeobox 2	1
Q8SQ19	CREB3_BOVIN	cAMP responsive element binding protein 3	1
A2VE06	A2VE06_BOVIN	ribosomal protein S4, Y-linked 1	1
G5E628	G5E628_BOVIN	ubiquilin 2	1
Q6QTG9	Q6QTG9_BOVIN	cytochrome c oxidase subunit I	1

Banque *I. ricinus*

Gène	Numéro accession	Description	Itérations
Sgt	ISCW010489-PA	Secreted protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:B7Q815]	58
RpL12	ISCW004058-PA	ribosomal protein L12, putative [Source:VB Community Annotation]	1
RpS24	ISCW006068-PA	ribosomal protein S24, putative [Source:VB Community Annotation]	1

Article de synthèse

Sarah I. Bonnet*, Adrien Blisnick*, Nathalie Boulanger, Frédéric Stachurski***,****, Laurence Vial***,****

* UMR Bipar 956 Inra, École nationale vétérinaire d'Alfort, Anses, université Paris-Est, groupe Interactions tiques agents pathogènes, Maisons-Alfort, sbonnet@vet-alfort.fr ; adrien.blisnick@anses.fr
** EA : 7290 : Virulence bactérienne précoce : groupe Borrelia, facultés de médecine et de pharmacie, université de Strasbourg, Centre national de référence Borrelia nboulanger@unistra.fr
*** Cirad, UMR Astre, 34398 Montpellier
**** Astre, Cirad, Inra, université de Montpellier, 34090 Montpellier frederic.stachurski@cirad.fr laurence.vial@cirad.fr

PARASITOLOGIE

Impacts du changement climatique sur les populations de tiques en Europe : mythes et réalités

Le lien entre changements climatiques et risque lié aux maladies à tiques n'est ni direct ni uniforme suivant les régions, les espèces et les populations de tiques impliquées.

Résumé

Les tiques représentent en Europe les principaux vecteurs d'agents pathogènes en santé animale et humaine. La plupart d'entre elles sont très sensibles aux conditions météorologiques. La question se pose donc de l'impact des changements climatiques en cours sur la distribution des tiques et des maladies associées. Néanmoins, les dynamiques sous-jacentes sont complexes : les impacts directs et indirects sont difficiles à différencier, et d'autres facteurs, notamment d'origine anthropique, entrent en jeu. Les effets de ces divers facteurs intéressent tous les composants du système vectoriel et le lien entre changements climatiques et risque lié aux maladies à tiques n'est ni direct ni uniforme.

www.lepointveterinaire.fr

Compléments de lecture : Références

https://www.lepointveterinaire.fr/bdd/165/165_4904

Les tiques représentent, au niveau mondial, les premiers vecteurs d'agents pathogènes vétérinaires. Elles viennent en second après les moustiques en matière d'impact sur la santé humaine [4]. L'infestation par les tiques constitue une contrainte majeure pour l'élevage dans le monde, surtout sous les tropiques, contribuant à réduire fortement la production animale [8]. Chez les animaux de rente, ces ectoparasites génèrent des pertes de rendement (lait, viande et cuir) en raison de la spoliation sanguine et des piqûres dont ils sont responsables, les plaies dues aux piqûres pouvant de surcroît être secondairement surinfectées. Les tiques transmettent une très grande variété d'agents pathogènes incluant des virus, des bactéries et des parasites, mais leur rôle ne se réduit pas à celui de "seringues" capables de transmettre tout et n'importe quoi (encadré).

En 2007, le groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat a rapporté que des augmentations de température d'un minimum de 1,5 à 2 °C devraient être observées dans les prochaines décennies en Europe du Nord [3]. En parallèle, il est reconnu que la distribution

ENCADRÉ

Compétence et capacité vectorielles

Chaque espèce de tique est spécifiquement compétente pour transmettre tel ou tel agent pathogène, bien que la transmission ne soit pas systématique lorsqu'une tique est infectée [5]. Dans le milieu naturel, de nombreux paramètres influencent la compétence vectorielle : présence des hôtes, abondance du vecteur, conditions climatiques, faciès écologique ou encore interventions sanitaires de l'homme entrent en jeu. Ainsi, une espèce de tique transmet – ou non – un agent pathogène donné à un endroit et à un moment donnés, ce qui définit sa capacité vectorielle.

La densité et la répartition des espèces de tiques au sein d'une zone biogéographique dépendent du biotope (notion de préférences écologiques), de la disponibilité de leurs hôtes de prédilection (préférences trophiques) et des conditions climatiques. Toute action de l'homme, volontaire ou non, sur ces différents paramètres aura nécessairement des conséquences sur les populations de tiques présentes et sur leurs fluctuations (climat, débroussaillage, agriculture, urbanisation, élevage, chasse, etc.).

Conflit d'intérêts

Aucun.

géographique de plusieurs espèces de tiques a été modifiée, en lien avec l'intensification des activités humaines, l'évolution des populations animales ou certaines évolutions socio-économiques [1]. Les changements environnementaux et climatiques sont-ils aussi impliqués [6, 17] ? Dans quelle mesure et avec quel impact ?

Points forts

- Le climat influence directement et indirectement à la fois l'activité, l'abondance et la distribution des populations de tiques, mais n'est pas le seul facteur impliqué.
- L'influence indirecte sur les tiques s'exerce *via* leurs hôtes vertébrés, les activités humaines ou encore les changements environnementaux.
- L'impact des changements climatiques diffère suivant les espèces de tiques et la région concernées.

UNE DYNAMIQUE DES TIQUES ET DES MALADIES VECTORIELLES

1. Trois options de survie

Face aux changements environnementaux, les populations de tiques peuvent s'adapter aux nouvelles conditions, s'éteindre, ou migrer vers des territoires plus propices [11]. Leur dispersion s'effectue par le biais des mouvements de leurs hôtes, en raison par exemple des déplacements des oiseaux migrateurs, qui hébergent de nombreuses espèces de tiques, notamment les stades immatures, mais surtout *via* le transport d'animaux domestiques. C'est ainsi que *Rhipicephalus microplus* a colonisé récemment l'Afrique de l'Ouest et qu'*Amblyomma variegatum* s'est installée aux Caraïbes [1, 13].

2. Une dynamique de transmission des agents pathogènes

La dynamique saisonnière des tiques a une influence majeure sur la dynamique de transmission des agents pathogènes qu'elles véhiculent. À plus longue échéance, les changements climatiques pourraient ainsi, de même que les évolutions de l'activité humaine, induire des variations dans la répartition géographique de maladies liées aux tiques ou agir sur leur incidence. L'incidence de ces maladies augmente dans plusieurs pays européens, mais l'effet du climat reste difficile à différencier des autres causes possibles [12]. Des mesures climatiques à grande échelle sur de longues durées permettraient seules de relier climat et hétérogénéités spatio-temporelles de "l'émergence" des maladies liées aux tiques (et le lien pourrait différer selon la région et les espèces de tiques). Cette émergence (ou réémergence) de maladies représente un danger réel pour la santé humaine et animale, comme illustré par l'arrivée récente de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo dans le sud de l'Europe [21]. De même, des tiques *Ixodes ricinus*, collectées récemment dans l'est de la France, renfermaient des bactéries, parasites et virus inattendus pour la région[1] (études de transcriptomique) [2, 15, 24].

IMBRICATION DES FACTEURS

Plusieurs facteurs, parfois interdépendants, influencent la distribution et l'abondance des populations de tiques. Les modifications opérées par l'homme sur l'environnement et les écosystèmes en sont un, essentiel. Les conséquences des changements sur les populations de tiques peuvent être directes (création de biotopes favorables/défavorables) ou indirectes (modifications de la répartition et de la densité des hôtes vertébrés des tiques, sauvages ou domestiques).

Le développement des activités humaines en extérieur ou les changements de pratiques d'élevage (en hors-sol ou sur pâturages) influent particulièrement sur le risque de contact des hôtes avec les tiques et, par conséquent, sur la probabilité d'acquérir un agent infectieux associé. L'augmentation des mouvements d'animaux de rente, de compagnie ou de loisirs peut entraîner l'introduction locale de nouvelles espèces de tiques. L'absence de coévolution entre ces tiques importées, les micro-organismes qu'elles transmettent et les animaux locaux favoriserait alors l'émergence de maladies.

Des agents pathogènes endémiques exotiques peuvent aussi être introduits *via* les animaux. Disposeront-ils d'espèces vectrices locales pour compléter leur cycle de vie ? Pour le sérotype 8 de la fièvre catarrhale ovine aux Pays-Bas, des insectes locaux (des culicoïdes) se sont révélés parfaitement compétents [18]. Les experts se demandent actuellement si le virus de la dermatite nodulaire contagieuse, qui vient d'être introduit en Europe orientale, trouvera des espèces de tiques locales pour prendre le relais des espèces de tiques dont la compétence vectorielle est avérée en Afrique du Sud [14]. L'introduction d'espèces animales nouvelles ou de races non locales, dans des zones endémiques pour certaines tiques et maladies vectorielles, risque aussi d'induire chez ces animaux l'apparition de maladies contre lesquelles ils ne sont pas armés. En outre, les changements climatiques vont avoir des conséquences directes sur les populations de tiques. Globalement et en théorie, sous nos latitudes, des températures plus chaudes en automne et en hiver peuvent augmenter la survie et la vitesse de développement des tiques, et augmenter la durée de leur période d'activité. Néanmoins, pour des espèces de climat tempéré très sensibles à la dessiccation comme *I. ricinus*, des saisons estivales trop chaudes et sèches peuvent être très néfastes à leur survie et activité. Ainsi, le changement climatique en cours ne se traduit pas forcément partout par une augmentation des populations de tiques, mais parfois par un déplacement des aires où elles peuvent survivre et être actives.

Par le biais de leur influence sur les populations de leurs hôtes vertébrés et sur les comportements et pratiques humaines, les changements climatiques vont aussi influer indirectement sur les populations de tiques. À titre d'exemple, une augmentation des cervidés est constatée

(1) Voir la fiche "*Ixodes ricinus* : une tique ubiquiste" des mêmes auteurs, dans ce numéro.

en Europe depuis les années 1980 (photo 1). Elle est due aux hivers plus doux, à une augmentation de la durée des périodes de végétation propices et, dans certaines régions, à la reforestation et à une baisse des quotas de chasse. Elle a sans doute permis une augmentation des populations de tiques dont ils sont des hôtes très importants. L'impact des changements climatiques sur les populations de vertébrés réservoirs d'agents pathogènes transmis par les tiques aura aussi une incidence sur les maladies associées. Enfin, des conditions météorologiques plus propices aux activités de plein air augmentent aussi la probabilité de contact entre les tiques, les hommes et leurs animaux de compagnie.

1. **Hôte vertébré.** Les populations de cervidés sont en augmentation en Europe en raison des hivers plus doux, des modifications du paysage et, dans certaines régions, des baisses des quotas de chasse.

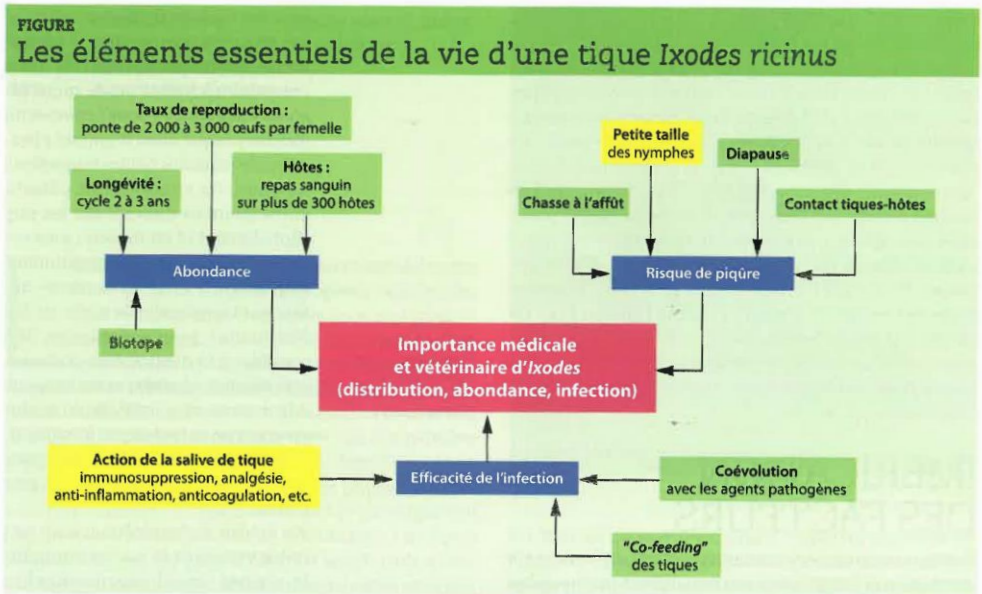
PHOTO : D. R.

IMPACT SANITAIRE : PAS SI SIMPLE, NI DIRECT

En Europe, l'impact des conditions climatiques sur l'incidence des maladies transmissibles par les tiques a été essentiellement étudié en santé humaine, et pour *I. ricinus*. Par exemple, les variations annuelles de températures et l'incidence de la borréliose de Lyme chez l'homme sont clairement reliées [23]. À petite échelle, le rapprochement des périodes d'activité des tiques vectrices et des données climatiques est éclairant, mais sur plusieurs années, un lien direct entre climat et incidence des maladies dues aux tiques est plus difficile à identifier (figure). Les hôtes des tiques (rongeurs, cervidés, oiseaux, etc.) participent pour beaucoup à l'incidence des maladies vectorisées en raison de leur influence sur l'abondance des tiques, mais aussi en tant que réservoirs d'agents pathogènes. Pour prévoir l'évolution de cette incidence, il faudrait savoir prévoir l'impact du réchauffement climatique sur ces populations de même que sur la persistance et le développement des agents pathogènes dans leurs hôtes vertébrés et invertébrés (viabilité, sélection de souches, taux de multiplication, impact sur le système immunitaire dont celui des tiques, etc.).

Pour des agents pathogènes qui génèrent des infections courtes chez leurs hôtes, l'allongement des saisons d'activité des tiques, dû à un climat plus doux, et la synchronisation de l'activité des différents stades engendreront certainement une augmentation de leur transmission. Le processus de "*co-feeding*" est ici en cause, qui correspond à la transmission de l'agent pathogène d'une tique à une autre, lors de gorgements simultanés en des sites proches sur un même animal, même non infecté (photos 2a à 2c) [20].

FIGURE
Les éléments essentiels de la vie d'une tique *Ixodes ricinus*



Sont représentés ici les éléments qui contribuent à expliquer l'importance d'*I. ricinus* en médecine humaine et vétérinaire. Sont encadrés en rouge les facteurs sur lesquels le climat a un impact (modifié d'après G. Foldavi).

2. *Co-feeding* de tiques *Ixodes ricinus* : les tiques peuvent se transmettre un agent pathogène au cours de gorgements simultanés sur un même animal, même non infecté.

PHOTOS : A. BLISNICK, N. BOULANGER, S. BONNET

Les contacts entre les tiques et les hôtes vertébrés étant affectés par les changements climatiques, le risque sanitaire vectorisé le sera aussi. L'évolution observée de l'incidence des maladies, quelles qu'elles soient, ne peut pas non plus être dissociée des actions sanitaires humaines (nouveaux traitements, campagnes de prévention, déclaration obligatoire ou non, vaccination, etc.) et de l'évolution des méthodes de diagnostic. Des changements politiques et sociaux peuvent avoir également un impact sur le risque infectieux associé aux tiques (se référer à la fin de l'ère communiste dans certains pays d'Europe centrale) [10, 19].

La corrélation rapportée en Hongrie entre l'augmentation des cas de borréliose et celle (non significative) des températures (+ 0,4 °C/an en 13 ans de suivi) reste sujette à caution [23]. La période étudiée est trop courte, et aucun autre facteur de la dynamique complexe de cette maladie n'a ici été pris en compte [9]. En Norvège, la densité des cervidés et l'incidence de la borréliose de Lyme ont bien été reliées, mais il a aussi pu être démontré que ce facteur unique n'était pas le seul impliqué [16].

L'augmentation des températures, des densités de tiques *(I. ricinus)* et des cas d'encéphalites à tiques a été corrélée à celle des cervidés en Suède dans la première partie d'une étude (1980-1990). Toutefois, dans la seconde période étudiée (1990-2010), l'augmentation encore plus importante des cas d'encéphalites était concomitante d'une diminution des cervidés [7]. Les tiques se seraient "tournées" vers des hôtes différents (rongeurs réservoirs du virus), augmentant ainsi le risque de transmission. Dans ce cas, le risque sanitaire associé au réchauffement n'est pas lié directement aux densités de tiques, mais à un changement de leurs préférences trophiques. Toujours pour l'encéphalite à tiques, dans les pays baltes, une très grande hétérogénéité temporelle et spatiale de l'incidence de cette maladie a été constatée de 1970 à 2000 [22]. Le changement climatique, global et uniforme dans toute cette région, ne peut donc, ici non plus, être seul en cause.

Conclusion

S'il est évident que les changements climatiques ont une influence sur la distribution des populations de tiques en Europe, il est non moins manifeste qu'ils ne sont pas nécessairement la seule et/ou majeure cause de l'augmentation actuelle de l'incidence de certaines maladies dues aux tiques. De multiples facteurs agissent à la fois sur les populations de tiques et l'incidence des maladies transmissibles par les tiques (abondance des hôtes vertébrés, changements d'habitat et de biotope, évolutions socio-économiques, mesures de santé publique ou vétérinaire, etc.). Déterminer le rôle de chacun de ces facteurs impose la réalisation d'études approfondies.

Dans les modèles prédictifs sur la distribution des tiques et des agents pathogènes qu'elles transmettent, le climat est à prendre en compte tout autant que la végétation et les hôtes, et que la diversité de réponses des tiques aux conditions climatiques, y compris au sein d'une même espèce. Pour prédire l'évolution du risque potentiel d'émergence des maladies transmissibles par les tiques, il ne suffit donc pas d'établir des cartes précises de distribution, il est aussi nécessaire de continuer à approfondir nos connaissances des systèmes vectoriels en incluant l'écologie des différentes espèces de tiques, les interactions tiques-hôtes-agents pathogènes, et l'impact du climat sur ces trois acteurs. ▮

Summary

The impact of climate change on tick populations in Europe: myths and realities

▶Ticks are the main vectors of pathogens affecting animal and human health in Europe. Most species of ticks are very sensitive to climatic conditions. So, what is the impact of ongoing climate change on the distribution of ticks and associated diseases? The underlying dynamics are complex: direct and indirect impacts are difficult to differentiate, and other factors, including those of anthropogenic origin, come into play. The effects of these various factors are of interest to all components of the vector system. The link between climate change and tick risk is neither direct nor uniform.

Keywords

Climate change, tick-borne diseases, *Ixodes ricinus*, *Hyalomma marginatum*.

Références

6. Gray JS, Dautel H, Estrada-Pena A et coll. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in europe. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 2009;2009:593232.

10. Kilpatrick AM, Randolph SE. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. Lancet. 2012;380(9857):1946-1955.

11. Leger E, Vourc'h G, Vial L et coll. Changing distributions of ticks: causes and consequences. Exp. Appl. Acarol. 2013;59(1-2):219-244.

12. Lindgren E, Andersson Y, Suk JE et coll. Public health. Monitoring EU emerging infectious disease risk due to climate change. Science. 2012;336(6080):418-419.

17. Ogden NH. Climate change and vector-borne diseases of public health significance. FEMS microbiology letters. 2017;364(19).

19. Randolph SE. Evidence that climate change has caused "emergence" of tick-borne diseases in Europe? Intern. J. Med. Microbiol. 2004;293(Suppl 37):5-15.

Sarah I. Bonnet*, Adrien Blisnick*, Nathalie Boulanger, Frédéric Stachurski***,****, Laurence Vial***,****

* UMR Bipar 956 Inra, École nationale vétérinaire d'Alfort, Anses, université Paris-Est, groupe Interactions tiques agents pathogènes, Maisons-Alfort, sbonnet@vet-alfort.fr ; adrien.blisnick@anses.fr
** EA : 7290 : Virulence bactérienne précoce : groupe Borrelia, facultés de médecine et de pharmacie, université de Strasbourg, Centre national de référence Borrelia nboulanger@unistra.fr
*** Cirad, UMR Astre, 34398 Montpellier
**** Astre, Cirad, Inra, université de Montpellier, 34090 Montpellier
frederic.stachurski@cirad.fr
laurence.vial@cirad.fr

MALADIES VECTORIELLES

Ixodes ricinus : une tique ubiquiste

Réputée sensible à la dessiccation, elle est répartie dans quasiment toute l'Europe, donc capable de survivre dans des environnements variés. Elle dispose de stratégies efficaces pour cela.

Conflit d'intérêts

Aucun.

Ixodes ricinus est l'espèce européenne la plus étudiée, notamment en lien avec les changements climatiques. Elle est largement répandue (photo et figure).

I. ricinus, espèce européenne la plus abondante et à la répartition géographique la plus large, est sans conteste la plus importante en Europe pour la santé humaine. À l'homme, qui constitue un hôte accidentel, elle est en effet susceptible de transmettre des bactéries responsables de la borréliose de Lyme, de rickettsioses et de l'anaplasmose, des virus dont celui de l'encéphalite à tiques (TBE), ou encore des parasites responsables de la babésiose (ou piroplasmose). Parmi les agents pathogènes les plus importants qu'elle transmet aux animaux de rente, sont retrouvés ceux responsables de l'anaplasmose ou de la babésiose. Aux chevaux, *I. ricinus* peut transmettre des *Borrelia spp.*, *A. phagocytophilum* ou encore le virus de l'encéphalite infectieuse équine. Enfin, pour les animaux de compagnie et notamment pour les chiens, elle peut être responsable d'anaplasmose.

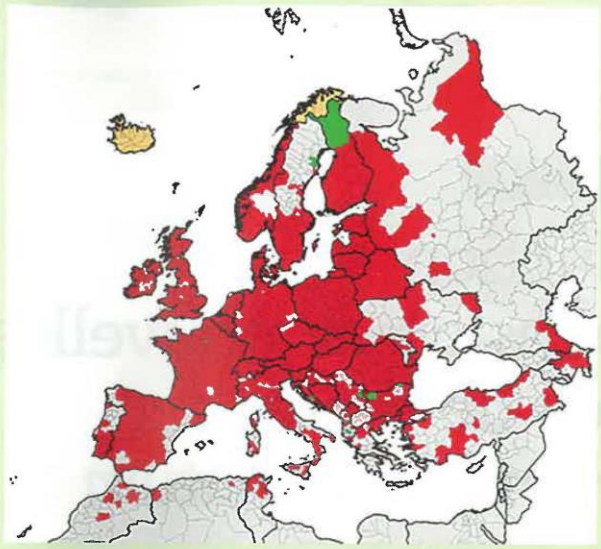
Cette tique dure est exophile. Elle passe en général plus de 95 % de la durée de son cycle dans le milieu extérieur, à digérer son repas sanguin, à muer ou à pondre pour la femelle, à être en diapause quand les conditions ne lui sont pas favorables, ou à attendre ses hôtes à l'affût [1]. Une humidité relative supérieure à 80 % est nécessaire à sa survie, expliquant sa présence dans les régions où la végétation est abondante et les précipitations modérées à fortes (elle est absente du pourtour méditerranéen). Selon les conditions climatiques et la disponibilité des hôtes, son cycle complet dure de 2 à 6 ans (3 en moyenne). *I. ricinus* s'adapte-t-elle moins vite pour autant aux changements environnementaux ? Retrouvée principalement dans les forêts mixtes ou caduques, elle est aussi identifiée sous divers microclimats lorsque ses très nombreux hôtes potentiels (plus de 300 espèces différentes possibles) y sont présents, par exemple en zones péri-urbaines [16]. Elle peut résister à des températures "trop" froides ou "trop" chaudes, et à un manque d'humidité, en se cachant dans la litière végétale pour survivre. Elle passe ainsi sa vie à monter sur la végétation, pour y attendre un hôte, et à descendre dans la litière pour se réhydrater. Infectée par *Borrelia* (agent de la maladie de Lyme), elle demeure plus longtemps "en haut" à l'affût, ce qui augmente sa probabilité de trouver un hôte à qui elle pourra transmettre la bactérie [8].

L'activité ("affût") d'*I. ricinus* varie en fonction des saisons et des zones géographiques [3, 4, 10, 15, 18]. Classiquement, en France, un pic est observé en avril-mai-juin, puis un second moins important de septembre à novembre. En climat doux, elle peut néanmoins rester active de février à novembre, voire toute l'année. La strate herbacée, déterminante pour l'humidité relative locale, et la disponibilité des hôtes (qualité/quantité) vont aussi influencer les périodes d'activité de la tique.

Mâle, femelle, nymphe et larve d'*Ixodes ricinus*.

PHOTO : A. BLISNICK

FIGURE
Distribution connue d'*I. ricinus* en janvier 2018



Des travaux récents suggèrent qu'en Afrique du Nord, ce serait une autre espèce, nouvellement décrite, *Ixodes inopinatus*, qui serait retrouvée, et non *I. ricinus* (carte ECDC, EFSA) et [6].

La distribution d'*I. ricinus* a significativement évolué en Europe au cours des dernières décennies. En Suède par exemple, et depuis les années 1980, une expansion de la tique vers le Nord et sa montée en altitude au-delà de 1 500 m ont été rapportées [7, 17]. Suivant les régions considérées, ces changements sont attribués aux modifications du couvert végétal (reforestation) et à l'exploitation des sols (déforestation, urbanisation, etc.), à l'augmentation des populations de cervidés ou de rongeurs, ou encore aux changements climatiques [2, 5, 11-13]. En effet, des hivers plus doux et moins longs ainsi que des printemps et des automnes prolongés vont être propices à l'expansion d'*I. ricinus* quand, inversement, le réchauffement climatique pourrait la faire disparaître là où le climat devient trop sec et trop chaud.

L'influence des changements climatiques sur l'abondance d'*I. ricinus* dans les zones au climat propice où elle est endémique est difficile à évaluer. L'impact direct de la température et de l'humidité relative sera subtil voire nul, étant donné l'abondance des hôtes et face aux changements dans la configuration du paysage et de la végétation. Une augmentation de température pourrait être néfaste à *I. ricinus* en augmentant sa mortalité et en diminuant ses périodes d'activité. Inversement, cela pourrait aussi accroître sa vitesse de développement, allonger les périodes d'activité en automne et au printemps, augmenter la disponibilité des hôtes et diminuer la mortalité en hiver [11, 14]. Les effets néfastes du froid sont cumulatifs, plus de 30 jours à -10 °C étant mortels [9]. Il n'existe pas de suivis longitudinaux réalisés sur d'assez longues périodes pour évaluer l'impact des changements climatiques sur les populations endémiques d'*I. ricinus*. Sur quelques années, peu de variations des densités d'*Ixodes* sont observées dans l'est de la France (données non publiées du CNR *Borrelia*[1]. En forêt de Sénart, au sud de Paris, bien que des variations interannuelles de populations d'*I. ricinus* aient été reliées au nombre de jours de gel de l'année en cours entre 2008 et 2014, ces variations sont vraisemblablement beaucoup plus associées aux fluctuations de densité des populations des hôtes vertébrés et à la gestion de la faune et de la flore [15]. ▮

(1) http://www.chru-strasbourg.fr/Les-centres-de-reference/Borrelia

Références

1. Bonnet S, Huber K, Joncour G et coll. Biologie des tiques. In: NB, KM editors. Tiques et maladies à tiques : biologie, écologie évolutive, épidémiologie, Marseille, France. IRD. 2016:336.

2. Brownstein JS, Skelly DK, Holford TR et coll. Forest fragmentation predicts local scale heterogeneity of Lyme disease risk. Oecologia. 2005;146(3):469-475.

3. Daniel M, Maly M, Danielova V et coll. Abiotic predictors and annual seasonal dynamics of *Ixodes ricinus*, the major disease vector of central Europe. Parasites & vectors. 2015;8:478.

4. Eisen RJ, Eisen L, Ogden NH et coll. Linkages of weather and climate with *Ixodes scapularis* and *Ixodes pacificus (Acari: Ixodidae)*, enzootic transmission of Borrelia burgdorferi, and Lyme disease in North America. J. Med. Entomol. 2016;53(2):250-261.

5. Estrada-Pena A, Estrada-Sanchez A, Estrada-Sanchez D. Methodological caveats in the environmental modelling and projections of climate niche for ticks, with examples for *Ixodes ricinus (Ixodidae)*. Vet. Parasitol. 2015;208(1-2):14-25.

6. Estrada-Pena A, Nava S, Petney T. Description of all the stages of *Ixodes inopinatus* n. sp. *(Acari: Ixodidae)*. Ticks and tick-borne diseases. 2014;5(6):734-743.

7. Gilbert L. Altitudinal patterns of tick and host abundance: a potential role for climate change in regulating tick-borne diseases? Oecologia. 2010;162(1):217-225.

8. Herrmann C, Gern L. Search for blood or water is influenced by Borrelia burgdorferi in *Ixodes ricinus*. Parasites & Vectors. 2015;8:6.

9. Knulle W, Dautel H. Cold hardiness, supercooling ability and causes of low-temperature mortality in the soft tick, *Argas reflexus*, and the hard tick, *Ixodes ricinus (Acari: Ixodoidea)* from central Europe. J. Insect. Physiol. 1997;43(9):843-854.

10. Lauterbach R, Wells K, O'Hara RB et coll. Variable strength of forest stand attributes and weather conditions on the questing activity of *Ixodes ricinus* ticks over years in managed forests. PloS One. 2013;8(1):e55365.

11. Lindgren E, Talleklint L, Polfeldt T. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. Environ Health Perspect. 2000;108(2):119-123.

12. Medlock JM, Hansford KM, Bormane A et coll. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. Parasites & vectors. 2013;6:1.

13. Mysterud A, Easterday WR, Stigum VM et coll. Contrasting emergence of Lyme disease across ecosystems. Nature communications. 2016;7:11882.

14. Ogden NH, Lindsay LR, Beauchamp G et coll. Investigation of relationships between temperature and developmental rates of tick *Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae)* in the laboratory and field. J. Med. Entomol. 2004;41(4):622-633.

15. Paul RE, Cote M, Le Naour E et coll. Environmental factors influencing tick densities over seven years in a French suburban forest. Parasites & Vectors. 2016;9(1):309.

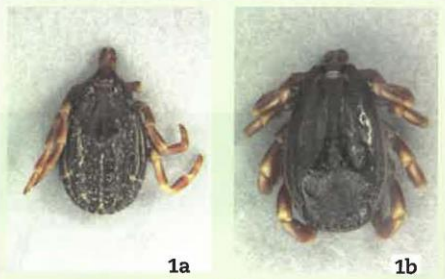
16. Rizzoli A, Silaghi C, Obiegala A et coll. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. Frontiers in public health. 2014;2.

17. Talleklint L, Jaenson TG. Increasing geographical distribution and density of *Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae)* in central and northern Sweden. J. Med. Entomol. 1998;35(4):521-526.

18. Vassalo M, Paul RE, Perez-Eid C. Temporal distribution of the annual nymphal stock of *Ixodes ricinus* ticks. Exp. Appl. Acarol. 2000;24(12):941-949.

Sarah I. Bonnet*, Adrien Blisnick*, Nathalie Boulanger, Frédéric Stachurski***,****, Laurence Vial***,****

* UMR Bipar 956 Inra, École nationale vétérinaire d'Alfort, Anses, université Paris-Est, groupe Interactions tiques agents pathogènes, Maisons-Alfort, sbonnet@vet-alfort.fr ; adrien.blisnick@anses.fr
** EA : 7290 : Virulence bactérienne précoce : groupe Borrelia, facultés de médecine et de pharmacie, université de Strasbourg, Centre national de référence Borrelia nboulanger@unistra.fr
*** Cirad, UMR Astre, 34398 Montpellier
**** Astre, Cirad, Inra, université de Montpellier, 34090 Montpellier frederic.stachurski@cirad.fr laurence.vial@cirad.fr



Femelle à jeun (1a) et **mâle** (1b) de *Hyalomma marginatum*.
PHOTOS : L. VIAL (CIRAD), L. SOLDATI (CBGP)

MALADIES VECTORIELLES

Introduction et expansion de **nouvelles espèces de tiques : *Hyalomma marginatum***

Conflit d'intérêts
Aucun.

Cette tique exotique a pu gagner la France continentale grâce aux oiseaux migrateurs ou aux ongulés dont les mouvements entre pays s'intensifient. Elle aurait pu alors profiter de conditions devenues plus favorables pour s'installer.

L'apparition d'une maladie vectorielle dans une région jusque-là indemne est intimement liée à la capacité de dispersion de ses vecteurs. Les tiques ne volant pas, elles ont une capacité de dissémination intrinsèque limitée. Cependant, en raison de la longueur des repas sanguins des tiques dures, qui avoisinent généralement une semaine, elles peuvent être transportées sur de très longues distances par le biais de leurs hôtes, qu'ils se déplacent par leurs propres moyens (oiseaux migrateurs) ou qu'ils soient véhiculés par les hommes (animaux de rente, de loisirs ou de compagnie). Mais elles ne peuvent s'établir dans une nouvelle région que si les conditions climatiques qui y règnent sont propices à l'accomplissement du cycle. Dans le cas de *Hyalomma marginatum*, il est impossible de déterminer si ce sont ces conditions qui ont été modifiées et ont permis l'installation récente de l'espèce à partir de nymphes gorgées introduites par des oiseaux infestés, ou si c'est l'augmentation du transport d'ongulés parasités par des tiques adultes, donc l'intensification des activités humaines, qui est responsable de cette installation.

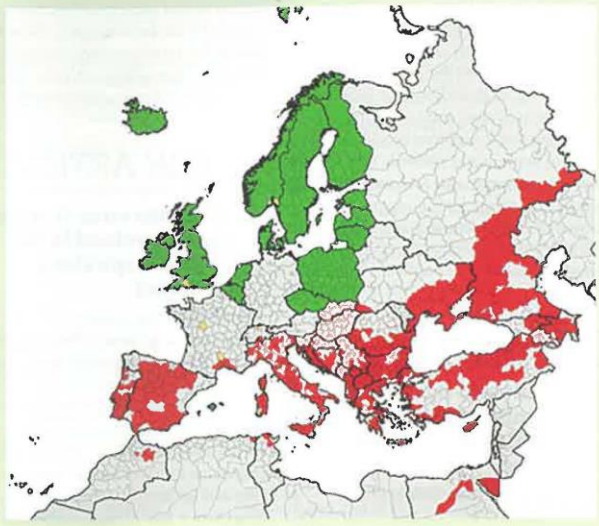
Hyalomma marginatum est présente dans la péninsule ibérique, mais aussi en Italie, en Turquie, autour de la mer Noire et au Maghreb[1] (figure).

Vecteur de *Babesia caballi*, agent d'une piroplasmose équine, comme le sont aussi *Rhipicephalus bursa* et *Dermacentor marginatus*, tiques endémiques en France, *H. marginatum* est surtout connue pour être un des principaux vecteurs du virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (FHCC), maladie humaine caractérisée par des symptômes sévères et un taux de mortalité parfois élevé [1]. Deux cas autochtones de FHCC, dont un mortel dû à une piqûre de tique (l'autre était consécutif à une infection nosocomiale), ont été signalés en septembre 2016 en Espagne [9]. Plusieurs années auparavant, du génome viral avait été détecté dans une autre région du pays et dans une autre tique vectrice, *H. lusitanicum* [3]. La FHCC est donc présente en Espagne, mais cela était sans conséquence pour sa voisine française tant que le vecteur n'y était pas installé.

Hyalomma marginatum est connue en Corse depuis très longtemps (photos 1a et 1b). En revanche, les rares mentions de la présence de cette tique en France continentale n'étaient jusqu'alors pas convaincantes : l'identification restait incertaine ou bien des tiques immatures accidentellement introduites par des oiseaux migrateurs étaient observées [10]. De récentes données prouvent que cette espèce est désormais installée sur le pourtour méditerranéen français. De faibles effectifs ont d'abord été retrouvés dans quelques troupeaux, à l'occasion d'une étude conduite de 2007 à 2010 pour rechercher *Anaplasma phagocytophilum* dans les tiques infestant les chevaux en Camargue [2]. D'autres sites, dont l'un très infesté, ont ensuite été identifiés autour de Montpellier, toujours sur les chevaux. Ces derniers étant, d'après une étude récemment réalisée en Corse, l'hôte préférentiel de *H. marginatum*, une enquête a été effectuée au printemps 2017 auprès d'environ 80 structures hippiques (pensions, élevages, organisateurs de randonnées équestres, etc.) situées dans six des sept départements du littoral méditerranéen français (Bouches-du-Rhône non incluses) afin de mieux connaître la distribution actuelle de l'espèce

(1) https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/hyalomma-marginatum-current-known-distribution-january-2018)

FIGURE
Distribution connue de *Hyalomma marginatum* en janvier 2018



Cette carte ne prend pas encore en compte toutes les observations concernant la présence de la tique sur le littoral méditerranéen français (carte ECDC, EFSA).

(données non publiées) [6]. Comme *H. marginatum* est une tique exophile, seules les structures dont les animaux ne sont pas gardés en permanence en box ou en paddock, mais pâturent au moins en partie sur des parcelles naturelles, boisées ou même forestières, ont été visitées. *Hyalomma marginatum* a été retrouvée des Pyrénées-Orientales au Var en passant par l'Aude, l'Hérault et le Gard. Elle n'a en revanche pas été collectée dans les Alpes-Maritimes, alors que le climat de la partie littorale du département lui convient très probablement. De façon plus générale, les observations font penser que *H. marginatum* n'occupe pas encore la totalité de sa niche écologique. La tique a parfois été retrouvée de façon localisée (autour du massif des Maures dans le Var, dans les Corbières dans l'Aude), parfois de façon plus large (Pyrénées-Orientales et Hérault). Dans quelques cas, une seule tique adulte a été collectée malgré l'examen de 10 à 25 chevaux. Il n'est alors pas certain que l'espèce soit vraiment installée dans ces élevages, la présence d'un seul adulte pouvant être le témoin du détachement sur place d'une nymphe transportée par un oiseau et qui, une fois métamorphosée en adulte, est retrouvée sur un cheval.

Les oiseaux, et notamment les passereaux (merles, rouges-gorges, grives, etc.) qui passent beaucoup de temps au sol font partie, aux côtés des petits mammifères (lièvres, lapins, hérissons, etc.), des hôtes des stades immatures de *H. marginatum*. La tique aurait pu être introduite en France par des oiseaux migrateurs. Les phases immatures (larve et nymphe) durent 2 à 3 semaines : les oiseaux parasités en Afrique du Nord ou en Espagne ont le temps de gagner la France (voire le Royaume-Uni et l'Allemagne [7, 8]). L'introduction de nymphes de *H. marginatum* en France continentale peut être ancienne. Pourquoi n'est-ce que récemment que des populations stables et importantes de la tique ont pu s'implanter en France ? Le changement climatique en cours explique-t-il cette installation ? La métamorphose nymphale semble n'intervenir en laboratoire que lorsqu'un certain nombre de degrés-jours (cumul des températures quotidiennes moyennes au-dessus de la température minimale de développement, qui est de 14 à 16 °C) a été atteint [4].

L'espèce étant présente en Espagne, elle a pu aussi être introduite en France à l'occasion du transport d'animaux infestés par des tiques adultes (chevaux et bovins à destination des structures équestres camarguaises, par exemple). Dans les Pyrénées-Orientales, elle a pu traverser la frontière sur des sangliers ou des chevreuils infestés en Espagne. L'implication des hôtes du stade adulte a été considérée comme un risque plus probable de dissémination du sud vers le nord des Balkans des populations de tiques d'Europe de l'Est que ne l'est celle des oiseaux infestés par les tiques immatures [4].

Le même type de questions se pose pour *H. scupense* identifiée en Corse dans une vingtaine de communes en 2014-2015 [5]. Elle transmet *Theileria annulata* (agent de la theilériose bovine tropicale). Comment et pourquoi cette tique commune au Maghreb, mais dont les trois stades infestent normalement les bovins, ce qui rend peu probable l'introduction par des oiseaux migrateurs, a-t-elle pu s'installer sur l'île ? Cela reste indéterminé.

Ainsi, les déplacements et les installations de nouvelles espèces de tiques dans des régions jusque-là indemnes sont parfaitement envisageables, car si les tiques ne se déplacent pas sur de longues distances par leurs propres moyens, ce n'est en rien un obstacle insurmontable. ▮

Références

1. Bente DA, Forrester NL, Watts DM et coll. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. Antiviral research. 2013;100(1):159-189.

2. Chastagner A, Bailly X, Leblond A et coll. Single genotype of *Anaplasma phagocytophilum* identified from ticks, Camargue, France. Emerging infectious diseases. 2013;19(5): 825-827.

3. Estrada-Peña A, Palomar AM, Santibáñez P et coll. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, southwestern Europe, 2010. Emerging infectious diseases. 2012;18:179-180.

4. Gray JS, Dautel H, Estrada-Pena A et coll. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 2009;2009:593232.

5. Grech-Angelini S, Stachurski F, Lancelot R et coll. First report of the tick *Hyalomma scupense* (natural vector of bovine tropical theileriosis) on the French Mediterranean island of Corsica. Vet. Parasitol. 2016;216:33-37.

6. Grech-Angelini S, Stachurski F, Lancelot R et coll. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting cattle and some other domestic and wild hosts on the French Mediterranean island of Corsica. Parasites & Vectors. 2016;9(1):582.

7. Jameson LJ, Morgan PJ, Medlock JM et coll. Importation of *Hyalomma marginatum*, vector of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus, into the United Kingdom by migratory birds. Ticks and tick-borne diseases. 2012;3(1):95-99.

8. Kampen H, Poltz W, Hartelt K et coll. Detection of a questing *Hyalomma marginatum* adult female (Acari, Ixodidae) in southern Germany. Experimental and Applied Acarology. 2007;43:227-231.

9. Negredo A, De la Calle-Prieto F, Palencia-Herrejón E et coll. Autochthonous Crimean-Congo hemorrhagic fever in Spain. New England J. Med. 2017;377(2):154-161.

10. Vial L, Stachurski F, Leblond A et coll. Strong evidence for the presence of the tick *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 in southern continental France. Ticks and tick-borne diseases. 2016;7(6): 1162-1167.

Title : Characterization of IrSPI, a serine protease inhibitor implicated both in tick feeding and tick bacterial infection of *Ixodes ricinus*.

Keywords : *Ixodes ricinus*, serine protease inhibitor, tick-host-pathogen interaction, host immune-responses modulation

Abstract :

Ixodes ricinus tick species, the most abundant and widespread tick in Europe, is an important vector of pathogens affecting both animal and human health. To replace the use of acaricides that generate environmental contamination and resistances, new environmentally sustainable approaches providing broad protection against ticks and tick-borne pathogens (TBP) are urgently needed. Such a development requires improved understanding of the biology of ticks and more particularly of their interactions with their vertebrate hosts and TBP. Tick saliva is an essential biofluid for ticks, as its proteolytic, anticoagulant, immunomodulatory, analgesic and anti-inflammatory activities allow them to acquire their blood meal under optimal conditions. Moreover, injection of saliva during blood feeding represents the principal route by which TBP are transmitted to the host. To understand the molecular mechanisms involved in TBP transmission, as well as to identify putative vaccine candidates against *I. ricinus*, salivary glands from bacteria infected and uninfected ticks were previously compared by high throughput transcriptomics. The most up-regulated transcript following infection was IrSPI, which belongs to the Kunitz/BPTI inhibitor family. Functional analyses via RNAi knockdown experiments revealed that IrSPI enhances both blood feeding and bacterial burden in the salivary glands. This present PhD work concerns then the structural, biochemical and functional characterization of IrSPI as a molecule involved in tick-host-pathogen interactions. Our aim was first to define the structure of *IrSPI* gene but, unfortunately, while our results have led to progress on this issue, we have not been able to get the full sequence. Then, the dynamic of *IrSPI* expression was evaluated during both tick feeding and colonization of ticks by pathogens, showing that its expression is induced by blood feeding and TBP but not by *Escherichia coli* that is not transmitted by *I. ricinus*. In addition, our results shown the expression of *IrSPI* in several tick organs, suggesting its implication in several functions in tick physiology. Among them, the discovery of the injection of IrSPI, through the saliva, to the vertebrate host allowed us to consider a role in host responses to tick bite. Evaluation of IrSPI effect on host showed no impact on coagulation through extrinsic pathway, as determined by analysis of thrombin generation time and by fibrinolysis, or in angiogenesis. However, it inhibited the proliferation of mitogen-stimulated T $CD4^+$ lymphocytes and increased unstimulated-B cell proliferation. In addition, IrSPI also modulated cytokine production from macrophages and splenocytes, repressing significantly most of proinflammatory cytokines and chemokines. Thus, we demonstrated that IrSPI plays a role in modulating the host immune response during blood feeding. Finally, preliminary results in the identification of the protein's interactors open many research perspectives for understanding how IrSPI acts in tick physiology and counteracts host responses to tick injury and pathogen transmission.

Titre : Caractérisation de IrSPI, un inhibiteur de sérine protéase impliqué dans la prise du repas sanguin et l'infection bactérienne des tiques *Ixodes ricinus*.

Mots-clés : *Ixodes ricinus*, inhibiteur de sérine protéase, interactions tique-hôte-agent pathogènes, modulation des réactions immunitaires de l'hôte.

Résumé :

Ixodes ricinus est l'espèce de tique la plus abondante et ayant la plus vaste répartition géographique en Europe. Elle est le vecteur de nombreux agents pathogènes d'importance en santé publique et vétérinaire. Le remplacement des acaricides générant pollution environnementale et apparition croissante de résistances requiert le développement urgent de nouvelles stratégies de lutte efficaces contre les tiques et les agents pathogènes qu'elles transmettent. La découverte de telles stratégies passe nécessairement par une meilleure connaissance des interactions entre les tiques, leurs hôtes et les agents pathogènes transmis. La salive de tique, à l'interface de ces interactions, est un fluide essentiel pour ces arthropodes et possède notamment des propriétés protéolytiques, anticoagulantes, immunomodulatrices, analgésiques, et anti-inflammatoires qui permettent à la tique de réaliser ses repas sanguins extrêmement longs. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission des agents pathogènes et pour identifier de possibles candidats vaccinaux contre *I. ricinus*, une étude transcriptomique comparative entre des glandes salivaires infectées et non infectées par la bactérie *Bartonella henselae* a été antérieurement réalisée. Le transcrit le plus surexprimé suite à cette infection était IrSPI, un inhibiteur de sérine protéase de la famille des Kunitz. Les analyses fonctionnelles antérieures par ARN interférence ont montré l'implication de ce gène dans le gorgement et l'infection des glandes salivaires par *B. henselae*. Ainsi, les travaux de thèse présentés ici ont concerné l'analyse structurelle, biochimique et fonctionnelle de IrSPI en tant que molécule impliquée dans les interactions tick-hôte-agents pathogènes. Le premier objectif était de définir la structure et la séquence du gène *IrSPI* mais, malheureusement, bien que nos résultats aient permis des avancées sur cette question, nous n'avons pu obtenir la totalité de sa séquence. Dans un second temps, la dynamique d'expression d'*IrSPI* a été évaluée au cours du gorgement et de l'infection des tiques par différents agents pathogènes, montrant que son expression est induite par le repas sanguin, par des agents transmis par la tique mais pas par *Escherichia coli*, bactérie non transmise. De plus, nos résultats ont montré l'expression de *IrSPI* dans plusieurs organes de la tique, suggérant son implication dans diverses fonctions au sein de ce vecteur. Parmi elles, la mise en évidence de l'injection, par la salive, de la protéine à l'hôte vertébré nous a permis d'envisager un rôle sur les réponses de l'hôte à la piqûre de tique. Nos résultats n'ont montré aucune implication dans la voie extrinsèque de la coagulation ni dans la fibrinolyse, ni dans l'angiogenèse. En revanche, ils ont démontré que IrSPI inhibe la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ sous stimulation mitogénique quand chez des lymphocytes B non stimulés IrSPI, induit une hausse de la prolifération. De plus, IrSPI a montré une action négative significative sur la production de la majorité des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires produites par les macrophages et les splénocytes. Ainsi, IrSPI, correspond à un des composants salivaires d'*I. ricinus* lui permettant de moduler la réponse immune de l'hôte pour lui permettre de prélever son repas sanguin tout en favorisant la transmission des agents pathogènes. Enfin, des résultats préliminaires dans l'identification des interactants de IrSPI à la fois chez la tique et l'hôte vertébré ouvrent de nombreuses voies de recherche quant à la compréhension de ses fonctions.