



**THESE**  
présentée pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de STRASBOURG**

Discipline : Sciences du Vivant  
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

EA4438 Physiopathologie et médecine translationnelle  
Groupe de recherche "Borréliose de Lyme"

**MARCHAL Claire**

**Inflammation cutanée et borréliose de Lyme : rôle de  
l'immunité innée et de la tique dans la transmission à  
l'homme de *Borrelia burgdorferi*.**

Soutenue publiquement le 16 novembre 2009

Membres du jury :

Directeur de thèse : Dr. BOULANGER Nathalie, Faculté de Pharmacie, Strasbourg, France

Co-directeur de thèse : Pr. JAULHAC Benoît, Faculté de médecine, Strasbourg, France

Rapporteur interne : Pr. SABATIER Laurence, IPHC. Département des Sciences analytiques  
Strasbourg, France

Rapporteur externe : Dr. GERN Lise, Institut de Biologie, Neuchâtel, Suisse

Rapporteur externe : Dr. BULET Philippe, TIMC IMAC, CNRS UMR 5525 UJF  
Archamps, France

Examineur : Dr. BOYE Thierry, Hôpital Ste Anne, Toulon, France333

## THESE

présentée pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de STRASBOURG**

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**MARCHAL Claire**

# **Inflammation cutanée et borréliose de Lyme : rôle de l'immunité innée et de la tique dans la transmission à l'homme de *Borrelia burgdorferi*.**

Membres du jury :

Directeur de thèse : Dr. BOULANGER Nathalie, Faculté de Pharmacie, Strasbourg, France

Co-directeur de thèse : Pr. JAULHAC Benoît, Faculté de médecine, Strasbourg, France

Rapporteur interne : Pr. SABATIER Laurence, IPHC- Département des Sciences analytiques,  
Strasbourg, France

Rapporteur externe : Dr. GERN Lise, Institut de Biologie, Neuchâtel, Suisse

Rapporteur externe : Dr BULET Philippe, TIMC IMAC, CNRS UMR 5525 UGF  
Archamps, France

Examineur : Dr. BOYE Thierry, Hôpital Ste Anne, Toulon, France



EA4438 Physiopathologie et médecine translationnelle  
Groupe de recherche "Borréliose de Lyme"



## Remerciements

Je voudrais remercier le Prof. L. Sabatier, et les Drs L. Gern, P. Bulet et T. Boyé, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger mon travail.

Je tiens à remercier très sincèrement le Dr. N. Boulanger et le Prof. B. Jaulhac, pour leur soutien, leur présence de tous les jours, les connaissances et les conseils qu'ils m'ont apportés. Merci pour tout et pour tout ce que vous m'avez appris qui j'espère m'ont rendue meilleure.

Je remercie le Prof. Yves Piémont pour son accueil au sein de l'EA3432.

C'est grâce à de nombreuses collaborations que ce travail a pu être réalisé. Je remercie le Dr. B. Luft et X. Yang de l'Université de Stonybrook, New-York (USA) pour les protéines recombinantes de *Borrelia* ; le professeur B. Betschart et le Dr. L. Gern, Université de Neuchâtel (Suisse) pour leur aide dans le maintien de notre colonie de tiques ; le Dr. J. Hovius, Université d'Amsterdam (Hollande) pour Salp15 et les souches de *B. burgdorferi* ss 297 et celle déficiente en OspC ; le Dr. G. Andrei et le Dr. R. Snoeck pour leur aide dans la mise au point des cultures de kératinocytes humains primaires ; le Prof. T. Ganz, Université de UCLA (USA) pour l'anticorps anti-hBD-2 ; le Prof. D. Lipsker, CHU de Strasbourg pour l'immunohistochimie sur peau humaine ; Mr Becmeur, Service de chirurgie infantile Hôpital de Hautepierre Strasbourg pour les prélèvements cutanés ; le Prof. R. Gallo, Université de San-Diégó (USA) pour l'anticorps anti-LL37. Un grand merci à l'ensemble de ces personnes qui ont chacune contribué à l'aboutissement de ma thèse.

Je remercie la Région Alsace qui m'a permis de faire ma thèse grâce à son apport financier pour les deux dernières années de thèse.

Je remercie évidemment l'ensemble de l'équipe de bactériologie (Cathy, Elody, Aurélie, Sylvie, Chantal, Frédéric) et de pharmacie (Ghada, Noha, Cathy, Josiane, Valérie) et tous ceux que j'oublie qui m'ont accueillie au sein de cette équipe et qui m'ont soutenue tout au long de ce projet. Un grand merci pour votre présence, votre soutien de tous les jours et surtout dans les moments plus difficiles.

Je remercie enfin ma famille et mes amis, avec un clin d'œil pour Cécile, Christelle, Céline, Christine et François pour votre amour et votre présence durant cette période. Je sais que vous êtes toujours là pour me soutenir et m'aider. Merci.

Dernier merci pour tous ceux qui étaient là même pendant une courte période et que je ne reverrais peut être plus mais qui ont été présent tout de même.

# Sommaire

<b>Liste des abréviations</b>	<b>P.9</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>P.11</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction</b>	<b>P.14</b>
<b>I. La maladie de Lyme</b>	<b>P.16</b>
1. <u>Historique</u>	P.16
2. <u>Répartition géographique de la maladie de Lyme</u>	P.16
3. <u>La bactérie</u>	P.18
3.1. Caractères morphologiques et structuraux	P.18
3.2. Organisation du génome	P.19
3.2.1. Le génome de <i>Borrelia</i>	P.19
3.2.2. Les plasmides et leurs significations	P.20
3.3. Polymorphisme, diversité et taxonomie	P.21
4. <u>La tique <i>Ixodes</i> sp.</u>	P.22
4.1. Biologie de la tique	P.22
4.2. Morphologie et systématique	P.23
4.3. Cycle de développement des tiques	P.24
4.4. Répartition géographique	P.26
4.5. <i>Ixodes ricinus</i>	P.27
4.6. <i>Ixodes scapularis</i>	P.28
4.7. Ecologie et éthologie	P.28
4.8. Les hôtes des tiques	P.29
4.9. Physiologie du gorgement	P.30
4.10. L'intestin de la tique adulte	P.32
5. <u>Aspects cliniques de la borréliose de Lyme</u>	P.32
5.1. La phase précoce localisée	P.33
5.2. La phase précoce disséminée	P.34
5.2.1. Les manifestations cutanées	P.34
5.2.2. Les manifestations neurologiques ou neuroborrélioses et les manifestations cardiaques.	P.34
5.2.3. Les manifestations rhumatologiques	P.35
5.3. La phase tardive	P.36
5.4. Les traitements	P.37

<u>6. La peau et les maladies à transmission vectorielle</u>	P.37
6.1. La transmission de <i>Borrelia</i>	P.37
6.1.1. Expression des gènes induits par <i>Borrelia</i> dans la tique	P.38
6.1.2. La transmission de <i>Borrelia</i> de la tique à l'hôte : rôle d'OspC	P.40
6.1.3. Expression des gènes induits par <i>Borrelia</i> chez l'hôte vertébré	P.42
6.1.3.1. Echappement de <i>Borrelia</i>	P.42
6.1.3.2. Les adhésines de <i>Borrelia</i>	P.44
6.1.3.2.1 Liaison aux intégrines : <b>l'adhésine P66</b>	P.44
6.1.3.2.2. Liaison à la fibronectine : <b>l'adhésine BBK32</b>	P.44
6.1.3.2.3. Liaison à la décorine : <b>les adhésines DbpA et DbpB</b>	P.45
6.1.3.2.4. Liaison aux glycoaminoglycanes (GAGs) : <b>l'adhésine Bgp</b>	P.46
6.1.3.3. Les autres liaisons aux protéines de l'hôte	P.46
6.1.3.4. Les interactions <i>Borrelia</i> / TLR	P.48
6.1.3.4.1. L'interaction Pam <sub>3</sub> Cys et TLR1/2	P.50
6.1.3.4.2. Dimérisation induite par les ligands et activation TLR1-TLR2.	P.51
6.1.3.4.3. Les protéines adaptatrices	P.51

## **II. Le pouvoir immunomodulateur de la salive de tique** **P.54**

<u>1. Les activités pharmacologiques et anti-inflammatoires de la salive de tique</u>	P.54
1.1. Les activités vasodilatatrices	P.55
1.2. Les facteurs antiplaquettaires	P.55
1.3. Les activités anticoagulantes	P.56
1.4. Les activités anti-histaminiques	P.57
1.5. Les activités anti-sérotonines	P.57
1.6. Les activités kininases	P.58
1.7. Les activités antihémostatiques additionnelles de la salive de tique	P.58
<u>2. Les propriétés immunomodulatrices de la salive de tique</u>	P.61
2.1. L'activité anti-complément	P.61
2.2. Les activités anti-chimiokines	P.62
2.3. Les lipocalines	P.62
2.4. Les serpins	P.63
2.5. Les inhibiteurs des cellules B	P.64
2.6. Cas particulier de Salp15	P.65

1. <u>La peau humaine</u>	P.68
1.1. L'épiderme	P.69
1.1.1. La couche basale germinative ( <i>stratum basale</i> )	P.70
1.1.2. La couche épineuse ( <i>stratum spinosum</i> )	P.70
1.1.3. La couche granuleuse ( <i>stratum granulosum</i> )	P.71
1.1.4. La couche transitoire ( <i>stratum lucidum</i> )	P.71
1.1.5. La couche cornée ( <i>stratum corneum</i> )	P.71
1.2. Le derme	P.72
1.3. L'hypoderme	P.73
1.4. La matrice extracellulaire	P.74
1.4.1. Les composants de la matrice extracellulaire	P.75
1.4.1.1. Les protéoglycanes	P.75
1.4.1.2. Les glycoprotéines	P.75
1.4.2. Les métalloprotéases matricielles	P.76
2. <u>L'immunité innée de la peau</u>	P.80
2.1. Le complément	P.82
2.2. Les cellules du système immunitaire inné cutané	P.83
2.2.1. Les kératinocytes	P.83
2.2.2. Les fibroblastes	P.84
2.2.3. Les autres cellules	P.85
2.2.3.1. Les cellules de Langerhans	P.85
2.2.3.2. Les mastocytes	P.86
2.2.3.3. Les monocytes, les neutrophiles, les macrophages et les cellules NK	P.87
2.3. <b>Les peptides antimicrobiens</b>	P.87
2.3.1. <b>Les défensines</b>	P.88
2.3.1.1. Les défensines $\theta$	P.89
2.3.1.2. Les défensines $\alpha$	P.89
2.3.1.2.1. Description	P.89
2.3.1.2.2. Les différentes activités des défensines $\alpha$	P.90
2.3.1.3. <b>Les défensines <math>\beta</math></b>	P.91
2.3.1.3.1. Distribution génique et organisation	P.91
2.3.1.3.2. Sites d'expression et régulation des gènes	P.91
2.3.1.3.3. Les voies d'activation	P.94
2.3.1.3.4. Structure	P.95
2.3.1.3.5. Le mécanisme d'action	P.96
2.3.1.3.6. Les activités biologiques	P.97
2.3.1.6.1. Les activités chimiotactiques	P.97
2.3.1.6.2. Les autres activités	P.98

2.3.2. Les différentes cathélicidines	P.101
2.3.3. La cathélicidine humaine : <b>LL-37</b>	P.102
2.3.3.1. Synthèse	P.102
2.3.3.2. Les sites d'expression	P.103
2.3.3.3. Mécanisme d'action	P.103
2.3.3.4. La régulation de LL-37	P.104
2.3.3.5. Rôle de la vitamine D3 dans la régulation de LL-37	P.105
2.3.3.6. Les activités de LL-37	P.106
2.3.3.6.1. Activités antimicrobiennes et cytotoxiques	P.106
2.3.3.6.2. Activités chimio-attractantes	P.106
2.3.3.6.3. Réparation tissulaire et angiogénèse	P.107
2.3.3.6.4. Prolifération/ migration cellulaire	P.107
2.3.3.6.5. LL-37 et les pathologies de la peau	P.107
2.3.3.6.6. Liaison au LPS	P.108
2.3.3.6.7. LL-37 et les cellules dendritiques	P.108
2.3.4. Les autres peptides antimicrobiens	P.109
2.3.4.1. La RNase 7	P.111
2.3.4.2. La psoriasine (S100A7)	P.111
2.3.5. Le concept d'alarmines	P.112

## **Chapitre 2 : Objectifs de la thèse** **P.114**

## **Chapitre 3 : Résultats** **P.117**

### Introduction **P.118**

**Publication n°1 :** Defensin is suppressed by tick saliva gland extract during the *in vitro* interaction of resident skin cells with *Borrelia burgdorferi*  
J. Invest. Dermatol, 129, 2515-2517, 2009. **P.124**

**Publication n°2 :** Salp15, a tick protein, has an effect on innate immunity of human primary keratinocytes infected with *Borrelia burgdorferi*  
Submitted **P.132**

**Publication n°3** : Etude du rôle des interactions KCs/ FBs dans l'inflammation cutanée induite par *B. burgdorferi* ss N40  
En préparation P.172

**Publication n°4** : Etude de l'interaction de différentes espèces et différentes souches de *Borrelia* avec les KCs.  
En préparation P.188

**Chapitre 4 : Discussion P.201**

**Chapitre 5 : Bibliographie P.211**

Liste des publications

Liste des sites Internet consultés



## Liste des abréviations

1,25D3 : 1,25 dihydroxyvitamine D3  
ACA : Acrodermatite Chronique Atrophiante  
ADN : Acide Désoxyribonucléique  
ADP : Adenosine Di-Phosphate  
AP-1 : Activator protein 1  
ARN : Acide Ribonucléique  
ASK-1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase-1  
Bgp : *Borrelia* GAG-binding protein  
BIP : B cell Inhibitory Protein  
BMAP : Bovin Myeloïd Antimicrobial Peptide  
BPI : Bactericidal Permeability Increasing protein  
CD : Cellule Dendritique  
Cellule NK : cellule « Natural Killer »  
CHBP : Chemokine Binding Protein  
CL : Cellules de Langerhans  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes  
CRAMP : Cathelin Related Antimicrobial Peptide  
CRASP : Complement Regulator-Acquiring Surface Protein  
DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns  
DbpA : Decorin binding protein A  
ECP : Eosinophil Cationic Protein  
EDN : Eosinophil-Derived Neurotoxin  
EGF : Epidermal Growth Factor  
EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor  
EM : Erythème Migrant  
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase  
FBs : Fibroblastes  
FGF : Fibroblast Growth Factor  
FHL-1 : Factor H Like-1  
FPRL-1 : Formyl Peptide Receptor Like 1  
GAG : Glycoaminoglycanes  
GlcNac : N-acétylglucosamine  
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor  
GS : Glandes Salivaires  
HBD : Human Beta Defensin  
HD : Human Defensin  
HMGB1 : High Mobility Group Box protein 1  
HNP : Human Neutrophil Protein  
HSP : Heat Shock Protein  
ICAM-1 : Inter-Cellular Adhesion Molecule 1  
IFN  $\gamma$  : Interferon  $\gamma$   
IGF-1 : Insulin Growth Factor  
IL-1 $\beta$  : Interleukine 1  $\beta$   
iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase

IP-10 : Interferon inducible Protein 10  
 IRAC 1 et 2 : *I. ricinus* Anti-Complement 1 et 2  
 IrLBP : *Ixodes ricinus* Leukotriene B4-binding Protein  
 ITAC : IFN- $\gamma$ -inducible T cell a Chemoattractant  
 JAK-STAT : Janus Kinases - Signal Transducers and Activators of Transcription  
 KcMR : Keratinocyte Mannose-binding Receptor  
 KCs : Kératinocytes  
 LIR : Lipocaline of *Ixodes ricinus*  
 LPS : Lipopolysaccharide  
 MAC : Membrane Attack Complex  
 MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase  
 MBP : Mannose Binding Protein  
 MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein-1  
 MEC: Matrice Extracellulaire  
 MEK-ERK : MAPK/ERK Kinase Extracellular signal-Regulated Kinase  
 MIP-1 $\alpha$  : Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$   
 MMP : Metalloprotéinase  
 NF- $\kappa$ B : Nuclear Facrtor  $\kappa$ B  
 NO : Oxyde Nitrique  
 OMCI : *O. moubata* Complement Inhibitor  
 Osp : Outer surface protein  
 PAM : Peptide Antimicrobien  
 PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern  
 PGE2 : Prostaglandine E2  
 PI3K/Akt : Phosphoinositide 3 kinase  
 PKC : Protéine Kinase C  
 PLC- $\gamma$  : Phospholipase C- $\gamma$   
 PLG : Plasminogène  
 PAI-1 et PAI-2 : Plasminogen Activator Inhibitor -1 et -2  
 PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acétate  
 PNN : Polynucléaires Neutrophiles  
 PRRs : Pattern-Recognition Receptor  
 SKALP : Elafin/skin-derived antileukoprotease  
 SLPI : Secretory Leukocyte Protease Inhibitor  
 TCR : T Cell Receptor  
 TGF- $\alpha$  : Transforming Growth Factor  $\alpha$   
 TIMP : Tissular Inhibitor of Metalloproteinase  
 TIR domain : Toll/Interleukin-1 Receptor domain  
 TLR : Toll Like Receptor  
 TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
 tPA : tissular type Plasminogene Activator  
 TRIF : TIR domain containing adaptor protein Inducing IFN- $\beta$   
 TROPSA : Tick Receptor for OspA  
 TSGP : Tick Salivary Gland Protein of *O. savignyi*  
 uPa : urokinase type Plasminogene activator  
 Vlse : Vmp-like sequence expression  
 Vmp : Variable major protein

## Liste des figures

Figure 1 : Répartition géographique de la maladie de Lyme	P. 17
Figure 2 : Structure de la bactérie <i>Borrelia</i>	P.18
Figure 3 : Le génome de <i>Borrelia</i>	P.19
Figure 4 : Classification des spirochètes	P.21
Figure 5 : Photos représentant une tique <i>Ixodes</i> et une tique <i>Argas</i>	P.22
Figure 6 : Morphologie d'une tique	P.23
Figure 7 : Représentation des différentes stases de la tique	P.24
Figure 8 : Le cycle de développement de la tique	P.26
Figure 9 : Répartition géographique des tiques	P.27
Figure 10 : Hôtes potentiels de la tique	P.30
Figure 11 : Transmission de <i>Borrelia</i> de la tique vers l'hôte	P.31
Figure 12 : Exemples d'érythèmes migrants	P.34
Figure 13 : Exemples de manifestations cliniques secondaires	P.35
Figure 14 : Acrodermatite atrophiante	P.36
Figure 15 : Structure d'OspA	P.38
Figure 16 : Structure du dimère d'OspC	P.40
Figure 17 : Mécanisme d'inactivation du complément à la surface de <i>Borrelia</i>	P.43
Figure 18 : Régulation de l'activité de la plasmine	P.46
Figure 19 : Les interactions <i>Borrelia</i> - hôte	P.47
Figure 20 : Les TLRs	P.48
Figure 21 : Voie de signalisation des TLRs et de IL-1R	P.49
Figure 22 : Actions des protéines de la salive de tique sur la voie de coagulation	P.57
Figure 23 : Action des protéines de salive de tique sur l'immunité de l'hôte	P.64
Figure 24 : Les différents sites d'action de Salp15 chez la tique et chez l'hôte	P.67
Figure 25 : La peau normale humaine	P.68
Figure 26 : Les différentes couches de l'épiderme	P.69
Figure 27 : Structure du derme	P.73
Figure 28 : Structure de la matrice extracellulaire	P.74
Figure 29 : Structure d'un protéoglycane	P.75
Figure 30 : Structure de la fibronectine	P.76
Figure 31 : Structure des MMPs	P.77
Figure 32 : Mécanisme d'action des MMPs	P.81
Figure 33 : Les voies du complément	P.82

Figure 34 : Interactions kératinocytes-fibroblastes	P.84
Figure 35 : Les défensines	P.85
Figure 36 : Structure tridimensionnelle des défensines $\beta$	P.95
Figure 37 : Mode d'action des défensines $\beta$ sur les membranes	P.96
Figure 38 : Les actions des défensines	P.99
Figure 39 : Processus de maturation de la cathélicidine LL-37	P.102
Figure 40 : Mécanisme d'action de LL-37	P.104
Figure 41 : Mécanisme d'action de la vitamine D3	P.105
Figure 42 : Récapitulatif des actions de LL-37 dans la peau	P.109
Figure 43 : Mesure par ELISA de la sécrétion d'IL-8 et d'HBD-2 par la lignée cellulaire Hacat et des kératinocytes humains primaires stimulés par <i>B. burgdorferi</i> ss N40 pendant 24 heures.	P.120
Figure 44 : Identification d'OspA et OspC dans la culture de <i>B. burgdorferi</i> ss N40 sur gel SDS-PAGE 15% et Western Blot.	P.122
Figure 45 : Mesure par RT-PCR quantitative de la cinétique d'induction de MCP-1, du collagène et des MMPs, par les fibroblastes humains primaires stimulés par <i>B. burgdorferi</i> ss N40 .	P.178
Figure 46 : Étude par ELISA de la coopération cellulaire entre kératinocytes et fibroblastes activés avec <i>B. burgdorferi</i> ss N40.	P.179
Figure 47 : Analyse par RT-PCR quantitative de l'induction de MCP-1, du collagène des MMPs et de LL-37 par les fibroblastes après transfert de surnageants de KCs humains primaires activés par <i>B. burgdorferi</i> ss N40.	P.181
Figure 48 : Étude par ELISA de l'expression de l'IL-8 et d'HBD-2 par les KCs humains primaires stimulés par différentes espèces de <i>Borrelia</i> .	P.194
Figure 49 : Étude par Elisa de la sécrétion de l'IL-8 et d'HBD-2 par les KCs humains primaires activés par différentes souches de <i>B. burgdorferi</i> ss.	P.195

Figure 50: Mesure par ELISA de la cinétique de sécrétion d'IL-8 par les KCs humains primaires stimulés par *B. burgdorferi* ss 297, 297 OspC -/- (OspC KO) et 297 complémente. P.196

Figure 51 : Coupes d'immunohistochimie provenant de biopsies cutanées de patients P.198

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des *Borrelia* P.22

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des activités pharmacologiques de la salive de tique P.59

Tableau 3 : Les différentes protéines de salive de tique P.60

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des fonctions des différentes MMPs P.79

Tableau 5 : Principales caractéristiques des défensines  $\beta$  P.100

Tableau 6 : Expression tissulaire ou cellulaire spécifique de quelques cathélicidines P.101

Tableau 7 : Les peptides et les protéines à activité antimicrobienne de la peau P.110

# Chapitre 1

## Introduction

I.

# La maladie de Lyme

# I. La maladie de Lyme

## 1. Historique

L'histoire de la borréliose de Lyme nous conduit de l'Ancien au Nouveau Monde : elle commence en Europe à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle pour se poursuivre aux Etats-Unis.

C'est en Allemagne qu'est décrite en 1883 la première acrodermatite chronique atrophiante (ACA). Dans la première moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, quelques auteurs rapportent certains éléments cliniques de la borréliose de Lyme. Garin et Bujadoux décrivent en 1922 le premier cas d'atteinte neurologique ; la transmission par une tique y est clairement évoquée (Garin, 1922). L'efficacité de la pénicilline est décrite dans les années cinquante suggérant ainsi l'étiologie bactérienne de l'affection.

Vers les années 1970, Steere et coll. attirent l'attention médicale internationale par la description d'une épidémie d'arthrite atteignant surtout des enfants et sévissant dans le Comté de Lyme au Connecticut (USA). Ils établissent son aspect épidémique, la relation avec les morsures de tiques qui précèdent la symptomatologie dans de nombreux cas, et l'atténuation des symptômes par antibiothérapie. Ils évoquent alors une hypothèse infectieuse, et font le rapprochement avec les formes neurologiques et dermatologiques européennes.

En 1982, un entomologiste médical, W. Burgdorfer, examine l'intestin de tiques d'*Ixodes dammini* prélevées en zone d'endémie de la maladie de Lyme. Il y trouve des spirochètes et suppose qu'il pourrait s'agir de l'agent de la maladie de Lyme (Benach et coll., 1983 ; Steere et coll., 1983). Après mise en culture de ces spirochètes, il les inocule à des lapins qui développent un érythème migrant (EM) 10 à 12 semaines plus tard. Elle sera nommée *Borrelia burgdorferi* en son honneur (Johnson et coll., 1984).

## 2. Répartition géographique de la maladie de Lyme

La borréliose de Lyme est une zoonose très largement répandue dans l'Hémisphère Nord. Elle y est sans doute établie depuis longtemps, tant en Europe qu'en Amérique (Figure 1). C'est d'ailleurs ce que tendent à démontrer les descriptions cliniques européennes du début du 20<sup>ème</sup> siècle (Afzelius, Lipschutz, Garin...), aussi bien que les analyses par PCR réalisées sur des échantillons prélevés il y a plus d'un siècle en Europe et en Amérique (Matuschka et coll., 1996 ; Hubbard et coll., 1998).



Les modifications anthropiques de l'écosystème de ces cents dernières années ont sans aucun doute largement contribué à l'émergence de la maladie qui, jusqu'alors, demeurait non identifiée faute de cas groupés comme dans le Comté de Lyme.



Figure 1 : Répartition géographique de la maladie de Lyme

[www.maladies-a-tiques.com](http://www.maladies-a-tiques.com)

La répartition mondiale concerne quasiment tous les pays à climat tempéré du globe et elle se superpose à celle des vecteurs du genre *Ixodes*. Aux Etats-Unis, les cartes montrent une grande hétérogénéité de répartition entre les Etats. La plupart des cas sont localisés dans les Etats de la côte Est, de la côte Ouest et du Mid-West ; pour le reste du pays le nombre de cas est beaucoup plus faible. Des cas ont aussi été rapportés en Asie, notamment au Japon (Kawabata et coll., 1987) et en Chine (Ai et coll., 1994). Le cas de l'Australie (Wills et Barry, 1991) est intéressant du point de vue géographique, en tant que continent isolé. Quelques cas ont été suspectés cliniquement, mais le rôle d'*I. holocyclus* en tant que vecteur de l'affection n'a pas été démontré et aucune souche de *Borrelia* n'a été isolée d'une de ces tiques.

Peu de travaux visant à chiffrer l'endémie ou l'incidence sont disponibles. Dans la plupart des pays, il existe cependant une centralisation des données qui permet d'avoir une idée de l'importance de cette affection. Aux Etats-Unis, le nombre de cas annuels en 2002 atteignait 23 000 cas par an. En Europe, la situation est très variable suivant les pays et atteignent environ 60 000 cas par an (Lindgren et Jaensen, 2006).

### 3. La bactérie

Le cycle de vie de *Borrelia* est complexe et profondément dépendant du vecteur et de l'hôte vertébré. Le spirochète entre dans l'intestin de la tique lorsque elle se nourrit sur un animal infecté pour réaliser son repas sanguin. Au cours de ce processus, les bactéries augmentent l'expression de certaines de leurs protéines de surface qui leur permettent de s'attacher dans l'intestin de la tique. Les bactéries restent ancrées à l'intestin même pendant la mue de la tique et jusqu'à ce que la tique entame son second repas sanguin. Le début du repas induit un signal pour *Borrelia* qui déclenche sa réplication. Le nombre de spirochètes augmente exponentiellement avant de migrer de l'intestin vers les glandes salivaires via l'hémolymphe. Au cours de sa migration, *Borrelia* modifie à nouveau l'expression de ses protéines de surface, ce qui lui permet l'établissement de l'infection chez l'hôte vertébré (Fikrig et Narasimhan, 2006).

#### 3.1. Caractères morphologiques et structuraux

Les *Borrelia* appartiennent à la famille des Spirochaetaceae. Ce sont des bactéries mobiles et capables de rotation, de translation et de flexion grâce à leurs flagelles. Elles sont modérément colorables par le Giemsa. Leur longueur est comprise entre 10 et 20  $\mu\text{m}$  et leur largeur entre 0,18 et 0,25  $\mu\text{m}$ .

Les *Borrelia*, au même titre que les autres spirochètes, sont caractérisées par une structure très particulière, unique au sein des Eubactéries. On distingue une enveloppe ou membrane externe multi-lamellaire riche en lipoprotéines qui entoure un cylindre protoplasmique constitué d'un peptidoglycane, d'une membrane cytoplasmique et du contenu intracytoplasmique (Figure 2). Les flagelles périplasmiques sont localisés entre l'enveloppe externe et le cylindre protoplasmique (Ge et coll., 1998). Les flagelles sont eux-mêmes insérés par un système d'ancrage dans la membrane cytoplasmique.

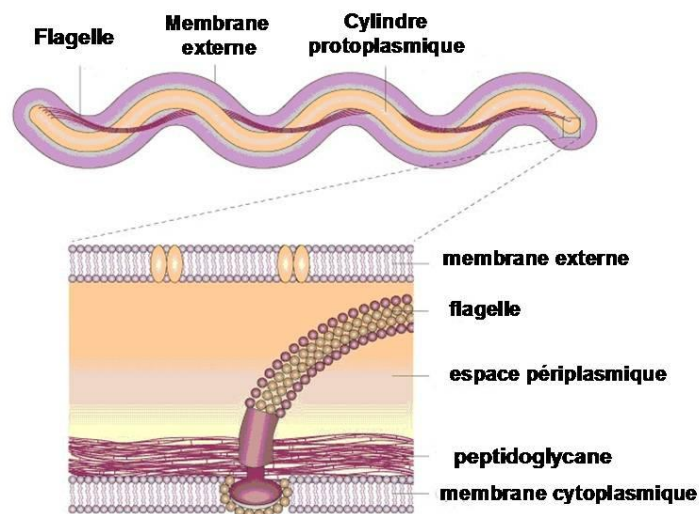


Figure 2 : Structure de la bactérie *Borrelia*

D'après Rosa et coll., 2005, avec la permission de Nature Publishing group

## 3.2. Organisation du génome

### 3.2.1 Le génome de *Borrelia*

De grandes similitudes existent dans la morphologie, la structure et l'ultra-structure des principaux genres de la famille des spirochètes. Par contre, des différences apparaissent entre ces genres au niveau génétique.

D'une taille d'environ 1,5 Mb (Fraser et coll., 1997), le génome de *Borrelia* est composé d'un chromosome linéaire et de 21 plasmides. Parmi ceux-ci, 12 sont linéaires et 9 circulaires (Figure 3). Les plasmides ont le même nombre de copies dans le chromosome, indiquant une forte régulation de sa réplication gouvernée par des mécanismes qui sont encore à définir. Le plasmide cp32 partage une séquence homologue avec 8 autres plasmides cp32 dans la bactérie (Casjens et coll., 2000).

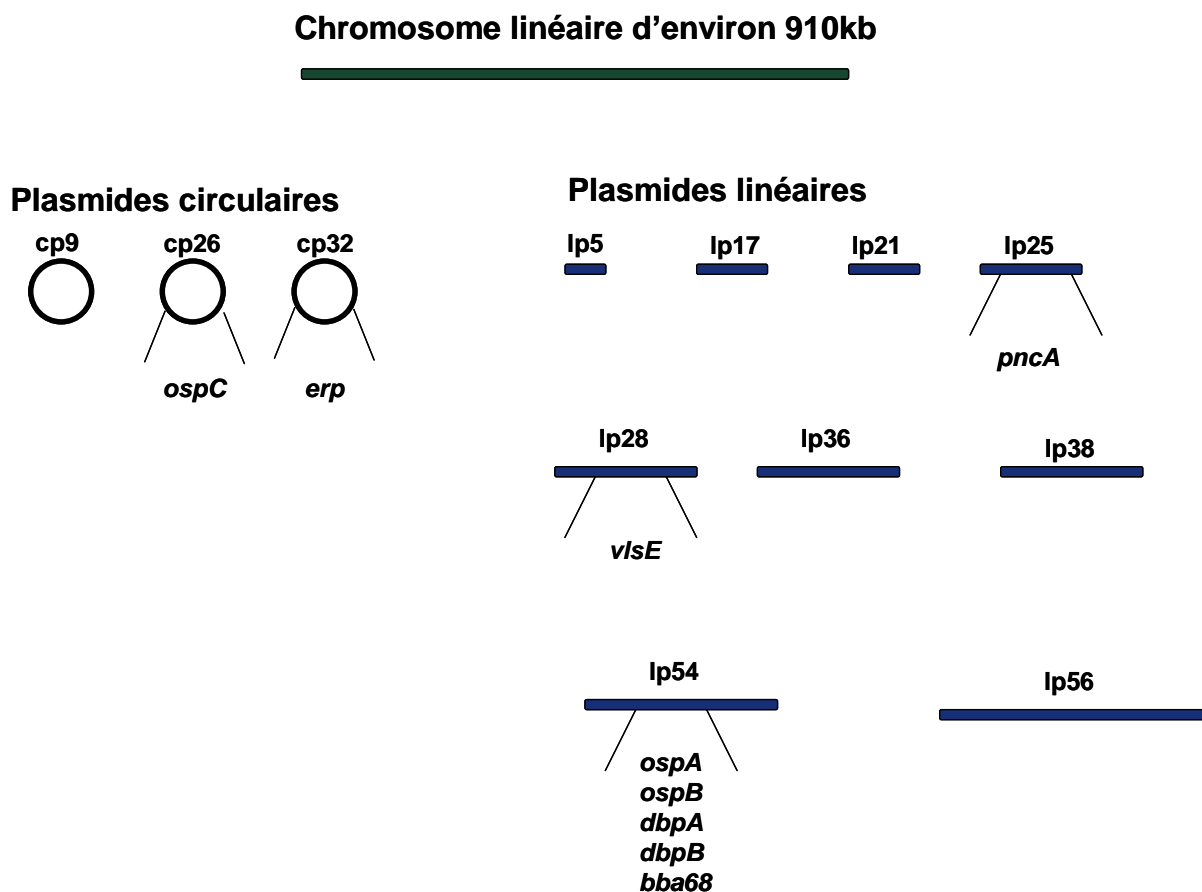


Figure 3 : Le génome de *Borrelia* et les produits des plasmides  
D'après Stewart et coll., 2005, avec la permission d'Elsevier

### 3.2.2. Les plasmides et leurs significations

Tous les plasmides n'apparaissent pas essentiels et stables pour la survie de *Borrelia*, certains comme par exemple cp9 sont facilement perdus durant une expansion *in vitro* (Barbour, 1988 ; Xu et coll., 1996 ; Purser et Norris, 2000 ; Grimm et coll., 2003).

**Le plasmide lp28-1** code la région du gène *vlsE*, présumé important dans l'échappement immunitaire (Zhang et coll., 1997 ; Zhang et Norris, 1998). Selon cette hypothèse, les souches de *B. burgdorferi* qui ont perdu le plasmide lp28-1 sont incapables d'entraîner une infection persistante et sont rapidement éliminées par le système immunitaire de l'hôte. Cependant il a été montré que des souches sans le plasmide lp28-1 sont infectieuses et persistent dans des souris SCID montrant une sélection de certains gènes de plasmides (Labandeira-Rey et Skare, 2001 ; Labandeira-Rey et coll., 2003 ; Lawrenz et coll., 2004).

**Le plasmide lp25** code des gènes qui permettent un avantage sélectif pour la bactérie aussi bien dans l'arthropode que chez l'hôte mammifère. Ce plasmide porte aussi le gène *pncA*, codant la nicotinamidase (Purser et coll., 2003 ; Stother et coll., 2005).

**Le plasmide lp54** code différents gènes régulés par la température (Ojaimi et coll., 2003). Quelques uns sont importants lorsque *Borrelia* est dans la tique et d'autres essentiels quand la bactérie est chez l'hôte vertébré. OspA et OspB (Outer surface protein A et B) sont codées par ce plasmide et sont impliquées dans l'attachement de *Borrelia* à l'intestin de la tique (Yang et coll., 2004). Les produits des gènes de *dbpA* et *dbpB* (decorin binding protein A et B) sont aussi codés par un opéron de lp54. Ces protéines permettent l'attachement des spirochètes avec la décorine de la matrice extracellulaire de l'hôte vertébré (Guo et coll., 1998 ; Brown et coll., 1999). La protéine se liant au facteur H de *B. burgdorferi*, CRASP-1 (complement regulator-acquiring surface protein-1) est aussi codée par un gène de ce plasmide. De manière intéressante, tous les gènes caractérisés à ce jour sur lp54, codent des lipoprotéines (DbpA, DbpB) qui permettent aux spirochètes soit de se lier à des protéines du vecteur, soit à des protéines de l'hôte (Stevenson et coll., 2002 ; Kraiczy et coll., 2003).

De multiples gènes de la famille des Erps (E related proteins) (Stevenson et coll., 2002) sont localisés sur des loci situés sur un plasmide différent de la famille **cp32**. Ces protéines Erp se fixent au facteur H, un régulateur de l'activation du complément, et semblent aider à protéger les bactéries de la lyse par les facteurs de la voie alterne du complément.

**Cp26** code aussi des gènes de virulence. Ce plasmide code plus particulièrement OspC. La présence du gène *ospC* sur cp26 semble conférer une fonction vitale à ce plasmide et explique une maintenance stable de ce plasmide *in vitro* et *in vivo*. Ceci fait de cp26 un élément génétique essentiel pour le spirochète (Byram et coll., 2004).

### 3.3. Polymorphisme, diversité et taxonomie

Au sein de l'ordre des spirochaetales, les *Borrelia* constituent un genre médicalement important aux côtés des *Treponema*. Le genre *Borrelia* est divisé en deux groupes d'espèces : celles associées à la borréliose de Lyme et celles responsables de fièvres récurrentes.

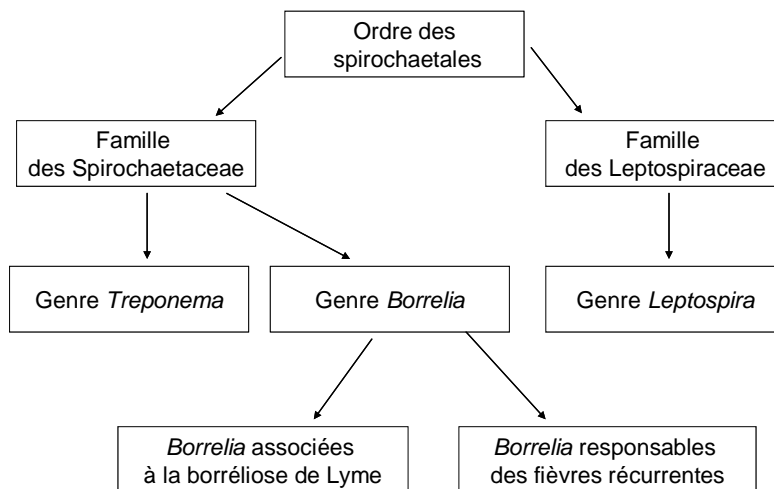


Figure 4 : Classification des spirochètes  
[www.bioforma.net](http://www.bioforma.net)

La diversité des souches n'apparaît pas lors de la description initiale de l'espèce *Borrelia burgdorferi* (Figure 4). Puis de nouvelles espèces sont apparues avec un polymorphisme tout d'abord phénotypique, puis génotypique des *Borrelia* associées à la borréliose de Lyme. Seules trois espèces sont actuellement reconnues comme pathogènes pour l'homme : *B.burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* et *B. afzelii*.

	Pouvoir pathogène	Répartition géographique
<i>Borrelia afzelii</i>	Borréliose de Lyme <i>B. afzelii</i> est l'espèce quasi exclusivement responsable des lésions cutanées tardives de l'ACA	Europe, Asie
<i>Borrelia andersonii</i>	Non pathogène	Amérique du Nord
<i>Borrelia bissetii</i>	Non pathogène	Amérique du Nord
<i>Borrelia burgdorferi</i> s. s.	Borréliose de Lyme <i>B. burgdorferi</i> est principalement responsable d'arthrites	Europe USA
<i>Borrelia garinii</i>	Borréliose de Lyme <i>B. garinii</i> est préférentiellement retrouvée à l'origine des manifestations neurologiques. Cette espèce est la plus fréquente en Europe	Europe, Asie
<i>Borrelia japonica</i>	Non pathogène	Japon
<i>Borrelia lusitaniae</i>	Pouvoir pathogène non prouvé Cette espèce a cependant été isolée d'un patient atteint d'une infection chronique de la peau	Europe, Afrique du Nord
<i>Borrelia sinica</i>	Non pathogène	Chine
<i>Borrelia spielmanii</i>	Borréliose de Lyme (infections cutanées)	Europe
<i>Borrelia tanukii</i>	Non pathogène	Japon
<i>Borrelia turdi</i>	Non pathogène	Japon
<i>Borrelia valaisiana</i>	Potentiellement pathogène Isolée d'un érythème migrant	Europe, Chine, Corée, Taiwan, Japon

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des *Borrelia*

D'après Barranton et De Martino, 2009 ; [www.bioforma.net](http://www.bioforma.net)

La répartition des souches pathogènes montre la présence d'une espèce unique aux Etats-Unis, *B. burgdorferi* sensu stricto alors que 6 espèces dont les 3 principales espèces pathogènes citées plus haut sont présentes en Europe (Tableau 1).

## 4. la tique *Ixodes* sp.

### 4.1. Biologie de la tique

Les tiques sont des acariens dont on connaît environ 850 espèces dans le monde, réparties en trois familles. Les « tiques dures » ou *Ixodidae* représentent environ 670 espèces connues. Elles possèdent des zones de tégument chitinisé dur. Les *Argasidae* représentent environ 180 espèces et ont un tégument sans sclérisation qui lui vaut le nom de « tiques molles » (Figure 5). Un seul représentant des *Nuttalliellidae* a été identifié, il appartient à une famille intermédiaire entre les deux précédentes.



Tique *Ixodes ricinus*

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Tique>

Tique *Argas reflexus*

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Argasidae>

Figure 5 : Photos représentant  
une tique *Ixodes* et une tique *Argas*

Toutes les tiques sont hématophages et donc potentiellement vectrices de maladies à dissémination sanguine. Mais quelques unes seulement ont une importance médicale, en raison de la pathologie humaine ou vétérinaire qu'elles occasionnent. Les tiques transmettent une trentaine d'agents pathogènes, tant virus, bactéries que parasites et nématodes. Cependant ce chiffre est susceptible d'être réévalué à la hausse, car tous les agents pathogènes transmissibles n'ont pas encore été identifiés. Des intoxications par des neurotoxines (paralyse à tique) ainsi que des allergies à la salive de tiques sont également possibles (Klopman, 2005).

## 4.2. Morphologie et systématique

Les *Ixodidae* ont un corps formé de 2 parties. A l'avant le gnathosome et à l'arrière l'idiosome formé d'une cuticule souple et extensible permettant la réplétion. Sur la face dorsale se trouve une plaque, le scutum, dont la taille est variable selon le sexe et les espèces. Les pattes sont formées de 6 segments et 2 griffes (Figure6).

La première paire de pattes porte l'organe de Haller. C'est un organe sensoriel, sensible à la fois au degré d'hygrométrie, aux phéromones, au gaz carbonique, aux métabolites exhalés par les ruminants, à l'acide lactique.... Les poils portés sur les pattes sont sensibles aux vibrations et aux variations de température. Les pédipalpes possèdent des chimiorécepteurs qui ont un rôle sensoriel. Les pièces buccales sont constituées des chélicères et de l'hypostome. Les chélicères servent à percer et dilacérer les tissus. Elles permettent la pénétration de l'hypostome qui s'ancre solidement dans les tissus grâce à ses dents placées sur la face ventrale (Figure 6).



Nymphe d'*Ixodes ricinus*

<http://www.lesnymphes.org/tiques.htm>

Rostre légendé

<http://www.lesnymphes.org/tiques.htm>

Figure 6 : Morphologie d'une tique

### 4.3. Cycle de développement des tiques

Les tiques sont des ectoparasites temporaires obligatoires de vertébrés. De ce fait, ils ne peuvent se nourrir que de sang. Toutes les stases (sauf le mâle adulte) sont parasites.

Le cycle évolutif des *Ixodidae* se déroule en trois phases (Figure7). De l'œuf naît une larve hexapode, inframillimétrique, à peine perceptible à l'œil nu. Après s'être fixée pendant quelques jours sur un vertébré pour se gorger lentement de sang, elle se laisse tomber sur le sol, pour digérer et muer en une nymphe octopode mesurant environ un millimètre à jeun. Le deuxième repas de sang est pris dans les mêmes conditions de durée. La nymphe repue mesure alors 2 mm. Elle se détache et tombe au sol pour muer en une tique adulte de 3 à 4 mm (Klompen, 2005).

Les tiques sont capables de survivre longtemps sans se nourrir. Elles sont alors dans un stade inactif ressemblant à une diapause. Le principal facteur de stress durant la période hors hôte est la dessiccation, facteur qui influence beaucoup le comportement de quête. Une tique affamée grimpe et quitte son environnement protecteur dans la végétation pour chercher des hôtes. Dans un habitat exposé, elle se déshydrate. Si elle perd trop d'eau, elle redescend pour se restaurer par absorption. La disponibilité de la fraîcheur et les microclimats humides sont essentiels à sa survie.

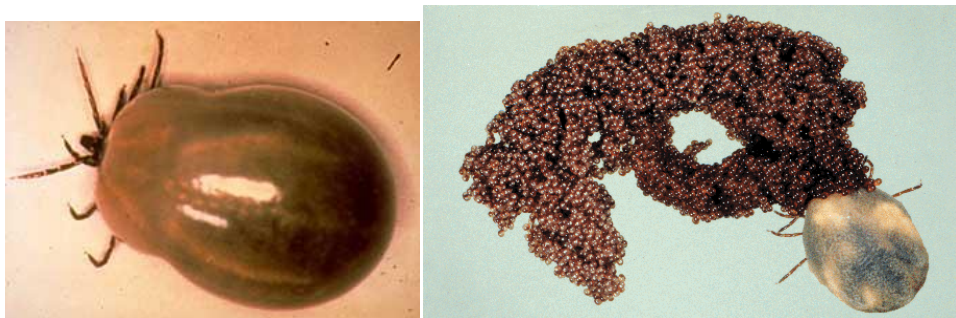
La femelle, après copulation, devra une dernière fois se gorger pleinement de sang, jusqu'à prendre la taille d'une graine de ricin. Ce repas lui permettra de pondre de 1 000 à 20 000 œufs, selon l'espèce et la quantité de sang ingéré, avant de se dessécher et mourir.





Les différentes stases d'une tique

<http://www.expasy.ch/prolune/dossiers/025/>



Femelle d'*Ixodes ricinus* gorgée de sang    Femelle d'*Ixodes ricinus* en train de pondre

<http://www.lesnymphes.org/tiques.htm>

<http://www.ag.auburn.edu>

Figure 7 : Représentation des différentes stases de la tique

Malgré le nombre d'œufs pondus, la densité de ces acariens reste relativement stable d'une année à l'autre. Le taux de survie demeure en effet très modeste, en raison des conditions climatiques et des prédateurs. Par exemple pour *I. ricinus*, après éclosion des 2 à 3 000 œufs, 5% maximum des larves survivent, et seulement 10% d'entre elles parviennent à la stase nymphale. Parmi celle-ci, 20% parviennent à la stase adulte (Figure 8). Il faut donc environ 2 000 œufs pour obtenir un couple reproducteur et maintenir l'équilibre (Hoodless et coll., 2002). Le mâle ne s'alimente pas ou très peu. La durée d'un cycle est en moyenne de 2 à 4 ans, pouvant aller jusqu'à 7 ans si les conditions climatiques ne sont pas favorables.

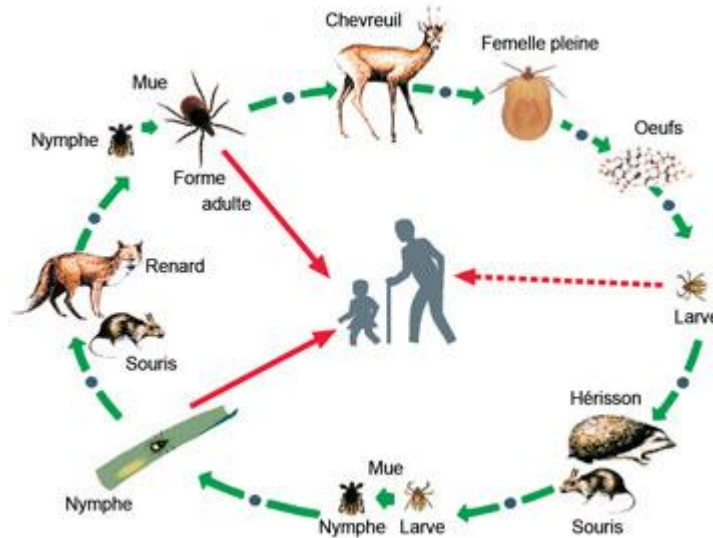


Figure 8 : Le cycle de développement de la tique  
[www.tiques.fr](http://www.tiques.fr)

#### 4.4. Répartition géographique

Bien qu'il existe des publications rapportant la capacité d'autres arthropodes à jouer le rôle de vecteur (Magnarelli et Anderson, 1988), seule la famille des *Ixodidae* est réellement impliquée comme vecteur de *B. burgdorferi* sensu lato. Suivant le lieu géographique, une espèce différente est concernée. Il s'agit d'*I. dammini* et *I. scapularis* (qui sont considérées désormais comme une espèce unique) pour la côte Est des Etats-Unis, d'*I. pacificus* pour la côte Ouest, d'*I. ricinus* en Europe occidentale, d'*I. persulcatus* pour l'Europe centrale et l'Asie et d'*I. ovatus* pour le Japon (Figure 9). Le risque de contamination dépend directement de la densité en tiques et de leur pourcentage d'infestation. Ce pourcentage peut varier en proportions importantes allant de 4 à 40% chez les adultes et de 5 à 35% chez les nymphes (Magnarelli et Anderson, 1988 ; Wittenbrick et coll., 1994).

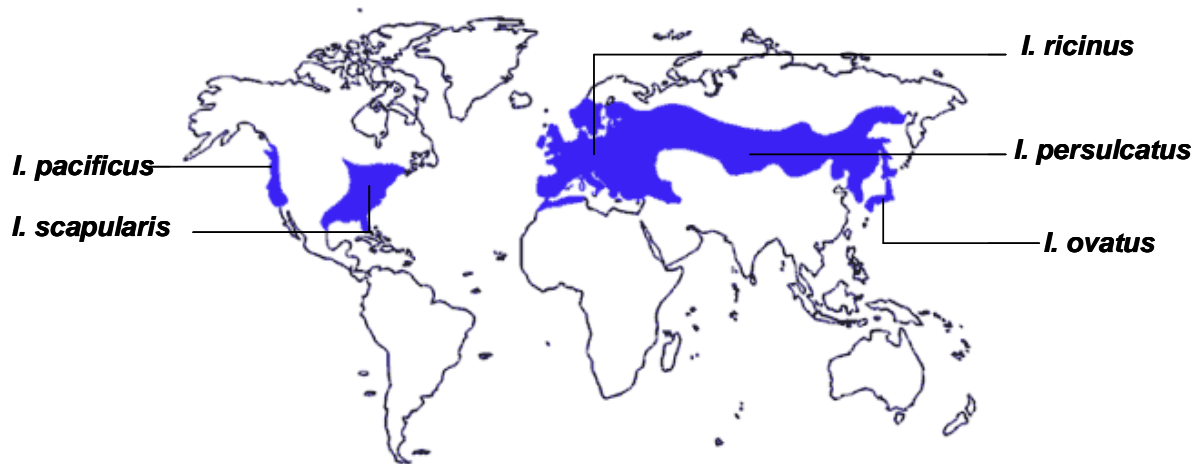


Figure 9 : Répartition géographique des tiques  
[www.maladies-a-tiques.com](http://www.maladies-a-tiques.com)

#### 4.5. *Ixodes ricinus*

Elle est, de loin, l'espèce la plus répandue en France et en Europe occidentale. Elle accepte plus de 300 espèces d'hôtes. Elle est capable de se nourrir tant sur les reptiles que sur les oiseaux ou les mammifères. A ses trois stases évolutives, elle est susceptible de s'attaquer à l'homme. Très hygrophile, elle vit dans les sous-bois humides. Sa présence est non seulement liée à des groupements végétaux précis, mais aussi à celle des animaux sauvages ou domestiques. Cet *Ixodes* est présent partout en France, sauf à des altitudes excédant 1 000 à 1 200 mètres, dans les régions très sèches ou inondables. Elle ne peut cependant pas survivre sans une constante humidité. Sa présence accidentelle à la maison par un chien ou sur des vêtements ne présente donc pas de grands risques de transmission pour ses occupants. Très rapidement, si l'hygrométrie est inférieure à 70%, la tique va se dessécher et mourir. En Alsace - Lorraine, *I. ricinus* paraît jouer un rôle de premier plan dans les maladies transmises par les tiques. Elle est notamment vectrice d'*Anaplasma phagocytophilum*, de quatre génotypes pathogènes de *Borrelia*, de *Rickettsia helvetica*, de *Babesia* et des virus TBEV (tick borne encephalitis virus) (Lotric-Furlan et coll., 2005).

#### 4.6. *Ixodes scapularis*

*I. scapularis* est une des espèces de tiques vivant en Amérique du Nord. C'est un ectoparasite qui peut se nourrir sur différentes espèces dont l'Homme. Elle est plus connue sous le nom de tique du cerf (« Deer tick » pour les anglosaxons) car elle parasite très souvent le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) nommé « white-tailed deer » en Amérique du Nord. Mais on l'appelle aussi tique des ours, « bear tick ». Cependant, ce nom est source de confusion car il désigne parfois aussi en Amérique du Nord une autre tique *I. pacificus* qui vit sur la bande ouest des Etats-Unis.

Cette espèce est devenue un problème de santé publique pour deux raisons : comme d'autres espèces de tiques dans l'Hémisphère Nord, elle tend depuis une trentaine d'années à localement pulluler, et à piquer de plus en plus souvent les humains. Elle est vectrice de plusieurs maladies graves pour l'homme et certains animaux (zoonoses), dont la maladie de Lyme, la babésiose, l'ehrlichiose, etc. Le taux de tiques infectées dans leur population, c'est à dire susceptible d'infecter les humains ou animaux, semble augmenter sur une grande partie de son aire de répartition. *I. scapularis* est considérée comme le principal vecteur de la forme nord américaine de la maladie de Lyme (Klopman et coll., 2005).

#### 4.7. Ecologie et éthologie

Les préférences écologiques des tiques sont variables : certaines vivent en milieu ouvert, d'autres en milieu abrité. Les premières sont dites exophiles, les secondes endophiles. Une même espèce peut également occuper successivement les deux habitats, en fonction des périodes de son cycle biologique. La densité des tiques est liée aux associations végétales, à l'hygrométrie, au cycle des saisons, autant qu'à la diversité des hôtes (Randolph et Storey, 1999 ; Perret et coll., 2000).

A la différence des autres arthropodes hématophages, les tiques ne disposent pas de moyens de déplacement importants. Les tiques exophiles sont majoritairement des tiques dures. Elles passent l'essentiel de leur temps à survivre au sol, attendant de rencontrer un hôte à leur convenance. Dans cette optique, elles ont développé une stratégie de détection à distance, qui revêt la plus grande importance. Dès que la tique perçoit à l'aide de ses organes sensoriels les émanations de son hôte, elle s'active pour aller se poster à l'affût au sommet d'une brindille. La rencontre avec l'hôte est ensuite conditionnée par sa densité de

population, aussi bien que la dimension du biotope. Les tiques ne provoquent donc que rarement de réelles épidémies, comme en 1975 dans le Comté de Lyme. Cependant leur pullulation, associée aux changements du mode de vie, est à l'origine de cas d'infections sporadiques de plus en plus fréquentes.

L'activité d'*I. ricinus* est conditionnée par les heures chaudes de la journée, et par des températures comprises entre 7 et 25°C. Elles sont quasiment inactives à des températures inférieures (Perret et coll., 2000). Elles entrent dans une sorte de diapause lorsque la chaleur est intense et l'hygrométrie basse. De ce fait, dans le quart nord-est de la France, leur activité s'étend d'avril à fin octobre, avec une accalmie en juillet-août. Une activité unimodale peut cependant être rencontrée dans les zones où les conditions climatiques sont moins favorables. Le risque de contracter une maladie de Lyme en Alsace, ou en Lorraine est très limité de janvier à février. Pour se nourrir, quelle que soit sa stase, *I. ricinus* pratique l'affût : les larves se postent au sommet d'herbes basses, où l'hygrométrie est la plus importante ; les adultes plus résistants montent quelquefois jusqu'à 1,50 m sur des herbes, des ronces ou des fougères.

Installées à leur poste, les tiques tiennent leurs deux pattes antérieures tendues et agrippent la fourrure, ou les vêtements de l'hôte de passage. Le réflexe d'accrochage paraît stimulé par le mouvement, la chaleur ou l'émission de dioxyde de carbone. *I. ricinus* est dépourvu d'yeux, mais possède des photorécepteurs qui leur permettent d'évaluer la luminosité. Son activité se poursuit même dans l'obscurité, alors que l'hygrométrie s'accroît ; cette particularité lui permet de parasiter les hôtes vertébrés nocturnes (Perret et coll., 2000).

#### 4.8. Les hôtes des tiques

Certaines espèces d'*Ixodidae* se gorgent sur une espèce, ou une seule famille de rongeurs, de bovidés ou de carnivores. Ils sont alors dits monotropes. *Rhipicephalus sanguineus* qui choisit le chien à ses trois stases en est un exemple. Les larves et les nymphes de *Dermacentor reticulatus* ont un tropisme marqué pour les micromammifères myomorphes, alors que l'adulte se fixe sur des hôtes de grande taille comme les chiens, les cervidés ou occasionnellement sur l'homme ; il est l'exemple type de la tique ditrope. *I. ricinus* n'a pas de tropisme marqué aux stases larvaires et nymphales (figure 10), mais il marque une nette préférence pour les mammifères de grande taille à la stase adulte, il est dit télotrope (Klopman, 2005).

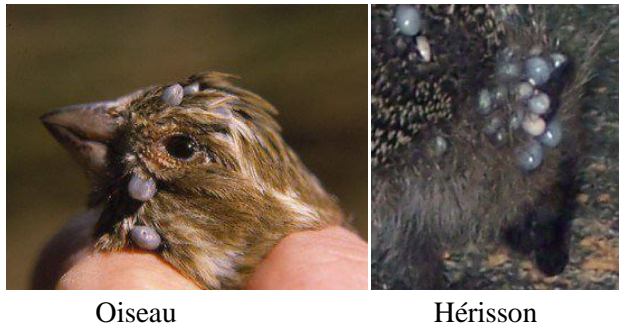


Figure 10 : Hôtes potentiels de la tique  
[www.maladies-a-tiques.com](http://www.maladies-a-tiques.com)

#### 4.9. Physiologie du gorgement

Contrairement aux autres arthropodes hématophages, les *Ixodidae* ont la particularité de se gorger très lentement. Après s'être agrippée à la fourrure d'un animal passant à sa proximité, la tique se déplace sur son hôte jusqu'à trouver une zone richement vascularisée. Elle doit alors s'y ancrer solidement pendant plusieurs jours à l'aide de son hypostome, afin d'avoir suffisamment de temps pour parvenir à se gorger complètement pour passer la plus inaperçue possible et éviter toute réaction de défense de l'hôte qui pourrait compromettre sa fixation par un nettoyage trop vigoureux (Hart, 2000). Elle se fixe en un endroit discret et opère de façon indolore. Ses chélicères sont capables de dilacérer l'épiderme et le derme sans provoquer la moindre douleur. Sa salive aide à la destruction progressive des tissus de l'hôte et ouvre graduellement la voie à la pénétration de l'hypostome dans la peau. La tique provoque ensuite la formation d'une cavité dermique qui se remplit de sang et d'exsudats tissulaires qu'il ne lui reste plus qu'à aspirer par son hypostome (Jaworski, 2005).

La durée du gorgement varie selon les espèces et les stases. Habituellement, une première phase lente d'environ 1 semaine permet à la tique de décupler son poids ; elle est suivie d'une seconde phase rapide, de 12 à 24 heures, où la tique le décuple encore. Le volume de sang ingéré en réalité n'est pas de 100, mais de 200 à 300 fois son poids (Jaworski, 2005). Les glandes salivaires de la tique ont en effet la capacité de concentrer ses ingesta avant de réinjecter l'excédant de fluides à l'hôte. Durant toute la durée du gorgement, elles produisent une quantité importante de salive qui permet non seulement d'éliminer l'excès d'eau, mais aussi d'équilibrer la balance ionique. Ces glandes salivaires sont dotées de plusieurs types d'acini possédant chacun des fonctions propres : production de ciment et de diverses substances. Elles sont aussi le site de développement de différents agents pathogènes et de toxines susceptibles d'être injectées à l'hôte (Figure 11) (Klopmen, 2005).

Toute effraction de la barrière cutanée provoque normalement la mise en œuvre des facteurs de l'hémostase : vasoconstriction et coagulation. Ce phénomène peut être accompagné de réactions inflammatoires ou d'hypersensibilité. Les macrophages convergent vers le site de ponction pour phagocyter les débris et les bactéries ; les basophiles pour libérer l'histamine et la sérotonine. Il s'ensuit une inflammation et une éruption autour du site de ponction. La fixation de la tique ne pourrait donc pas se prolonger sans déjouer efficacement les mécanismes de protection de l'hôte (nettoyage, hémostase et immunité). D'autant moins que sa salive contient de nombreuses substances protéiques susceptibles de déclencher des réactions immunitaires.

Pour contourner les défenses de l'hôte, la salive de tique contient des substances qui inhibent l'hémostase (anticoagulants et prostaglandines vasodilatatrices), et de puissants anti-histaminiques qui inhibent la dégranulation des basophiles. Cette salive contient également des substances qui limitent l'adhésion et la fonction inflammatoire des polynucléaires neutrophiles, favorisant ainsi la transmission d'agents pathogènes qui pourraient avoir été injectés (Wikel, 1996 ; Montgomery et coll., 2004). En cas d'immunité acquise de l'hôte, la tique ne dispose d'aucun moyen pour rester fixée. Le gorgement est perturbé et la tique se laisse tomber prématurément. C'est une faille dans la stratégie de la tique qui ouvre la voie à une immunité artificiellement induite par la vaccination (Ribeiro, 1989).

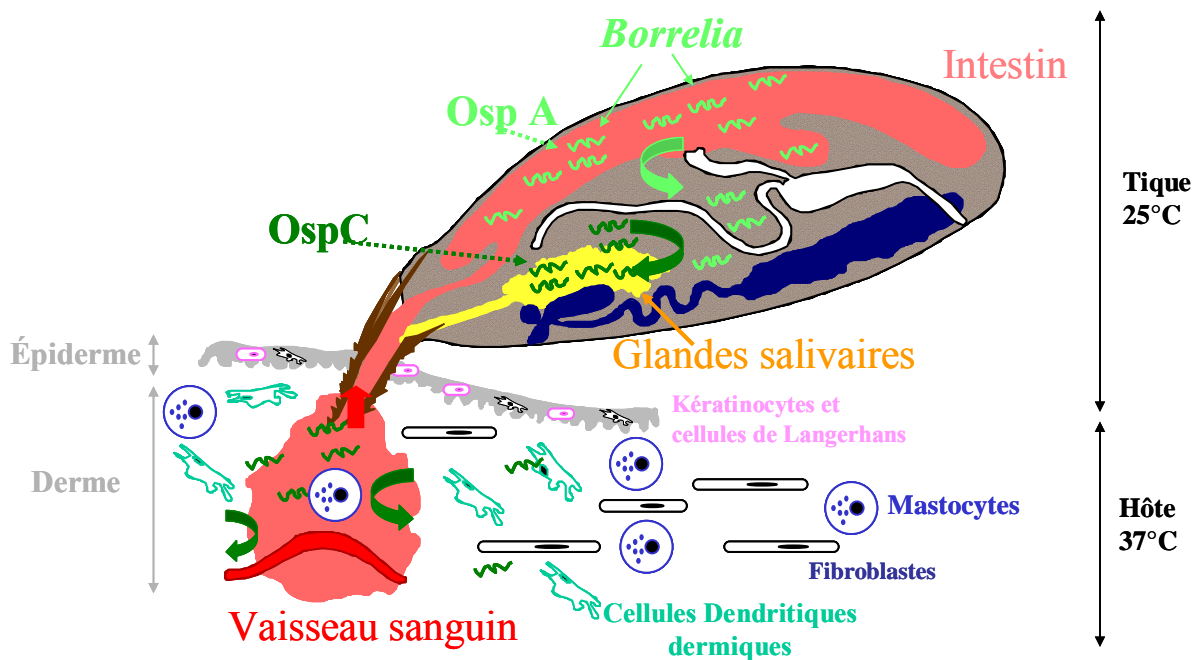


Figure 11 : Transmission de *Borrelia* de la tique vers l'hôte

D'après Mehlhorn, 2001

#### 4.10. L'intestin de la tique adulte.

Le sang des vertébrés est l'unique repas nutritionnel. Le volume du repas sanguin dépend de plusieurs facteurs : l'espèce de l'acarien, la température, l'âge et le stade de développement. La masse du repas sanguin empêche la mobilité du vecteur mais par une très efficace diurèse, cette masse diminue car 80% de cette masse est de l'eau. Elle entraîne un grand stress dans l'intestin de la tique dû à la distension excessive de celui-ci mais la nature des jonctions cellulaires dans l'intestin et son élasticité sont adaptées à résister à ce stress. L'événement important dans la digestion du sang est la lyse des érythrocytes par des hémolysines produites par l'intestin (Valenzuela, 2005 ; Jarwoski, 2005).

### **5. Aspects cliniques de la borréliose de Lyme**

Le polymorphisme clinique que représente la borréliose de Lyme est une caractéristique marquante de cette affection. Il est aussi apparu comme une source de confusion et un facteur critique dans la définition exacte du spectre clinique de cette maladie. L'absence de diagnostic biologique précis disponible en routine intervient ici comme un élément aggravant supplémentaire au flou qui entoure certaines formes cliniques généralement rares. Actuellement, on distingue les descriptions cliniques de la forme européenne et de la forme américaine de l'affection (Nadelman et Wormser, 1998 ; Strle et Stanek, 2009).

Les formes européennes de la maladie de Lyme se caractérisent le plus souvent par la survenue d'un érythème grossièrement circulaire survenant à l'endroit de la morsure de tique. Les symptômes généraux, tels qu'état grippal, frissons, fièvre, arthralgies ou maux de tête sont généralement beaucoup moins marqués qu'en Amérique du Nord où *B. burgdorferi* ss est le seul agent pathogène connu.

Par analogie avec la syphilis, la borréliose de Lyme est classiquement décrite comme évoluant en trois phases :

- 1. La phase primaire**, précoce localisée, est limitée au point d'inoculation et peut guérir spontanément en l'absence de traitement. Elle est suivie ou non d'une phase secondaire,
- 2. La phase secondaire**, précoce disséminée, correspond à l'essaimage de *B. burgdorferi* sl dans les liquides biologiques, elle peut aussi guérir spontanément. Elle est suivie ou non par une phase tertiaire,
- 3. La phase tertiaire**, tardive, survient des mois voire des années après l'infection. Elle se signale par des manifestations neurologiques, articulaires, dermatologiques ou cardiaques chroniques.



Aux Etats-Unis, l'aspect clinique de la borréliose de Lyme (Steere, 1989) est moins polymorphe. La première phase est aussi constituée par l'érythème migrant (EM) suivi par le stade secondaire qui après quelques semaines peut atteindre de nombreux organes (peau, articulations, muscles, cœur). Enfin lui succède le stade tertiaire qui semble, aux Etats-Unis, se limiter aux articulations et au système nerveux. Les arthrites sont les manifestations disséminées les plus fréquentes, soit au stade secondaire (attaques brèves), soit au stade chronique (attaques prolongées).

L'évolution de la maladie en trois phases est donc loin d'être systématique, même lorsque l'infection est restée méconnue. Cependant cette évolution peut être redoutable, car 21% à 60% des malades en phase disséminée ne se souviennent d'aucune morsure de tique (Steere et coll., 1978). La recherche de cette étiologie ne peut donc être limitée aux seuls patients relatant cet épisode, elle doit aussi tenir compte de l'exposition au risque de morsure.

### 5.1. La phase précoce localisée

Le classique **érythème chronique migrant** de Lipschutz est considéré comme pathognomonique (Figure 12). Cet EM survient de quelques jours à quelques semaines après la piqûre de tique. Il s'agit d'une lésion dermatologique, dans laquelle le spirochète responsable peut être isolé par culture. On retrouve l'EM le plus souvent au niveau des membres inférieurs et du tronc. La lésion initiale est une macule centrifuge qui grandit autour du point de la morsure. Elle atteint habituellement une dizaine de centimètres de diamètre, mais peut s'étendre jusqu'à 70 cm. Dans 40% des cas, elle pâlit en son centre lors de la deuxième semaine, dans 70% des cas après la troisième (Valdes, 2001). Des EM multiples sont possibles (50% des cas aux Etats-Unis, moins de 3% en Suède d'après Berglund (1995) et 10% en France (Lipsker, 2007). La lésion peut apparaître comme des indurations de la peau. Parfois des vésicules, une zone desquamative ou de nécrose sont observées.

En Europe, l'EM semble plus inconstant qu'en Amérique, puisqu'il n'est retrouvé que dans un tiers des cas environ de phases disséminées. Il se peut qu'il reste plus facilement méconnu, ou qu'il soit confondu avec d'autres lésions dermatologiques. Dans tous les cas, il disparaît spontanément après quelques semaines ou mois. La forme européenne de la borréliose de Lyme entraîne un discret syndrome grippal, associé à l'EM, avec des somnolences, des céphalées, des arthralgies et des troubles digestifs.



Figure 12 : Exemples d'érythèmes migrants  
 (Collection de D. Lipsker, clinique dermatologique,  
 Hôpitaux universitaires de Strasbourg)

## 5.2. La phase précoce disséminée

Elle débute à quelques semaines voire quelques mois après la phase primaire. Cependant comme dans la syphilis, des manifestations cliniques dans la phase secondaire peuvent se rencontrer dès la phase primaire. Ce sont essentiellement des manifestations neurologiques et rhumatologiques qui la caractérise. Toutes peuvent se rencontrer isolément ou associées. A ce stade, les manifestations cliniques résultent encore essentiellement de la présence de *B. burgdorferi* sl.

### 5.2.1. Les manifestations cutanées

Comme à la phase primaire, des lésions d'EM sont possibles sous forme de lésions multiples, mais elles sont beaucoup plus rares qu'aux Etats-Unis (Figure 13). Le lymphocytome borrélien est une autre manifestation cutanée précoce de la maladie (Figure 13). Il se présente sous la forme d'un petit nodule violacé. On peut rencontrer une ou plusieurs lésions, le plus souvent au niveau du pavillon de l'oreille ou sur l'aérole chez les adultes (Mullegger, 2004).

### 5.2.2. Les manifestations neurologiques ou neuroborrélioses et les manifestations cardiaques

Les atteintes neurologiques sont fréquentes en Europe, de 30 à 60% des cas (Beyout, 1999) en France, elles représentent plus de 50% (Figure 13) (Postic et Ferquel, 2003). L'atteinte cardiaque survient en

moyenne 3 semaines après l'apparition de l'EM (Steere, 2001). Elle se résume le plus souvent à une myocardite modérée, s'associant le plus souvent à des troubles du rythme bénins, qui régressent spontanément ou rapidement sous traitement antibiotique.

### 5.2.3. Les manifestations rhumatologiques

Leur fréquence constitue environ de 10% des cas des borrélioses de Lyme européennes (Figure 13) (Strle et coll., 2002). Elles peuvent survenir de quelques jours à quelques mois après l'apparition de l'EM, lorsqu'il existe. Ce sont des mono- ou oligo- arthrites des grosses articulations survenant brutalement. Le genou est touché avec prédilection.



Lymphocytome cutané      Neuroborreliose



Arthrite      Erythème migrant multiple

**Figure 13** : Exemples de manifestations cliniques secondaires  
(Collection de D. Lipsker, clinique dermatologique,  
Hôpitaux universitaires de Strasbourg)

### 5.3. La phase tardive

La phase tertiaire survient des années après l'EM. Les atteintes dermatologiques, neurologiques et rhumatologiques chroniques dominent. Par contre, la pathogénicité de la bactérie est surtout due aux réactions immunologiques qu'elle a provoqué et qui demeurent encore mal comprises.

Les atteintes dermatologiques rencontrées sont essentiellement l'acrodermatite chronique atrophiante (ACA) (Figure 14). L'ACA est principalement une forme européenne de la maladie. Elle se développe sous forme de plaques violacées qui évoluent lentement vers une atrophie cutanée laissant apparaître les vaisseaux sanguins. Elle est souvent accompagnée d'une neuropathie périphérique. Cette lésion prédomine sur les zones convexes des membres, et respecte les extrémités.

Les atteintes neurologiques chroniques surviennent en moyenne 5 ans après l'EM, elles se traduisent par des atteintes démyélinisantes du système nerveux central. Les atteintes rhumatologiques chroniques subsistent dans 10% des cas après la phase secondaire, elles simulent parfois une polyarthrite rhumatoïde tant sur le plan clinique que radiologique avec des érosions ostéo-cartilagineuses liées à une synovite proliférative.



**Figure 14** : Acrodermatite atrophiante  
(Collection de D. Lipsker, clinique dermatologique,  
Hôpitaux universitaires de Strasbourg)

## 5.4. Les traitements

Le traitement de la maladie de Lyme doit s'envisager différemment selon la phase d'évolution de la maladie. Son efficacité repose sur la précocité de la prise en charge thérapeutique. Si le traitement est tardif, le patient est exposé à une résolution lente de sa maladie et à une persistance de certains symptômes.

Les choix thérapeutiques reposent principalement sur la doxycycline, l'amoxicilline, l'azithromycine ou la ceftriaxone. Pour les EM associés à des manifestations secondaires précoces, il est préconisé une durée de traitement de 21 jours. En dépit d'une antibiothérapie bien conduite, il est prouvé que des *Borrelia* peuvent persister dans l'EM, sans que leur pathogénicité n'ait été démontrée pour autant. Quelques souches de *Borrelia* sont aussi connues pour avoir un haut niveau de résistance à la pénicilline *in vitro*. Malgré un traitement efficace, la symptomatologie clinique peut persister quelques temps.

## **6. La peau et les maladies à transmission vectorielle**

Dans les maladies à transmission vectorielle, l'interface cutanée est un événement essentiel. Dans la borréliose de Lyme, l'inoculation de la bactérie se matérialise par une manifestation clinique. Les patients développent le plus souvent un érythème cutané. Les pathogènes sont inoculés en même temps que la salive, se multiplient puis disséminent.

### **6.1. La transmission de *Borrelia***

Tandis que la tique entreprend son repas sanguin, la composition antigénique de *Borrelia* change de manière importante. Certains gènes de *Borrelia* sont surexprimés comme ceux codant des lipoprotéines de surface (Osp, outer surface protein) et des protéines périplasmiques.

### 6.1.1. Expression des gènes induits par *Borrelia* dans la tique

Dans la tique, l'expression **d'OspA et d'OspB** est induite lorsque le spirochète pénètre dans le vecteur lors du repas sanguin (Schwan et coll., 1995 ; de Silva et coll., 1996 ; Rosa et coll., 1995 ; Ohnishi et coll., 2001), suggérant que ces deux protéines sont utiles durant la phase précoce de colonisation de l'intestin par les spirochètes et pour leur persistance dans la tique vectrice (Schwan et Piesman, 2000 ; Schwan, 2003). La lipoprotéine OspA en particulier, a fait l'objet de nombreuses études car le gène codant *ospA* a été parmi les premiers gènes de *B. burgdorferi* à être cloné. Un vaccin recombinant anti-OspA a ainsi été développé et utilisé chez l'homme et les animaux (Steere et coll., 1998). Son mode d'action est original : les anticorps anti-OspA pris lors du repas sanguin sur l'hôte vertébré immunisé détruisent les spirochètes dans l'intestin de la tique avant que la bactérie n'ait pénétré chez l'homme (de Silva et coll., 1997). Toutefois, le vaccin n'est plus disponible, en partie en raison des réactions immunitaires envers certains domaines antigéniques de la protéine qui pourraient induire une arthrite auto-immune.

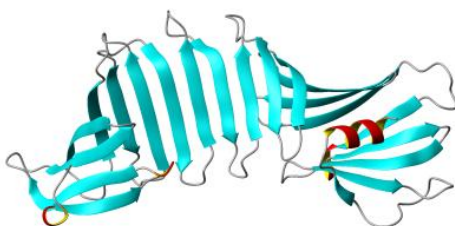


Figure 15 : Structure 3D d'OspA  
<http://rutchem.rutgers.edu>

Les gènes *ospA* et *ospB* sont hautement conservés chez *Borrelia* (Barbour et coll., 1983). Ils sont portés par le plasmide lp54 et généralement codés par un même promoteur (Howe et coll., 1985 ; Bergstrom et coll., 1989). OspA (Figure 15) et OspB sont des lipoprotéines de surface relativement proches en terme de séquence et de structure (Fraser et coll., 1997 ; Li et coll., 1997 ; Becker et coll., 2005). Depuis la découverte de *B. burgdorferi* comme agent de la maladie de Lyme, OspA a été un sujet d'investigation intensif (Munderloh et coll., 2005). Par contraste, peu de choses sont connues sur OspB et son rôle dans le cycle de vie de *B. burgdorferi*. Plusieurs études montrent la présence d'OspB dans les tiques non infectées

mais montrent aussi un rôle critique dans la persistance de *B. burgdorferi* (Neelakanta et coll., 2007). OspB est indispensable à la colonisation et à la persistance de la bactérie chez la tique. OspA et OspB sont exprimées durant l'infection de la tique et se fixent à un récepteur de la tique : TROSPA (tick receptor for OspA) (Pal et coll., 2004). TROSPA est fortement exprimé dans l'intestin de la tique chez la larve et la nymphe et à moindre niveau chez l'adulte. Plusieurs hypothèses ont été émises quant au rôle d'OspB dans l'interaction OspA-TROSPA. La première propose qu'OspB s'associe directement à OspA ou TROSPA et formerait une structure qui est nécessaire à l'attachement de *B. burgdorferi* dans l'intestin de la tique. La deuxième hypothèse propose qu'OspB pourrait se lier à son propre récepteur dans l'intestin et cette interaction serait requise pour qu'OspA se lie à TROSPA. Enfin la troisième hypothèse propose qu'OspA et OspB se lieraient au récepteur TROSPA de manière séparée et que l'ensemble des interactions serait requis pour une bonne fixation de *Borrelia*.

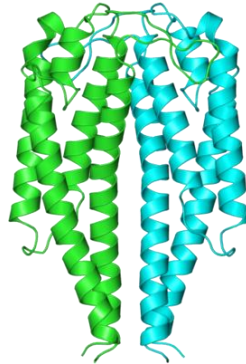
Des études ont montré qu'OspA entraîne une adhésion de *Borrelia* aux cellules endothéliales et peut être impliquée dans le passage de la barrière hémato-encéphalique. Crowley et coll. (2003) démontrent une expression significative d'OspA de *Borrelia in vivo*, si les spirochètes sont dans un environnement inflammatoire. OspA peut être exprimée par les spirochètes après avoir atteint le cerveau. Les auteurs démontrent que l'adhérence de *B. garinii* aux cellules neuronales *in vitro* pourrait être liée à OspA (Rupprecht et coll., 2006).

Une autre lipoprotéine **OspD** a été caractérisée il y a quelques années. C'est une lipoprotéine d'environ 28 kDa (Norris et coll., 1992). Le gène *ospD* est localisé sur le plasmide linéaire lp38 (Casjens et coll., 2000). OspD ne semble pas important dans l'infection chez les mammifères car son expression est diminuée en réponse aux signaux spécifiques de l'hôte. De nombreuses souches virulentes de *Borrelia* ne possèdent pas le gène *ospD* et l'immunisation contre OspD ne protège pas les souris de l'infection par *Borrelia*. Enfin, OspD ne semble pas essentielle pour la transmission de *Borrelia* durant le repas sanguin car des études mimant les conditions de gorgement de tique montrent une diminution de l'expression d'OspD. Cette protéine semblerait plutôt jouer un rôle dans la tique puisque son expression est plus importante à la température ambiante correspondant à celle de la tique qu'à celle de la peau (33°C) (Li et coll., 2007).

### 6.1.2. La transmission de *Borrelia* de la tique à l'hôte :

#### rôle d'OspC

**OspC** est la première protéine identifiée parmi les principales protéines de surface de *Borrelia* (Figure 16). Le gène *ospC* se situe dans le plasmide cp26 qui est un composant ubiquitaire du génome de *Borrelia* (Byram et coll., 2004). Le gène *ospC* est hautement variable (Wilske et coll., 1993 ; Theisen et coll., 1993 ; 1995 ; Jauris-Heipke et coll., 1995). Basé sur des comparaisons de séquences d'*ospC*, les auteurs ont défini des groupes principaux d'*ospC* (Wang et coll., 1999) avec moins de 2% de divergence entre les groupes qui correspondent à différents profils pathogéniques et qui peuvent être corrélés à leur pouvoir invasif chez l'homme (Wang et coll., 1999). La régulation de l'expression d'OspC est contrôlée par la voie Rrp2/RpoN-RpoS (Hübner et coll., 2001 ; Yang et coll., 2003). Dans cette voie Rrp2 et RpoN contrôlent l'expression de RpoS, qui à son tour est responsable de la transcription d'OspC. Les mutations effectuées sur ces trois gènes (*rrp2*, *rpoN*, *rpoS*) abolissent l'expression d'OspC à 37°C (Hübner et coll., 2001 ; Yang et coll., 2003 ; Caimano et coll., 2005). D'autres facteurs exprimés à 37°C peuvent aussi jouer un rôle dans la régulation d'OspC (Alverson et coll., 2003).



**Figure 16** : Structure du dimère d'OspC

<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1f1m/quaternary.html>

La synthèse d'OspC et d'OspA est souvent, mais pas toujours, inversement régulée (Marconi et coll., 1993). Durant la croissance de la bactérie, dans la tique, les niveaux d'OspC sont augmentés par des stimuli comme par exemple la température ou le pH qui entraînent aussi une diminution du niveau d'expression d'OspA (Montgomery et coll., 1996 ; Liang et coll., 2004 ; Pal et coll., 2004).



Durant l'infection chez le mammifère, la transcription d'*ospC* est diminuée et la protéine OspC disparaît de la surface bactérienne environ 2 semaines après l'infection (Montgomery et coll., 1996 ; Hodzic et coll., 2003 ; Crother et coll., 2004 ; Liang et coll., 2004). Ainsi, OspC semble être requise dans différents aspects de la transmission et la migration des spirochètes de l'intestin de la tique vers les glandes salivaires ainsi que lors de la transmission vers l'hôte (Pal et coll., 2004). Des études plus récentes ont montré qu'OspC est absolument requise pour l'infection des mammifères et ce au stade très précoce de l'infection (Schwan et coll., 1995 ; de Silva et coll., 1999). Son expression est aussi affectée par le statut immunitaire de l'hôte. Cet antigène est abondamment exprimé seulement en absence d'une réponse immunitaire adaptative. Cette capacité que possède *Borrelia* à modifier l'expression d'OspC durant l'infection des mammifères permet au pathogène de disséminer dans les tissus de l'hôte (Tilly et coll., 2006, 2007; Stewart et coll., 2006).

OspC est hautement polymorphique avec des changements observés même dans les souches de *Borrelia* provenant de la même aire géographique. Dans une étude sur différentes souches de *Borrelia* collectées chez des patients atteints de la maladie de Lyme et chez des tiques à Shelton Island (NY, USA), les allèles *ospC* ont été classés dans 21 groupes différents (Seinost et coll., 1999). Seuls quatre clones ont été considérés comme infectants et quatre étaient capables de causer une infection disséminée chez l'homme. Les allèles restants sont soit non infectieux soit restreints à la peau et à leur capacité à disséminer (Attie et coll., 2007).

La structure tridimensionnelle d'OspC de *B. burgdorferi* sensu stricto B31 et HB19 a été déterminée en 2001 pour les deux souches (Eicken et coll., 2001 ; Kumaran et coll., 2001). Il s'agit d'un monomère replié en 4 longues et une courte hélices. OspC peut se dimériser en formant une longue structure et la molécule biologiquement fonctionnelle semble exister en dimère. Les structures d'OspC B31 et HB19 sont similaires. La protéine révèle une homologie de structure avec le domaine périplasmique du récepteur à l'aspartate de *Salmonella*, qui est aussi un dimère (Yeh et coll., 1996). Au niveau de la structure primaire, les similarités entre les deux lipoprotéines sont seulement de 13%. La structure dimérique d'OspC est similaire à VspA et B de *B. turicatae* et Vsp26 de *B. hermsii* qui sont les lipoprotéines majoritaires de surface des spirochètes responsables de fièvres récurrentes (Zuckert et coll., 2001). La structure dimérique d'OspC possède une poche de fixation qui représente environ 30% de la surface totale de la molécule. OspC fonctionnerait en tant qu'adhésine, comme d'autres lipoprotéines de *Borrelia* (Coburn et coll., 2005), en se liant à certaines molécules de l'hôte ou de la tique pour initier sa survie dans l'hôte mammifère ou son

entrée dans les glandes salivaires. Un fort potentiel électrostatique négatif à la surface du dimère suggère une propension à se lier à des molécules/ligands chargées positivement. Une comparaison de la surface électrostatique des allèles *ospC* invasifs et non invasifs révèle que des allèles non invasifs ne possèdent pas le même potentiel électrostatique négatif.

La lipoprotéine OspC est ainsi critique dans la phase initiale de transmission. Pal et coll. (2004) montrent que des mutants OspC de la souche invasive 297 sont incapables de migrer vers les glandes salivaires lorsqu'ils sont injectés dans l'intestin de la tique. Grimm et coll. (2004) dans une autre étude, montrent que des mutants OspC générés à partir de la souche invasive B31-A3 sont incapables d'infecter des souris, bien que les spirochètes envahissent les glandes salivaires. Ces différences dans le comportement de ces deux types de mutants suggèrent différents rôles d'OspC. Les différences observées dans ces expériences peuvent être la résultante d'une différence de voie d'inoculation des *Borrelia* dans la tique. Pal et coll. (2004) introduisent les mutants OspC dans la nymphe avant le repas sanguin tandis que chez Grimm et coll. (2004), les spirochètes sont introduits chez la larve par une technique d'immersion de l'arthropode dans la culture de *Borrelia* puis la larve mue pour devenir une nymphe. Les mutants introduits par immersion dans les larves ont un avantage adaptatif à la perte du gène *ospC* par rapport à ceux qui sont injectés dans la nymphe car ces premières ont eu un repas sanguin puis une mue. Cela soulève la possibilité que les mutants adaptés à la tique ont compensé la perte d'OspC en utilisant une autre protéine de surface pour entrer dans les glandes salivaires. Cette hypothèse si elle est prouvée serait en faveur de la flexibilité du transcriptome de *Borrelia* et de l'adaptabilité de son cycle infectieux.

### 6.1.3. Expression des gènes induits par *Borrelia* chez l'hôte vertébré

#### 6.1.3.1. Echappement de *Borrelia*

Une fois chez l'hôte vertébré, le premier obstacle pour *Borrelia* est de surmonter le système immunitaire inné de l'hôte, notamment la cascade du complément. *Borrelia* utilise sa protéine CRASP et ses protéines Erps qui fixent le facteur H du complément et par conséquent inhibent l'activité anti-*Borrelia* de l'hôte (Figure 17). La capacité d'inhiber le complément varie selon les différentes espèces de *Borrelia*. Les protéines Erps ont différentes affinités pour les facteurs protéiques H (Haupt et coll., 2007).

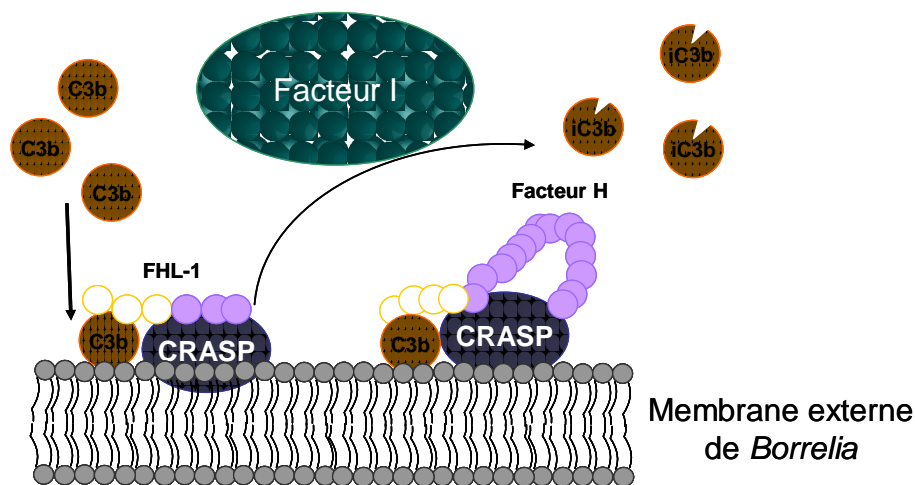


Figure 17 : Mécanisme d'inactivation du complément à la surface des *Borrelia*

D'après Kraiczy et coll., 2001, avec la permission d'Elsevier

Durant l'infection *Borrelia* incorpore des régulateurs solubles du complément humain comme le FHL-1 (factor H-like-1) et le facteur H. Ces facteurs se fixent aux protéines CRASPs (complement regulator-acquiring surface protein) de *Borrelia*. Cette interaction permet la dégradation de C3b directement à la surface de *Borrelia* et donc limite la formation de la C3b convertase. Ce mécanisme peut réduire le nombre de C3b et les molécules iC3b formées à la surface de la bactérie et empêche la phagocytose de *Borrelia*.

La famille de gènes *vlsE* de *Borrelia* code les protéines de surface « Vmp like sequence » expression ou VlsE par analogie avec les protéines variables majeures (Vmp) de *B. hermsii*. Les gènes *vlse* sont organisés sous forme de 15 cassettes localisées sur le plasmide linéaire lp28-1. Ces gènes à fort taux de recombinaison s'expriment au cours de l'infection de l'hôte. Sous la pression du système immunitaire de l'hôte, ils codent des lipoprotéines de 35 kDa dont la structure secondaire varie dans le temps au gré des combinaisons entre les cassettes. Les nouvelles protéines modifiées n'étant plus reconnues par l'immunité adaptative, elles participent aussi à l'échappement des spirochètes vis-à-vis du système immunitaire et à la persistance de *B. burgdorferi* si chez l'hôte. Ce système est apparenté au système pil chez la bactérie *Neisseria*.

### 6.1.3.2 Les adhésines de *Borrelia*

*Borrelia* peut coloniser différents tissus de l'hôte incluant la peau, le cœur, la vessie, le tissu nerveux et les articulations. Dans chacun de ces sites, elle peut causer une infection persistante en dépit de la réponse immunitaire de l'hôte. Des interactions spécifiques entre le pathogène et le tissu de l'hôte sont souvent la première étape critique dans la colonisation. *Borrelia* présente des adhésines de surface pour assurer sa dissémination vers différents sites (Coburn et coll., 2001).

#### 6.1.3.2.1 Liaison aux intégrines : l'adhésine P66

L'attachement de *Borrelia* aux plaquettes sanguines est induit par l'intégrine spécifique des plaquettes  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , également connue sous le nom GPIIb/IIIa. Cette intégrine est le récepteur majeur du fibrinogène, et est responsable de la formation d'agrégats plaquettaires aux sites de lésions endothéliales. L'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , en conformation inactive sur les plaquettes circulantes, acquiert une conformation active lorsque les plaquettes sont exposées à des stimuli tels que l'exposition au collagène, à la thrombine ou à une pression sanguine élevée. Grâce à la reconnaissance de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  active, *B. burgdorferi* se lie aux plaquettes activées, agrégées sur la paroi des vaisseaux lésés.

*B. burgdorferi* se lie également au récepteur de la **vitronectine  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$**  retrouvé à la surface de nombreux types cellulaires, cellules endothéliales et macrophages entre autres. L'activité de liaison de *Borrelia* aux intégrines pourrait promouvoir la colonisation initiale des parois des vaisseaux sanguins : soit directement via l'adhésion aux cellules endothéliales, soit indirectement via les plaquettes activées (Coburn et coll., 1993 ; 1994 ; 1998 ; Coburn et Cugini, 2003 ; Behera et coll., 2006).

Un fragment de la protéine bactérienne de surface **P66** a été identifié comme responsable de la liaison aux chaînes  $\beta\text{3}$  de ces intégrines. P66 est indétectable dans les nymphes de tiques non gorgées, mais est présente dans le sérum de patients infectés. P66 serait donc exprimée par le spirochète lors de l'infection de l'hôte.

#### 6.1.3.2.2. Liaison à la fibronectine : l'adhésine BBK32

La plus étudiée des lipoprotéines de surface de *Borrelia* liant la fibronectine est **BBK32**. La séquence minimum de liaison à la fibronectine de la protéine est conservée au sein des différentes souches de *Borrelia*. Elle présente également des homologues avec les protéines liant la fibronectine de *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes* (Probert et coll., 1998).

L'expression de BBK32 par *Borrelia* est minimale dans la tique non gorgée et maximale lors de l'infection de l'hôte. Ce profil d'expression suggère un rôle important de BBK32 dans la pathogénicité de la bactérie vis à vis de l'hôte. Selon Fikrig et coll. (2000), des souris immunisées avec des anticorps anti-BBK32 sont protégées de l'infection par *Borrelia*, avec une charge en spirochètes réduite de 90% dans les nymphes de tique gorgées sur des souris immunisées. Cependant, les expériences de Li et coll. (2006), indiquent que les *Borrelia* n'exprimant pas BBK32 conservent leur pouvoir pathogène chez la souris, que celle-ci ait été infectée artificiellement par injection ou par piqûre de tique. La perte d'expression de BBK32 chez *Borrelia* n'empêcherait donc ni l'acquisition du spirochète par la tique, ni la transmission à l'hôte. Les auteurs suggèrent donc l'existence de protéines de *Borrelia* complémentaires à BBK32 durant le cycle naturel du spirochète.

#### 6.1.3.2.3. Liaison à la décorine : les adhésines DbpA et DbpB

Dans les tissus humains et murins, *Borrelia* est associée au tissu conjonctif en général et aux fibres de collagène en particulier (Shi et coll., 2008). Ceci laisse supposer l'existence de protéines bactériennes qui permettent la liaison au collagène ou à des molécules associées au collagène. *Borrelia* n'adhère pas aux préparations commerciales de collagène mais reconnaît des matrices natives de collagène de type I. Deux protéines de surface de *Borrelia* sont connues pour initier la liaison à la décorine, un protéoglycane liant la collagène, les DbpA et DbpB (Decorin binding protein A et B) (Fischer et coll., 2003). Ces deux protéines sont homologues à 56% (Coburn et coll., 2005).

**DbpA et DbpB** ne sont pas exprimées durant l'infection de la tique, mais le sont lors de l'infection de l'hôte mammifère. *Borrelia* dissémine moins efficacement dans des modèles de souris déficientes en décorine que dans des souris sauvages. Le spirochète survit également moins longtemps dans les articulations et la peau (deux tissus qui comportent un taux élevé de décorine) de souris mutantes. La sévérité des manifestations arthritiques est moindre pour ces souris.

Les expériences de Guo et coll. (1998) indiquent qu'en dépit de leur structure très similaire, DbpA et DbpB possèdent des spécificités de liaison différentes. DbpA peut inhiber la liaison de DbpB à la décorine, tandis que DbpB ne peut inhiber la liaison DbpA-décorine. DbpA ou DbpB possèdent des propriétés différentes d'adhésion aux glycoaminoglycanes. Les diverses souches de *Borrelia* présentent différents profils d'expression de ces deux protéines, ce qui contribue à leur conférer des spécificités différentes d'adhésion tissulaire. L'induction de l'expression de DbpA et/ou DbpB peut convertir une souche de *B. burgdorferi* non adhérente en une souche liant 293 types de cellules endothéliales (Fischer et coll., 2003). La liaison à la décorine faciliterait ainsi la dissémination et la survie du spirochète dans les tissus riches en décorine, favorisant ainsi l'apparition de certaines manifestations cliniques de la borréliose de Lyme.

#### 6.1.3.2.4. Liaison aux glycosaminoglycanes (GAGs) : l'adhésine Bgp

La spécificité de liaison de *Borrelia* aux GAGs varie selon les souches de spirochète qui présente ainsi un spectre particulier de liaisons à certains types cellulaires. Une hypothèse pour expliquer ce constat est que *Borrelia* produit de multiples adhésines liant les GAGs (Parveen et coll., 1999 ; 2003). L'une de ces adhésines, appelée **Bgp** (*Borrelia* GAG-binding protein) est retrouvée sur la surface externe du spirochète. BBK32 ainsi que DbpA et B peuvent également se lier aux GAGs (Coburn et coll., 2005).

#### 6.1.3.3 Les autres liaisons aux protéines de l'hôte

Le plasminogène (PLG) est une glycoprotéine d'origine hépatique, présente dans le plasma et les fluides tissulaires, inactive par elle-même. La plasmine provient de l'hydrolyse du PLG au niveau d'un résidu arginine. La plasmine ou fibrinolyse, est une sérine-protéase qui hydrolyse la fibrine en fragments appelés produits de dégradation de la fibrine, ainsi que le fibrinogène et d'autres facteurs de la coagulation. Cette réaction est catalysée par deux activateurs : l'urokinase (u-PA) qui provient de la pro-urokinase et l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) sécrété par la paroi vasculaire après un traumatisme et libéré par les cellules endothéliales. L'u-PA et le t-PA sont inhibés par les inhibiteurs du PLG : PAI-1 et PAI-2 (Plasminogen activator inhibitor -1 et -2). Ils réduisent la transformation du PLG en plasmine et donc l'activité fibrinolytique (Figure 18).

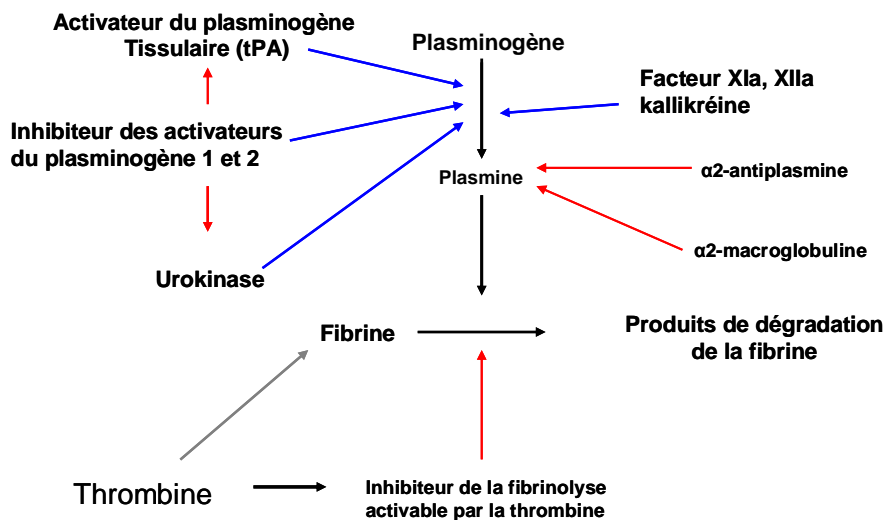
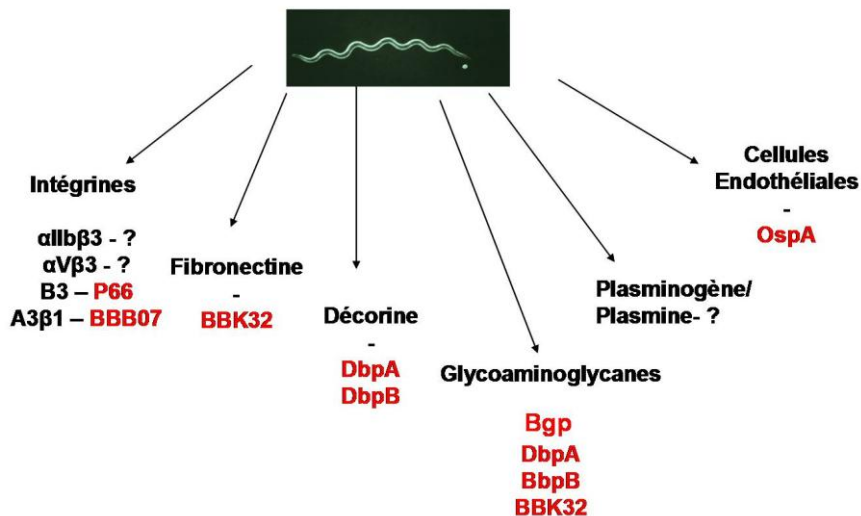


Figure 18: Régulation de l'activité de la plasmine

D'après <http://fr.wikipedia.org/wiki/Plasmine>

Dans l'infection expérimentale par *Borrelia*, la liaison des spirochètes au PLG a lieu dans la tique lors de son repas sanguin, ce qui favorise sa migration du tube digestif vers les glandes salivaires (Coleman et coll., 1997 ; Coleman et coll., 1999). La libération concomitante d'activateurs du PLG par les cellules lésées au site de la piqûre conduit à la formation de plasmine en surface du spirochète (Klempner et coll., 1995) et permet la dégradation de barrières biologiques par son action propre. L'u-PA est ainsi détectable dans le contenu du repas sanguin de la tique. L'action de l'u-PA permet d'augmenter la mobilité des spirochètes au site de la piqûre. La sécrétion concomitante de PAI-2, bien qu'inhibant la formation d'u-PA, permettrait quant à elle de diminuer la migration de cellules phagocytaires et donc d'inhiber une des premières lignes de défense de la réaction immunitaire de l'hôte (Haile et coll., 2006).

La plasmine augmente ainsi la capacité de *Borrelia* à pénétrer les couches endothéliales (Coleman et Benach, 2000) et à dégrader les composants solubles et insolubles de la MEC telles que la fibronectine, la vitronectine et les laminines (mais pas le collagène) (Coleman et Benach, 2000). *Borrelia* recouvert de plasmine influe également sur la régulation des MMPs dans les cellules de mammifères (Hu et coll., 2001) : des spirochètes incubés en présence de plasmine et d'u-PA induisent par exemple l'activation de la pro-MMP9 sécrétée par des monocytes périphériques humains.



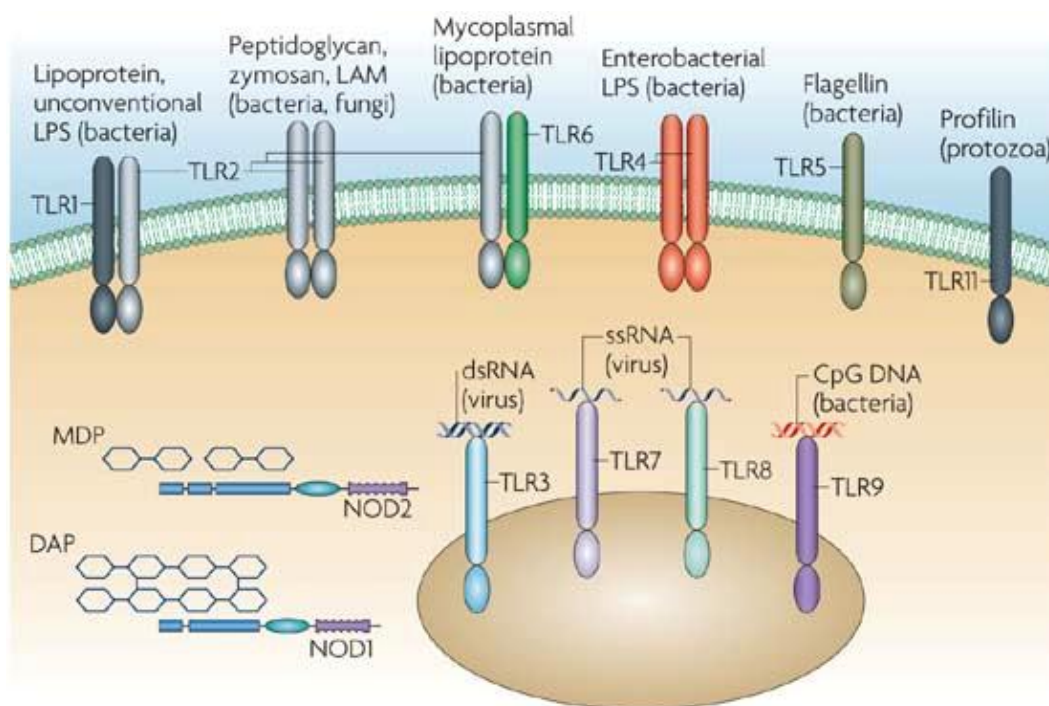
**Figure 19** : Les interactions *Borrelia* – hôte

Décorine, intégrines, etc... : protéines de l'hôte

**BBK32, Bgp, etc...** : protéines de *Borrelia*

#### 6.1.3.4. Les interactions *Borrelia* / TLR

Les TLRs sont des récepteurs ressemblant structurellement aux récepteurs Toll de la drosophile et au récepteur de l'IL-1. Ils sont exprimés par les kératinocytes et les cellules présentatrices d'antigènes. Les TLRs sont des protéines transmembranaires ayant un domaine riche en leucine, et un domaine intracellulaire hautement conservé. A ce jour 10 TLRs humains ont été identifiés, chaque récepteur est caractérisé par un ligand microbien qu'il reconnaît (Figure 20) (Leulier et coll., 2008).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 20 : Les TLRs

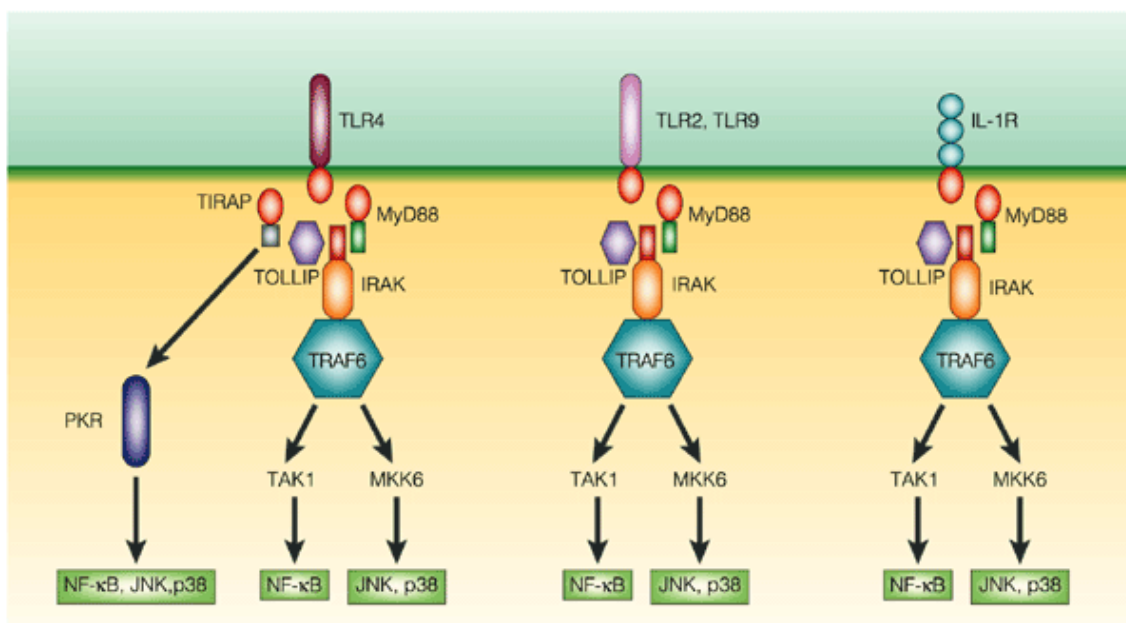
Kaufmann, 2007 avec la permission de Nature publishing group

Les récepteurs TLRs humains sont au nombre de 10. Ces molécules sont soit d'expression membranaire, à la surface des cellules (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR11) ou dans les endosomes/ lysosomes (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9). Chacub de ces récepteurs TLRs reconnaissent un ligand microbien particulier. Les lipoprotéines sont reconnues par les hétérodimères TLR1-TLR2 et TLR1-TLR6 ou l'homodimères TLR2-TLR2. L'ARN double brin et l'ARN simple brin des virus sont reconnus par TLR3, TLR7 et TLR8. Le LPS est reconnu par TLR4, la flagelline par TLR5 et l'ADN hypométhylée des bactéries par TLR9. Enfin le ligand pour TLR10 n'est pas encore connu.



La partie extracellulaire est responsable de la reconnaissance spécifique du ligand, et la partie intracellulaire induit la transduction du signal grâce au couplage avec différentes molécules adaptatrices. Au moins quatre molécules adaptatrices sont connues : MyD88, TIR-domain containing adaptor, TIR domain containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$  (TRIF) et le TRIF-related adaptor (Figure 21).

La plupart des TLRs utilisent la molécule adaptatrice MyD88, qui à son tour active des MAPK kinases et la transcription du facteur NF- $\kappa$ B. Ceci induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires et régulatrices et des chimiokines comme par exemple : l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-12 (Hawlich et Köhl, 2006).



Nature Reviews | Immunology

Figure 21 : Voie de Signalisation des TLRs et de IL-1R  
Medzhitov, 2001 avec la permission de Nature publishing group

Les lipopeptides ou lipoprotéines constituent une partie de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Brandt et coll., 1990). Les lipoprotéines bactériennes ne possèdent pas d'homologie de séquence entre elles mais sont caractérisées par un acide aminé particulier en N-terminal qui est une cystéine acétylée par trois acides gras. Les lipoprotéines des différentes bactéries activent la voie des NF- $\kappa$ B et la production de cytokines (Hirschfeld et coll., 1999).

Le récepteur TLR2 est un transducteur de signal transmembranaire pour les lipoprotéines possédant le motif lipidique Pam<sub>3</sub>Cys incluant les Osps de *Borrelia* (Spohn et coll., 2004). Le motif Pam<sub>3</sub>Cys entraîne

l'induction de réponses humorales via TLR2, suggérant que ce récepteur peut fonctionner comme un récepteur adjuvant d'OspA et d'OspC (Fikrig et Narasimhan, 2006).

Le récepteur TLR2 est essentiel dans la reconnaissance d'OspA mais l'importance d'OspA dans la reconnaissance de *Borrelia* durant l'infection n'est pas encore claire. Les données d'Alexopoulou (2002) montrent que la réponse humorale durant une infection par *Borrelia* est normale dans les souris TLR2<sup>-/-</sup>. Les auteurs montrent qu'une infection aigüe induite par *B. burgdorferi* stimule la réponse immunitaire à travers de multiples voies, incluant peut être plusieurs TLRs et d'autres récepteurs et que l'absence sélective de TLR2 ne résulte pas en une altération dans la production d'anticorps spécifiques de *Borrelia*. De plus, l'absence de TLR2 n'empêche pas la survenue d'arthrite de Lyme ou d'atteinte cardiaque chez la souris mais résulte en une charge plus importante en spirochètes. Il a été aussi montré un rôle fondamental de TLR1 dans la voie de signalisation des lipoprotéines avec des voies différentes utilisées par les lipoprotéines et le peptidoglycane dans la reconnaissance par TLR2. Ces études montrent un lien entre TLR1 et TLR2 et les réponses immunitaires humorales (Alexopoulou et coll., 2002).

#### 6.1.3.4.1 L'interaction Pam<sub>3</sub>Cys et TLR1/2

TLR2 en association avec TLR1 ou 6 est essentiel dans la reconnaissance des lipoprotéines et des lipopeptides bactériens (Takeuchi et coll., 2001 ; 2002). Ces lipoprotéines sont ancrées à la membrane cellulaire via le côté N-terminal modifié par l'apport des lipides (Chambaud et coll., 1999) et induisent de forts signaux pro-inflammatoires dans diverses cellules (Henderson et coll., 1996). Il a été montré que les récepteurs TLR ayant un polymorphisme Arg753Gln sont significativement moins répondeurs aux lipoprotéines bactériennes dérivées de *B. burgdorferi*, *T. pallidum* et *M. tuberculosis* (Lorenz et coll., 2000 ; Ogus et coll., 2004 ; Schröder et coll., 2005 ). De ce fait, le récepteur TLR2 joue un rôle indispensable dans les réponses inflammatoires induites par les lipoprotéines.

La plupart des lipoprotéines bactériennes contiennent des cystéines triacylées conservées au niveau N-terminal, excepté les lipopeptides de *Mycoplasma* comme MALP-2 (Macrophage-activating lipopeptide-2) et FSL-1 qui contiennent des cystéines diacylées (Hantke et Braun, 1973 ; Mùhlradt et coll., 1997 ; Shibata et coll., 2000). Dans les lipoprotéines triacylées, le groupe glycéryl diacylé est attaché à la cystéine au niveau N-terminal via un pont thioéther et la troisième chaîne lipidique est connectée à la cystéine via le pont amide. Dans les lipopeptides diacylés, il manque la chaîne lipidique liée au pont amide. Les groupes palmytoyl sont les chaînes lipidiques les plus communément retrouvés dans les lipoprotéines bactériennes

mais d'autres peuvent être retrouvées (Braun, 1975 ; Mizuno, 1979 ; Zlotnick et coll., 1988 ; Belisle et coll., 1994). Il a été rapporté que les triacylations des lipopeptides sont nécessaires pour la signalisation par le complexe TLR1-TLR2 tandis que les diacylations sont nécessaires pour la signalisation par le complexe TLR1-TLR6 (Alexopoulou et coll., 2002, Takeuchi et coll., 2002 ; Gay et Gangloff, 2007).

#### 6.1.3.4.2. Dimérisation induite par les ligands et activation de TLR1-TLR2

La liaison des lipopeptides induit l'hétérodimérisation des ectodomaines de TLR1 et TLR2 (Jin et coll., 2007). Par conséquent la liaison des lipopeptides aux ectodomaines TLR1 et 2 semble induire un réaménagement des liens faibles et préformés des multimères pour initier le signal. Il a été suggéré que l'homo- ou l'hétéromultimérisation des TLRs active la voie de signalisation grâce à l'induction de la multimérisation de leurs domaines TIR intracellulaires. Les auteurs ont montré que l'hétérodimérisation de TLR1 et TLR2 permet de rapprocher leur domaine C-terminal, qui entraîne l'hétérodimérisation de leur domaine TIR intracellulaire et peut induire une plateforme dans le recrutement des protéines intracellulaires.

Les lipoprotéines de *B. burgdorferi* interagissent avec le complexe TLR2/TLR1, aboutissant à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et la libération de médiateurs inflammatoires. Bien que les motifs bactériens activent les TLRs, de récentes études indiquent que l'interaction des organismes vivants avec les cellules portant des récepteurs TLRs est plus complexe qu'initialement anticipé. Différents composants d'un même organisme peuvent activer différents TLRs et d'autres récepteurs, et peuvent amener à l'activation de multiples cascades de signalisation et l'expression de plusieurs gènes. En ce sens, il a été montré que *B. burgdorferi* se lie aux récepteurs des intégrines comme  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 3$  (Coburn et coll., 1993 ; 1994 ; 1998 ; Coburn et Cugini, 2003 ; Behera et coll., 2006). La liaison du spirochète aux intégrines entraîne l'induction de cytokines et de chimiokines inflammatoires dans les chondrocytes humains primaires. La protéine de *Borrelia* se liant à cette intégrine a été caractérisée, il s'agit de **BBB07** et permet l'induction par les chondrocytes de MMPs et de molécules inflammatoires comme MMP-1, l'IL-6 et l'IL-8 (Behera et coll., 2006 ; 2008).

#### 6.1.3.4.3 Les protéines adaptatrices

**CD14** est une protéine de la famille des LRR (leucine rich repeat) qui a une poche hydrophobe nécessaire à la liaison avec des ligands amphipathiques tels que le LPS et les lipopeptides. Elle catalyse le transfert des ligands au complexe TLR2 (Manukyan et coll., 2005 ; Nakata et coll., 2006). Bien que le récepteur TLR et

les protéines CD14 ne forment pas des complexes stables, ils sont situés à proximité dans la membrane plasmique pour un fonctionnement efficace (Manukyan et coll., 2005 ; Nakata et coll., 2006). Les régions de CD14, responsables dans les interactions avec TLR, sont localisées près de la poche de liaison (Iwaki et coll., 2005 ; Nakata et coll., 2006). Cependant les interactions CD14 et TLR n'ont pas encore été étudiées.

**MyD88** est une molécule adaptatrice qui joue un rôle critique dans le signal de la plupart des TLRs dans les cellules de l'immunité innée (Bolz et coll., 2004 ; Bockenstedt et coll., 2006 ; Shin et coll., 2008). Des études *in vitro* ont montré l'importance de MyD88 comme médiateur du signal inflammatoire dans différentes maladies bactériennes. MyD88 est nécessaire dans l'internalisation et la phagocytose de *B. burgdorferi* et la production de médiateurs inflammatoires par les macrophages dérivés de moelle osseuse de souris. L'étude de Dennis (2009) montre que la voie de signalisation induite par MyD88 est activée par la présence de *B. burgdorferi* dans les monocytes, montrant un rôle critique de MyD88 au cours de la phase initiale de l'infection.

II.  
Le pouvoir  
immunomodulateur  
de la salive  
de tique

## **II. Le pouvoir immunomodulateur de la salive de tique**

La salive de tique est un cocktail de puissants composants pharmacologiquement actifs capables d'inhiber le système hémostatique de l'hôte (Ribeiro, 1987 ; 1995) et d'altérer la réponse inflammatoire et immune de l'hôte (Wikel, 1999 ; Gillespie et coll., 2000 ; Titus et coll., 2006 ; Hovius et coll., 2008). Les molécules présentes dans la salive de tique vont des lipides à une large gamme de protéines. Elles possèdent de nombreuses activités biologiques qui altèrent l'état physiologique au site de repas sanguin et affectent par conséquent la transmission du pathogène (Ribeiro, 1989 ; Valenzuela, 2002).

L'adaptation de la tique à ses différents hôtes naturels résulte en sa capacité à moduler par sa salive la réponse immunitaire et hémostatique de l'hôte. Cependant, sur des hôtes exposés à des piqûres répétées de tique une réponse immunitaire efficace se développe contre les protéines de la salive de tique entraînant son rejet de l'hôte (Ribeiro, 1989).

Du fait de l'importance de la salive de tique dans l'hémostase, l'inflammation, l'immunité et la transmission des pathogènes, l'isolation et la caractérisation des molécules de la salive de tique responsables de ces effets sont des étapes logiques dans la compréhension des mécanismes de la transmission. A ce jour, parmi les 500 protéines qui composent la salive, seulement ¼ ont une fonction connue (Wikel, 1999 ; Brossard et Wikel, 2004).

### **1. Les activités pharmacologiques et anti-inflammatoires de la salive de tique**

La salive des arthropodes a été longtemps considérée comme inerte. Son rôle se limitait à lubrifier les pièces buccales des insectes. Cette vision a changé avec la connaissance de la composition de la salive. Les arthropodes hématophages s'attachent à un hôte vertébré et causent des dommages au niveau de la peau entraînant une activation du système hémostatique, dont le rôle primaire est de limiter la perte de sang.

Les arthropodes hématophages ont besoin de contre-attaquer l'efficacité du système hémostatique. La salive contient donc des composants dont les principales activités peuvent être subdivisées en trois groupes : vasodilatateurs, inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire et inhibiteurs de la cascade de coagulation du sang (Narasimhan et coll., 2002).

## 1.1 Les activités vasodilatatrices

Les molécules vasodilatatrices permettent d'augmenter le flux sanguin et entrent en compétition avec les vasoconstricteurs du système hémostatique. Les vasodilatateurs agissent directement ou indirectement sur les cellules du muscle lisse. Elles activent des enzymes comme l'adénylate cyclase ou la guanylate cyclase. Il se forme de l'AMPc ou du GMPc qui permet la relaxation du muscle et donc entraîne une augmentation du flux sanguin. De manière intéressante, tous les vasodilatateurs de la salive de tique sont des lipides. Aucune protéine salivaire n'a été décrite comme ayant des propriétés vasodilatatrices. Parmi les vasodilatateurs d'*I. scapularis*, il y a par exemple la **prostaglandine E2 (PGE2)** (Ribeiro et coll., 1985). Elle a une durée d'action courte et c'est un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire qui exerce son action en augmentant l'AMPc dans le muscle lisse.

## 1.2. Les facteurs antiplaquettaires

L'agrégation plaquettaire est la première ligne de défense pour éviter l'hémorragie durant une blessure. Les plaquettes sont activées par divers agonistes incluant la thrombine, le collagène et l'ADP. Après quoi, elles s'agrègent pour former un amas plaquettaire qui permet la coagulation et la libération de substances vasoconstrictrices. La capacité des tiques à inhiber l'agrégation plaquettaire réside en la présence de molécules spécifiques qui bloquent l'interaction plaquettaire ou la présence d'enzymes qui détruisent les agonistes des plaquettes (Maritz-Olivier et coll., 2007).

L'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  est un récepteur inactif qui est présent à la surface des plaquettes (Ferguson et Zaqq, 1999). Une fois activée, elle régule l'agrégation et l'adhésion plaquettaire. Elle lie le fibrinogène et permet l'interaction plaquette – fibrinogène - plaquette. Une stratégie employée par la tique pour inhiber l'agrégation plaquettaire est de se lier à ce récepteur et ainsi inhiber l'interaction plaquette – fibronectine. La stratégie antiplaquettaire est utilisée par les tiques molles comme *Ornithodoros moubata* (Keller, 1993 ; Mans et coll., 2003). Une autre stratégie employée par la plupart des tiques est la destruction ou l'hydrolyse de l'agoniste plaquettaire qu'est l'ADP. Ceci est réalisé par des enzymes appelées apyrases. Elles hydrolysent les ponts phosphodiester des nucléosides tri- ou di-phosphates. L'activité apyrase a été décrite dans la salive de tiques d'*I. scapularis* et *O. moubata* (Ribeiro et coll., 1985 ; 1991). Deux classes d'**apyrases** ont été isolées et caractérisées au niveau moléculaire chez les arthropodes hématophages : la famille des 5'nucléotidases présente chez les moustiques et chez les punaises (*Cimex*) et les phlébotomes.

Chez les tiques aucune apyrase n'a encore été identifiées au niveau moléculaire, cependant un ADNc codant pour une 5'nucléotidase a été identifié (Valenzuela et coll., 2002).

### 1.3. Les activités anticoagulantes

La cascade de coagulation sanguine implique l'activation séquentielle de pro-enzymes qui activent la thrombine, qui à leur tour clivent le fibrinogène en fibrine. La polymérisation de la fibrine résulte en la formation de caillot de sang. Les inhibiteurs de la cascade de coagulation dans la salive de tique sont les plus décrits dans la littérature (Waxman et coll., 1990 ; Zhu et coll., 1997).

Une autre stratégie des tiques consiste à bloquer l'activité de la thrombine. La thrombine est un puissant agoniste de l'activation plaquettaire. C'est pourquoi, l'inhibition de l'activité de la thrombine est d'une grande importance pour les arthropodes hématophages. Des anti-thrombines chez les tiques molles ont pu être caractérisées comme anticoagulantes aussi bien que comme inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire (Van de Locht et coll., 1996 ; Mans et coll., 2002 ; Iwanaga et coll., 2003 ; Ciprandi et coll., 2006).

Plusieurs protéines ont été décrites notamment chez la tique *O. moubata* ou *Boophilus microplus* (Horn et coll., 2000). Chez la tique *I. scapularis*, plusieurs anticoagulants ont été décrits (Francischetti et coll., 2004). Un de ces facteurs anticoagulants est nommé **Ixolaris**. C'est un inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (Francischetti et coll., 2002). Le facteur tissulaire est un initiateur de la cascade de coagulation. En réponse à une blessure, les facteurs tissulaires liés à la membrane sont exposés à l'endothélium et aux cellules mononucléaires. Ces facteurs lient le facteur VIIa pour former un complexe qui convertit le facteur X en Xa. L'enzyme ainsi activée clive la prothrombine en thrombine puis la thrombine convertit le fibrinogène en fibrine pour former un caillot. Ixolaris est un inhibiteur à action rapide et à spectre étroit agissant à des concentrations de l'ordre du pM. Il inhibe spécifiquement l'activation du facteur X par le complexe Tissue factor /VIIa. La protéine de salive interagit avec le facteur X et Xa mais pas avec le facteur VIIa inactif. Une autre protéine a été caractérisée : Salp14, protéine de 13,97 kDa, qui inhibe le facteur Xa (Narasimhan et coll., 2002) (Figure 22).



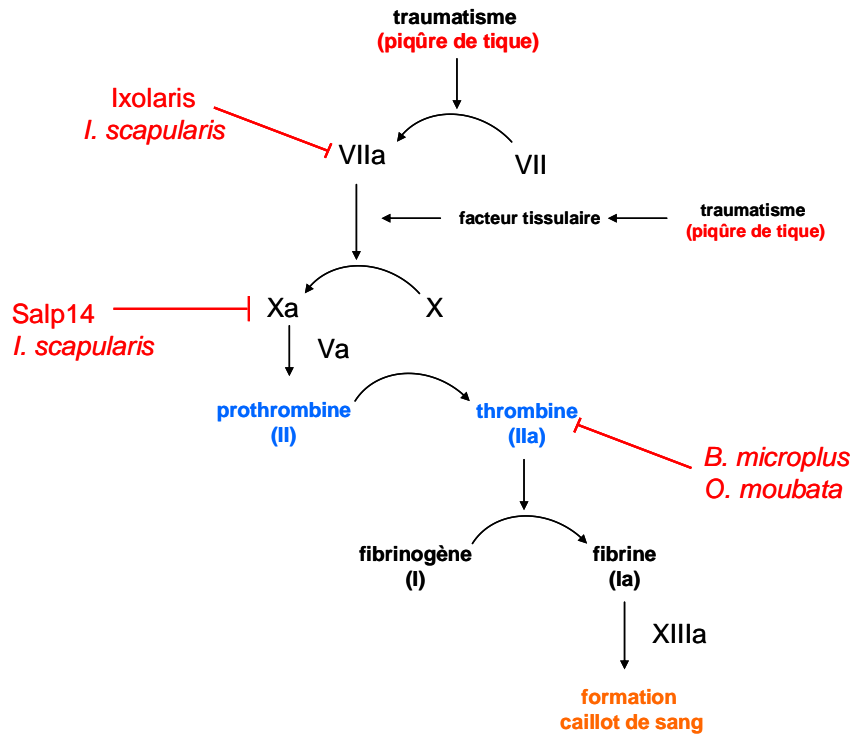


Figure 22 : Action des protéines de la salive de la tique sur la voie de coagulation

#### 1.4. Les activités anti-histaminiques

L'histamine est libérée par les mastocytes et les basophiles. C'est un puissant médiateur inflammatoire qui se lie aux récepteurs de l'histamine causant oedème et érythème par la dilatation et l'augmentation de la perméabilité des petits vaisseaux sanguins. C'est un régulateur de la réponse des cellules T, elle se lie aux récepteurs H1 des lymphocytes et induit une réponse de type Th1 tandis que sa fixation sur un récepteur H2 entraîne une réponse de type Th2 (Jutel et coll., 2001). *Rhipicephalus appendiculatus* possède une série de protéines liant l'histamine qui sont des **lipocalines**. Des protéines homologues ont été décrites chez *I. scapularis* (Valenzuela et coll., 2002) et *I. ricinus* (Beaufays et coll., 2008).

#### 1.5. Les activités anti-sérotonines

La sérotonine est sécrétée par les mastocytes et a des activités similaires à l'histamine. Une protéine liant la sérotonine a été isolée des glandes salivaires de *Dermacentor reticulatus* (Sangamnatdej et coll., 2002).

Cette protéine est similaire en structure à la protéine liant l'histamine de *R. appendiculatus*. Elle a une taille prédictive de 22 kDa et contient 2 sites de fixation, un qui lie l'histamine et un autre plus large qui est capable de se réarranger et de se lier à la sérotonine.

## 1.6. Activités kininases

La bradykinine est un médiateur important de la réponse inflammatoire. Quand le facteur de coagulation XII est activé, il active la prekallikréine en kallikéine. La kallikréine active ensuite le kininogène pour libérer la bradykinine. Celle-ci est un médiateur de la douleur et cause la formation d'un oedème en augmentant la perméabilité capillaire. *I. scapularis* possède une activité qui clive protéolytiquement la bradykinine (Ribeiro et coll., 1985 ; 1998).

## 1.7. Les activités anti-hémostatiques additionnelles de la salive de tique

D'autres activités biologiques relatives à l'hémostase ont été décrites dans la salive de tique, comme par exemple l'activité phospholipase A2 dans la salive d'*Amblyomma americanum* (Bowman et coll., 1997). Cette enzyme hydrolyse une phosphatidylcholine qui est impliquée dans la production de PGE2. Récemment une molécule à activité à la fois gélatinase et fibrinolytique a été identifiée dans la salive d'*I. scapularis* (Francischetti et coll., 2003). Ces activités protéolytiques sont dépendantes d'ions métalliques et ciblent la gélatine, la fibrine, le fibrinogène et la fibronectine mais pas le collagène ou la laminine.

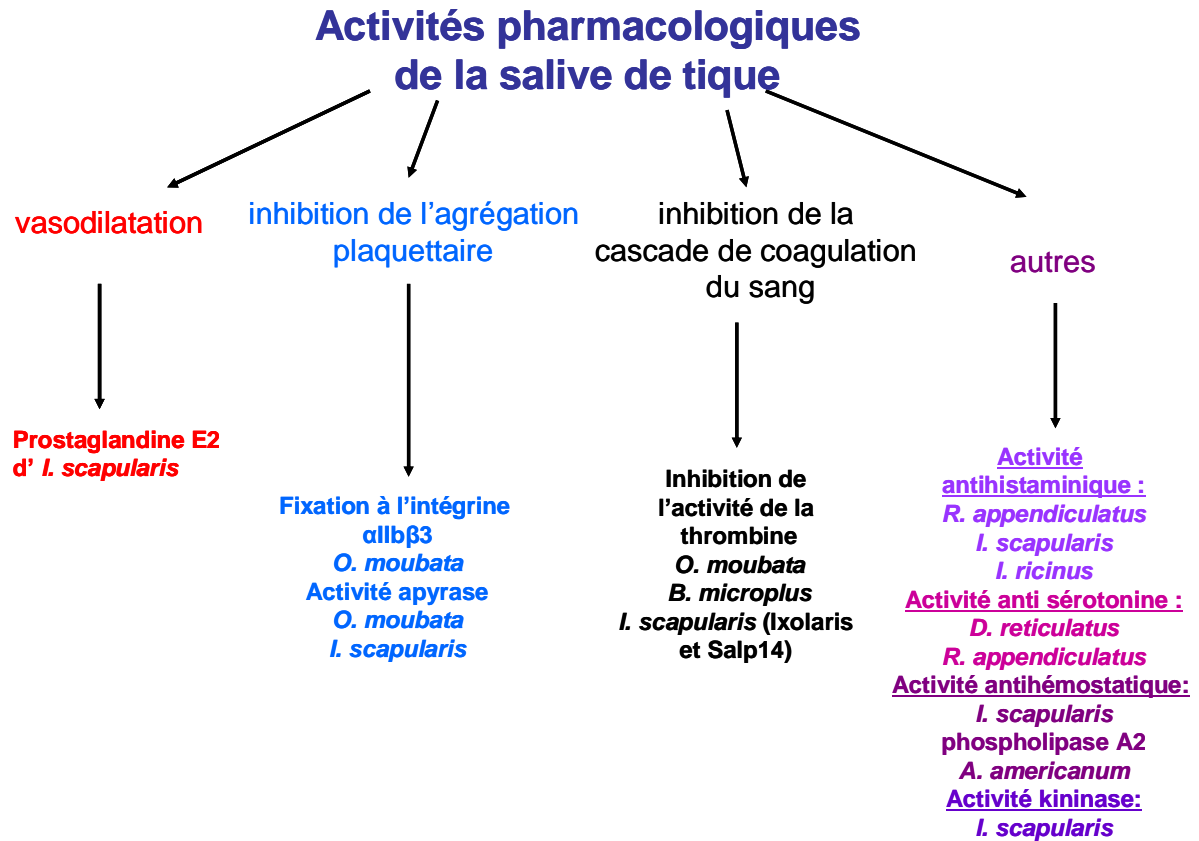


Tableau 2 : Tableau récapitulatif des activités pharmacologiques de la salive de tique

Molécule	Espèce de tique	Cible
<b>Anticoagulants</b>		
Inhibiteurs du facteur Xa		
TAP	<i>O. moubata</i>	Xa protéase à sérine
Salp14	<i>I. scapularis</i>	Xa
Inhibiteur de la voie du facteur de tissu		
Ixolaris	<i>I. scapularis</i>	Inhibe TF/ active X
Penthalaris	<i>I. scapularis</i>	Inhibe TF/ active X
Inhibiteurs direct de la thrombine		
Ornithodorin	<i>O. moubata</i>	Exosite 1
<b>Immunosuppresseurs</b>		
Inhibiteurs du complément		
OMCI	<i>O. moubata</i>	C5
Isac	<i>I. scapularis</i>	C3 convertase
IRAC 1 et 2	<i>I. ricinus</i>	Voie alterne du complément
Salp20	<i>I. scapularis</i>	C3 convertase
Inhibiteurs des cellules T		
Salp15	<i>I. scapularis</i> <i>I. ricinus</i>	Se lie aux cellules T CD4+ diminution expression de l'IL-2 et prolifération des cellules T
IL-2 binding protein	<i>I. scapularis</i>	Inhibe la prolifération cellules T
Iris	<i>I. ricinus</i>	Module la réponse par les macrophages et LT en induisant une réponse Th2 et inhibe la production de cytokines pro- inflammatoires
Sialostatine	<i>I. scapularis</i>	Action sur les LTc, inhibe l'activité de la cathépsine L
Inhibiteurs cellules B		
Protéine inhibitrice des cellules B BIP	<i>I. ricinus</i>	Inhibe la prolifération des cellules B induite par les antigènes de <i>Borrelia</i>
Autres fonctions		
Salp15	<i>I. scapularis</i>	Se lie au récepteur DC-SIGN des cellules dendritiques
Salp15	<i>I. scapularis</i> <i>I. ricinus</i>	Se lie à OspC et protège <i>Borrelia</i> contre les anticorps de l'hôte.
IrLBP	<i>I. ricinus</i>	Lipocaline qui se lie au leukotriène B4
Evasines	<i>I. scapularis</i>	Se lie aux chimiokines

**Tableau 3 :**  
Les différentes protéines de salive de tique  
D'après Hovius et coll., 2008

## 2. Les propriétés immunomodulatrices de la salive de tique

L'inflammation est une réponse immunitaire qui implique entre autres les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes aussi bien que divers médiateurs comme les chimiokines, les enzymes plasmatiques, les médiateurs inflammatoires lipidiques et les cytokines (Montgomery et coll., 2004). Des inhibiteurs de la réponse inflammatoire ont été décrits chez certains arthropodes et plus particulièrement chez les tiques (Tableau 3) (Ribeiro et coll., 2006 ; Steen et coll., 2006 ; Narasimhan et coll., 2007).

### 2.1. L'activité anti-complément

Le complément est une part importante de la réponse inflammatoire (Joiner et coll., 1988). Dans la cascade du complément, les fractions C5a et C3a sont produites (Hugli et coll., 1978). Ces deux fractions sont des anaphylotoxines et ont des activités chimiotactiques pour les neutrophiles. Elles peuvent entraîner une libération des neutrophiles, des mastocytes et des basophiles. L'étape finale de la cascade du complément est la formation du complexe d'attaque membranaire qui cause la lyse des micro-organismes invasifs.

La salive de tique possède des molécules qui inhibent spécifiquement le complément (Ribeiro et coll., 1987 ; Valenzuela et coll., 2000 ; Nunn et coll., 2005 ; Schroder et coll., 2007 ; Tyson et coll., 2007). Un nouvel inhibiteur du complément a été découvert. C'est un inhibiteur de l'activation de la C5 convertase de *O. moubata* : **OMCI** (Nunn et coll., 2005 ; Roversi et coll., 2007). OMCI inhibe l'activation de la C5 convertase en interférant avec celle-ci (Hepburn et coll., 2007). La tique *I. scapularis* elle, exprime une protéine qui inhibe spécifiquement la voie alterne du complément (Ribeiro et coll., 1987). **Isac** est une protéine de 18 kDa qui inhibe la formation de la C3 convertase et agit comme un régulateur de la cascade du complément (Valenzuela et coll., 2002). Une autre protéine **Salp20** d'*I. scapularis* inhibe aussi la C3 convertase. Deux protéines d'*I. ricinus* **IRAC-1 et IRAC-2** (*I. ricinus* anti-complément) affectent aussi la voie alterne du complément (Tyson et coll., 2007).

## 2.2. Les activités anti-chimiokines

Durant la réponse inflammatoire, le recrutement cellulaire est déclenché par des chimiokines, qui sont principalement produites par des macrophages. La chimiokine IL-8 est un puissant chimio-attractant de neutrophiles. Elle déclenche l'activation d'un signal induit par une protéine G qui entraîne l'adhésion des neutrophiles et leur migration trans-endothéliale au niveau du site de piqûre de la tique. Hajnicka (2001 ; 2005) a démontré la présence d'une activité anti-IL-8 dans la salive de tique chez diverses espèces de *Dermacentor* et chez *I. ricinus* et a montré que la salive isolée de différentes espèces de tique contient une variété d'activités inhibitrices dirigées contre les chimiokines CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL5 (RANTES) et CCL11 (eotaxine).

Une étude de Deruaz en 2008 a identifié chez *R. sanguineus* des ADNc codant de nouvelles protéines liant les chimiokines (CHBP : chemokine binding protein), qui ont été renommées **évasines**. Ces CHBPs ont une sélectivité restreinte. L'évasine-1 se lie à CCL3, CCL4 et CCL18 (Frauensschuh et coll., 2007), l'évasine-3 se lie à CXCL-8 et CXCL-1 et l'évasine-4 se lie à CCL5 et CCL11. L'administration de ces évasines recombinantes dans des modèles animaux a montré qu'elles possèdent des propriétés anti-inflammatoires et inhibent le recrutement des neutrophiles, des éosinophiles et des monocytes. Une autre étude menée aussi chez *R. sanguineus* par Oliveira et coll. en 2008 a démontré que la salive de cette tique inhibe sélectivement le chimiotactisme des cellules dendritiques immatures, réduit de manière significative la production de MIP-1 $\alpha$  et module certaines de leurs fonctions immunostimulatrices, ce qui entraîne une diminution de la production de cytokines Th1 et Th2.

## 2.3. Les lipocalines

Les lipocalines de tiques sont des protéines de faible poids moléculaire (environ 160 à 180 acides aminés) avec une large variété de fonctions (Flower et coll., 1993 ; 1996). Elles sont impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire, la régulation de l'hémostase et dans l'élimination de composés endogènes et exogènes. Elles jouent un rôle dans le transport du rétinol et des phéromones, dans l'olfaction et la synthèse des prostaglandines (Flower et coll., 1996).

Elles peuvent se lier à de petites molécules, interagir avec les récepteurs membranaires ou former des complexes macromoléculaires en se combinant avec des protéines solubles. Bien que leur séquence en acides aminés semble très divergente (l'identité entre deux séquences peut être inférieure à 20%), la structure tridimensionnelle des lipocalines est fortement conservée. Elle comporte un tonneau  $\beta$  avec 8 brins anti-parallèles. Les lipocalines sont divisés en deux groupes suivant le nombre de régions conservées.

A ce jour, de nombreuses séquences de lipocalines ont été identifiées, mais peu d'études ont été réalisées pour analyser leurs fonctions et leurs rôles au cours du repas sanguin. **La moubatine** est un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire isolée dans les tiques molles (*O. moubata*) (Keller et coll., 1993). **La TSGP** (tick salivary gland protein of *O. savignyi*) est impliquée dans la biogenèse des granules de sécrétion. Les protéines liant l'histamine provenant de *R. appendiculatus* (Ra-HBPs ou *R. appendiculatus* histamin binding proteins) sont des régulateurs potentiels de la réponse pro-inflammatoire de l'hôte (Paesen et coll., 1999). De manière similaire, **la protéine SHP** de *D. reticulatus* est une lipocaline avec deux sites de liaison, un pour l'histamine et un autre pour la sérotonine. De plus, les lipocalines des tiques molles et celles des tiques dures ont été caractérisées comme des protéines liant l'histamine et/ou le 5-HT (Sangamnatdej et coll., 2002 ; Mans et coll., 2008). Récemment Mans et Ribeiro ont démontré que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire par la moubatine est due au « scavenging » de la tromboxane A2 et la moubatine peut lier le leukotriène B4 avec une haute affinité. L'équipe de Beaufays et coll. en 2008 a isolé et caractérisé plusieurs lipocalines chez *I. ricinus* nommées **LIR (Lipocaline of Ixodes ricinus)**. Différentes approches leur ont permis de définir une lipocaline LIR6 renommée Ir-LBP qui se lie au leukotriène B4 et empêche l'attraction des neutrophiles et l'apoptose (Beaufays et coll., 2008).

## 2.4. Les serpinés

**Les serpinés** (Serine protease inhibitors) sont une famille de protéines ubiquitaires structurellement proches mais avec diverses fonctions. Elles ont été identifiées chez diverses tiques comme par exemple *B. microplus*, *H. longicornis*, *R. appendiculatus* *I. scapularis* et plus récemment chez *I. ricinus* (Kazimirova et coll., 2002 ; Mulenga et coll., 2003 ; Sugino et coll., 2003 ; Imamura et coll., 2005). Les premières études ont montré qu'un immunosuppresseur d'*I. ricinus* (**Iris**) (Lebouille et coll., 2002) est une serpine ayant une haute affinité pour l'élastase des leucocytes (Lebouille et coll., 2002). Iris possède des effets pleiotropiques parce qu'il interfère à la fois sur la réponse immunitaire et sur l'hémostase de l'hôte. Il inhibe la prolifération des lymphocytes T, la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  dans les cellules mononuclées du sang

périphérique, l'adhésion plaquettaire, la coagulation et la fibrinolyse. Iris se lie aux monocytes et macrophages et inhibe leur capacité à sécréter le TNF- $\alpha$  (Prevot et coll., 2006 ; 2007).

## 2.5. Les inhibiteurs des cellules B

La protéine inhibitrice des cellules B **BIP (B cell inhibitory protein)** est une des protéines de la salive de tique qui supprime la prolifération des cellules B chez la souris (Hannier et coll., 2004 ; Yu et coll., 2006). La suppression de la réponse par les lymphocytes permet à la tique d'échapper aux anticorps de l'hôte. De plus, les lymphocytes B ne sont pas capables de reconnaître de manière adéquate les antigènes de *B. burgdorferi* en présence de BIP.

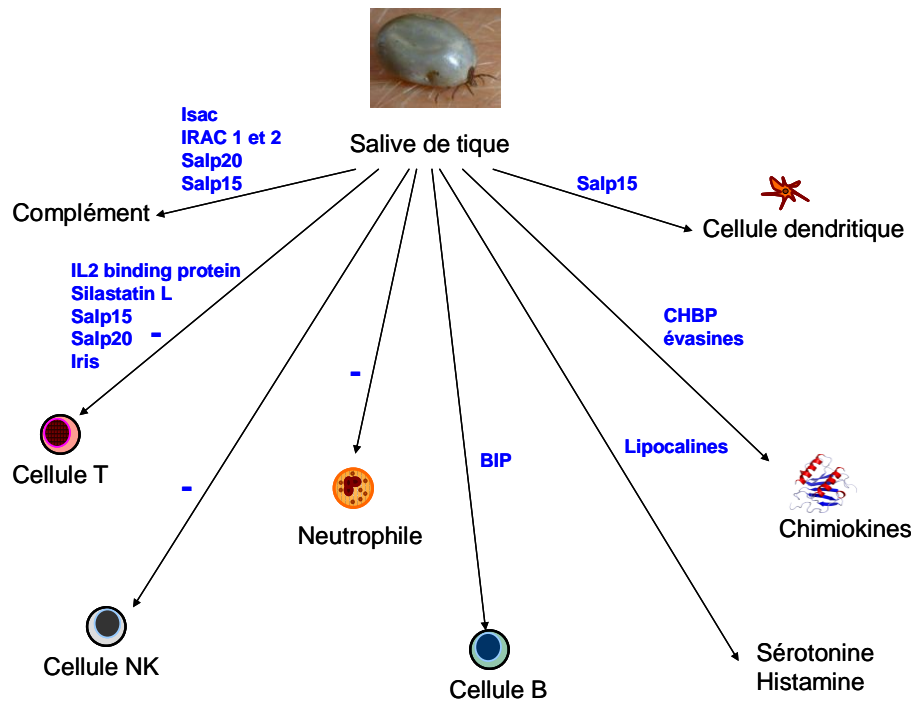


Figure 23 : Action des protéines de salive de tique sur l'immunité de l'hôte  
 IRAC : *I. ricinus* anti complément ; BIP : B cell inhibitory protein  
 CHBP : chemokine binding protein



## 2.6. Cas particulier de Salp15

Parmi les protéines de la salive tique qui ont été décrites précédemment l'une d'entre elles, Salp15, sera plus détaillée du fait de son rôle dans l'immunité innée et adaptative. Salp15 est une protéine de salive de tique qui a été identifiée initialement en 2001 par Das et coll. chez *I. scapularis*. C'est la première protéine identifiée comme étant responsable de la répression directe de la production d'IL-2 durant l'immunité acquise. L'étude de Ramaamorthi en 2005 a montré que *B. burgdorferi* utilise à son profit cette protéine de la salive de tique pour faciliter l'infection dans les souris. Salp15 est exprimée de façon constitutive dans les glandes salivaires et est sélectivement augmentée en cas d'infection d'*I. scapularis* par *B. burgdorferi*, mais pas lors de l'infection par *Anaplasma phagocytophilum*, un autre pathogène se développant chez *Ixodes*.

*I. ricinus* possède trois homologues de Salp15 d'*I. scapularis* : Iric-1, Iric-2 et Iric-3. Salp15 Iric-1 possède 82% de similarité avec Salp15 d'*I. scapularis*. Salp15 Iric-1 interagit avec toutes les espèces de *Borrelia* présentes en Europe mais protège différemment *Borrelia* contre les anticorps de l'hôte infecté, donnant peut-être un avantage à certaines espèces de *B. burgdorferi* ss pour survivre dans la nature (Hovius et coll., 2008).

Salp15 provenant tant d'*I. scapularis* que d'*I. ricinus* protègent *B. burgdorferi* ss et *B. garinii* contre l'action du complément de l'hôte. Salp15 d'*I. ricinus* montre un effet protecteur plus fort comparé à *I. scapularis*. En effet *B. garinii* est mieux protégée quand elle est associée à Salp15 d'*I. ricinus* qu'avec celle *I. scapularis*. La formation du complexe d'attaque de membrane C5-C8 à la surface des *Borrelia* est inhibée par la présence de Salp15. *Borrelia* a donc besoin de Salp15 pour se protéger contre le système du complément de l'hôte (Schujit et coll., 2008).

Salp15 adhère aux spirochètes à la fois *in vitro* et *in vivo*, et ce de manière spécifique via OspC (Ramamoorthi et coll., 2005). La fixation à Salp15 permet de protéger les spirochètes contre l'action des anticorps de l'hôte et permet aux spirochètes d'avoir un avantage marquant pour leur survie quand ils sont inoculés tant dans les souris naïves que chez les animaux au préalable immunisés contre *B. burgdorferi*. L'infection de RNAi dirigés contre Salp15 dans les tiques *I. scapularis* réduit de manière drastique la capacité des spirochètes à infecter les souris. Ceci montre la capacité du pathogène à utiliser une protéine d'arthropode pour l'aider à coloniser l'hôte mammifère.

D'autres études ont montré que Salp15 inhibe l'activité des cellules T CD4+ à travers la répression des flux calciques engendré par une liaison au TCR (T cell receptor) et aboutissant à une inhibition de la production de l'IL-2 (Gillespie et coll., 2001 ; Anguita et coll., 2002 ; Lebouille et coll., 2002 ; Garg et coll., 2006). Salp15 se fixe spécifiquement aux résidus C-terminaux des domaines extracellulaires de CD4 (Anguita et coll., 2002). Une fois liée au CD4, Salp15 inhibe le signal des cellules T : incluant la phosphorylation de la kinase Src Lck, puis la répression de l'activation de PLC $\gamma$ -1 (Garg et coll., 2006) et du flux calcique conduisant à une inhibition d'IL-2.

Salp15 interagit aussi avec un récepteur des cellules dendritiques de type lectine, DC-SIGN, impliqué dans l'activation de la kinase Raf-1 et de MEK (mitogen-activated protein kinase) (Hovius et coll., 2008). Ceci induit une inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires à différents niveaux. La diminution du remodelage du nucléosome au niveau du promoteur 12p35 empêche la production de l'IL12p70, tandis que l'inhibition de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  est induite par une augmentation de la dégradation de leurs ARNms respectifs. Une suppression similaire des cytokines pro-inflammatoires est observée lorsque les cellules dendritiques sont activées avec *Borrelia* en présence de Salp15, indiquant que le spirochète utilise Salp15 pour induire une immunosuppression.

Salp15 a déjà fait l'objet d'études pour une application éventuelle en thérapeutique. Dans l'asthme, Salp15 empêche le développement de la pathologie dans le modèle murin de l'asthme en inhibant la génération des cellules T CD4+ effectrices, ce qui fait que les événements relatifs à l'asthme allergique ne sont pas générés. On a alors une diminution des IgE et IgG1 qui est corrélée à la suppression d'IL-4 mais aussi celle d'IgG2 *in vivo* (Paveglione et coll., 2007). L'étude de Juncadella et coll. en 2007 a montré que Salp15 inhibe aussi au moins partiellement l'interaction entre la protéine du VIH gp120 et CD4.

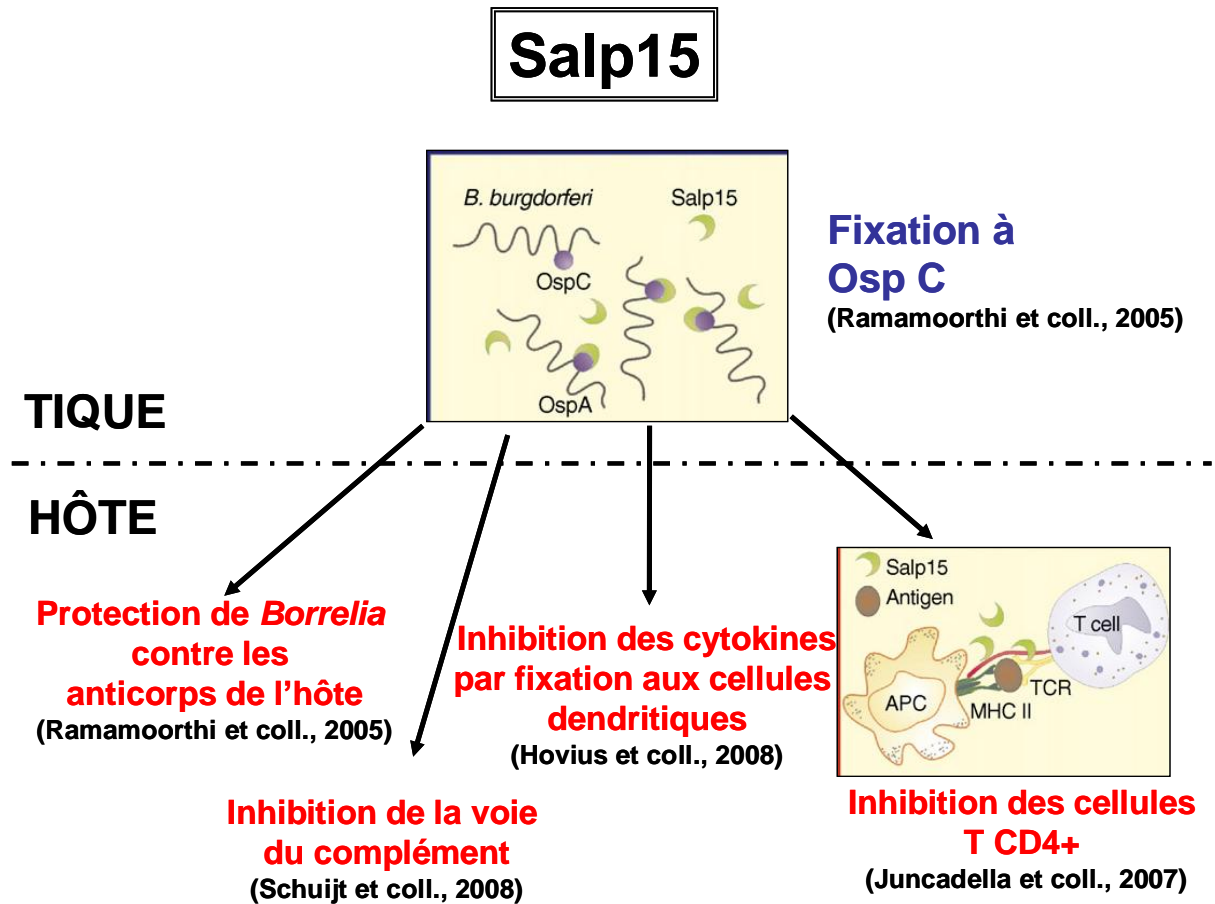


Figure 24 : Les différents sites d'action de Salp15 chez la tique et chez l'hôte  
D'après Hovius et coll., 2007, avec la permission d'Elsevier

### III. Peau et immunité

#### 1. La peau humaine

La peau est un organe complexe recouvrant le corps en entier (Figure 25). Elle assure plusieurs fonctions nécessaires à la survie de l'organisme comme la protection contre les agressions physiques, chimiques et biologiques extérieures (Kanitakis, 2002). Elle a aussi un rôle dans la régulation thermique, l'excrétion, l'immunité, la synthèse de la vitamine D3 et constitue un excellent capteur d'informations extérieures grâce aux milliers de terminaisons nerveuses qu'elle contient. De plus, les nombreux vaisseaux sanguins qui traversent le derme transportent de 8 à 10 % du sang en circulation dans le corps, ce qui fait de la peau un important réservoir sanguin (Tortora et coll., 1994). Le développement adéquat de la peau est nécessaire même au stade embryonnaire puisque des mutations bloquant la spécification, la stratification ou la différenciation de l'épiderme peuvent avoir des conséquences graves sur la survie ou la santé du fœtus. La peau représente un organe important pour la santé.

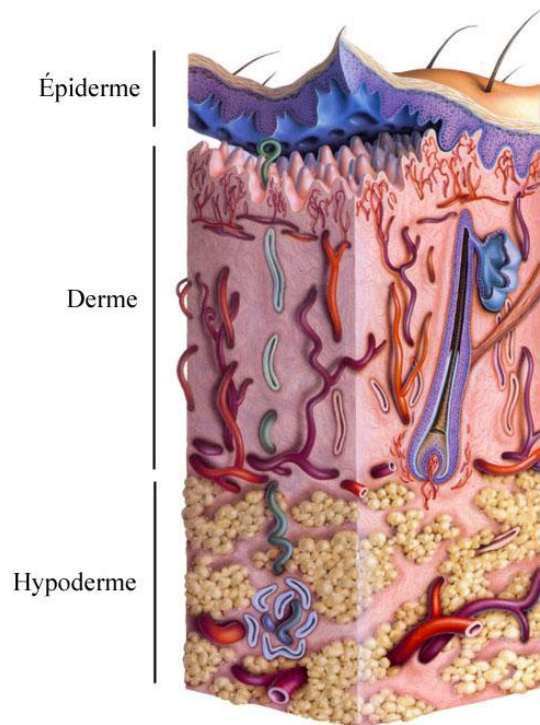


Figure 25 : La peau normale humaine

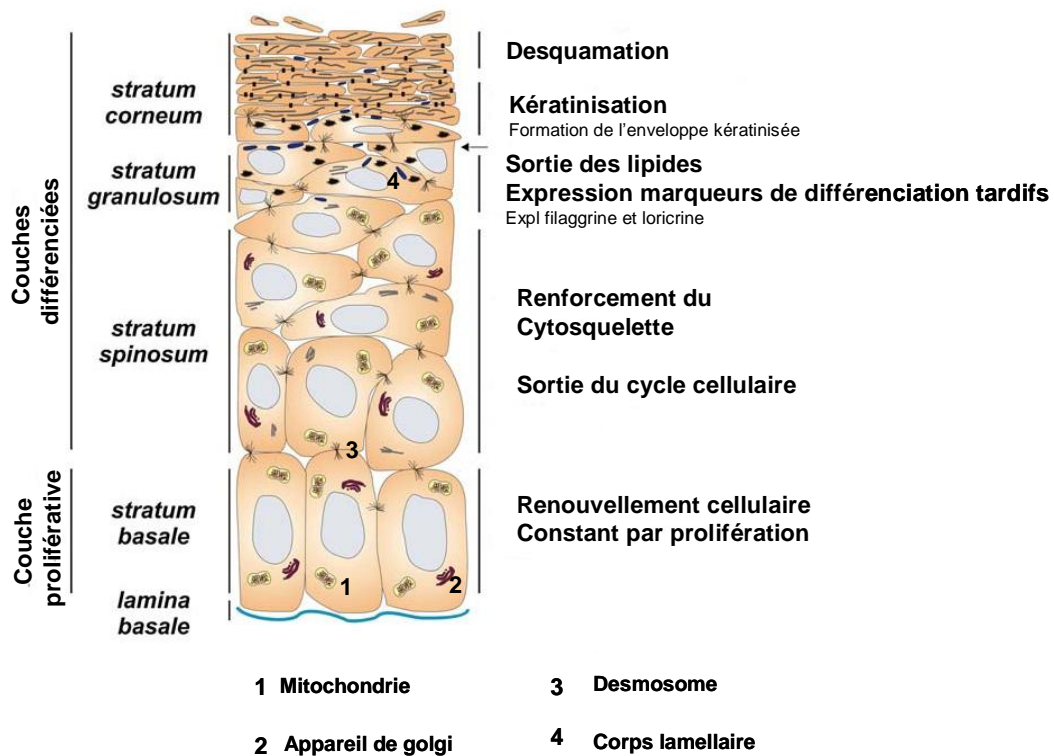
(Geras, 1990)

La peau humaine normale est constituée de trois couches principales dont les cellules interagissent ensemble afin d'assurer les différentes fonctions de la peau. La partie la plus superficielle, l'épiderme, est mince et composée d'un épithélium pavimenteux stratifié et kératinisé. Il est attaché à une couche

interne plus épaisse, formée notamment de tissu conjonctif et de vaisseaux sanguins, le derme. La couche la plus profonde, l'hypoderme, est la couche sous-cutanée, composée de tissus conjonctifs auréolaires et adipeux. Les fibres du derme s'y rattachent et fixent ainsi la peau puisque l'hypoderme est lui-même fermement attaché aux tissus et organes sous-jacents (Gartner et coll., 1992; Tortora et coll., 1994).

### 1.1. L'épiderme

L'épiderme est la couche en contact direct avec l'environnement extérieur et protège l'organisme contre celui-ci (Figure 26). Il est la couche protectrice de la peau qui empêche les agents pathogènes d'envahir l'organisme et qui maintient l'eau et les nutriments à l'intérieur. Il a une épaisseur moyenne de 100 µm, mais celle-ci peut varier considérablement selon la région du corps et le niveau de kératinisation (Kanitakis, 2002).



**Figure 26 :** Les différentes couches de l'épiderme  
D'après Lippens, 2009

Les cellules qui composent l'épiderme sont à 95 % des **kératinocytes**. Ils produisent de la **kératine**, qui imperméabilise et protège la peau et les tissus sous-jacents (Gartner et coll., 1992 ; Tortora et coll., 1994). Les 5 % restants sont composés de mélanocytes, de cellules de Langerhans et de cellules de Merkel.

Les mélanocytes donnent la pigmentation à la peau en produisant de la mélanine synthétisée dans leurs organites spécialisés, les mélanosomes. Ces cellules sont réparties à travers les kératinocytes de la couche basale, mais elles se retrouvent aussi dans les follicules pileux et dans le derme. Les cellules de Langerhans jouent un rôle important dans l'immunité. Ce sont des cellules dérivant de la moelle osseuse qui captent les antigènes et les transportent aux ganglions régionaux. Les cellules de Merkel se trouvent aussi dans la couche basale. Elles sont associées à des terminaisons nerveuses afférentes et agissent comme mécanorécepteurs (Gartner et coll., 1992 ; Kanitakis, 2002). Ces cellules sont organisées en plusieurs couches, chacune ayant un rôle dans le maintien des fonctions de la peau.

### **1.1.1. La couche basale germinative (*Stratum basale*)**

Cette couche est composée de cellules en prolifération constante. Elle contient les cellules souches épidermiques qui subissent des divisions mitotiques afin de produire des cellules qui assureront le renouvellement de la peau en se différenciant et en migrant vers la surface pour aller peupler les couches plus superficielles (Tortora et coll., 1994). Ce processus de différenciation s'étale sur une durée de 28 jours et est stimulé par des facteurs de croissance comme l'EGF (epidermal growth factor) et le TGF- $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ) ainsi que des hormones comme l'œstrogène, la progestérone et l'épinéphrine. Les cellules de la couche basale ont une forme cubique et un arrangement très serré. Elles sont attachées au derme par des hémi-desmosomes qui sont des structures d'attachement spéciales (Borradori et coll., 1999 ; Kanitakis, 2002). La jonction dermo-épidermique se situe sous cette couche et forme des creux et des pics appelés crêtes épidermiques qui ont comme rôle principal d'améliorer l'attachement de l'épiderme au derme pour éviter un décollement de l'épiderme lors de frottements. Les cellules de la couche basale vont être responsables de la production d'une grande partie des molécules formant la membrane basilaire (Kanitakis, 2002).

### **1.1.2. La couche épineuse (*Stratum spinosum*)**

Cette couche est formée de cellules présentant de nombreux desmosomes tout le long de la bordure cellulaire qui servent à lier les cellules entre elles. Cette caractéristique lui donne une apparence épineuse, d'où le nom de cette couche. Les cellules qui forment cette couche sont plus grosses que celles de la couche basale, sont polyédriques et s'agencent en huit à dix rangées. Ces cellules synthétisent l'**involucrine**, une protéine soluble précurseur du composé formant l'enveloppe cornée. La **loricrine**, un autre composant de l'enveloppe cornée, est aussi produite par les cellules de cette couche (Candi et coll., 2005).

### **1.1.3. La couche granuleuse (*Stratum granulosum*)**

Cette couche est composée de trois à cinq rangées de cellules plus aplaties et étirées, s'alignant parallèlement à la surface de la peau. Elles contiennent dans leur cytoplasme des granules de **kératohyaline** (Tortora et coll., 1994). Ces granules contiennent de la profilaggrine qui est clivée pour devenir de la **filaggrine**. Cette dernière est une protéine hautement phosphorylée qui favorise l'agrégation des filaments de kératine. De plus, les noyaux des cellules de la couche granuleuse sont en dégénérescence, mais toujours actifs. Cette couche constitue la dernière couche nucléée de la peau.

### **1.1.4. La couche transitoire (*Stratum lucidum*)**

Cette couche constitue une transition vers la couche cornée et n'est présente que dans la peau épaisse, comme celle de la plante des pieds et de la paume des mains. Elle est constituée de trois à cinq rangées de cellules mortes, aplaties et transparentes (Tortora et coll., 1994). Les cellules de la couche transitoire ne contiennent qu'un noyau inactif en dégradation, mais elles présentent une forte activité enzymatique où des enzymes lysosomales, comme la DNase et la RNase, dégradent le noyau et les organelles. Ces cellules libèrent aussi une petite quantité de matériels lipidiques qui forment une pellicule enveloppante les protégeant contre la dégradation de leur membrane cellulaire

### **1.1.5. La couche cornée (*Stratum corneum*)**

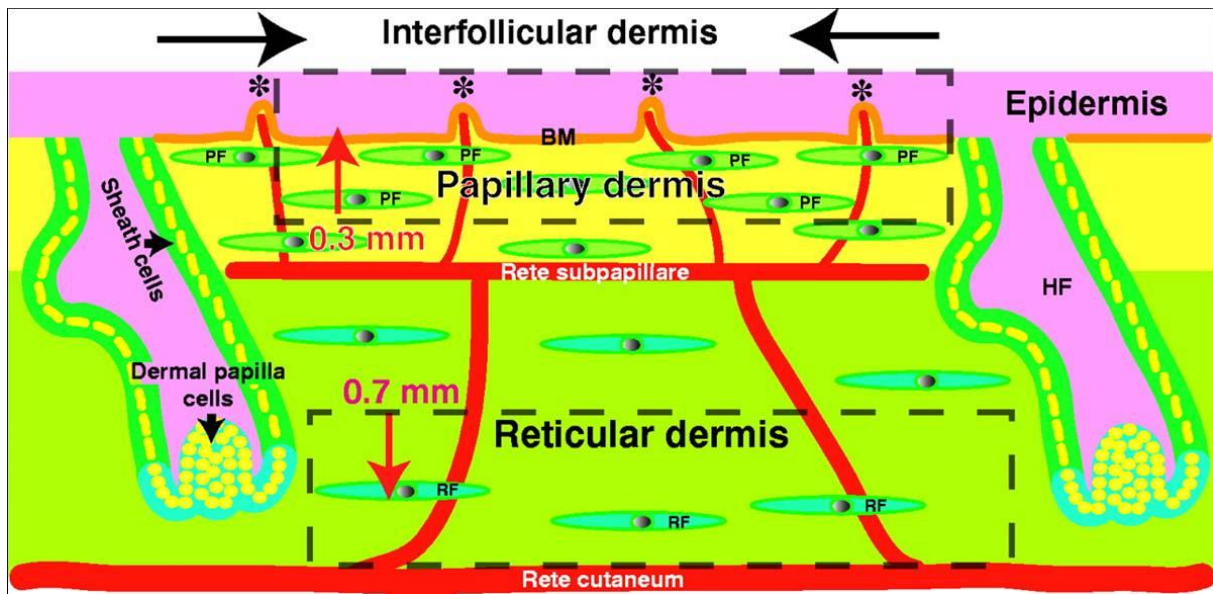
Cette couche est composée de 25 à 30 rangées de **cornéocytes**, cellules mortes de forme hexagonale très aplaties et qui n'ont plus de noyau ni d'organelle. Elles sont faites d'une matrice dense de kératines filamenteuses. Les cellules de cette couche desquament graduellement durant le processus de différenciation et sont remplacées par des cellules de la couche inférieure. La couche cornée est hautement résistante à la digestion enzymatique et aux changements de température et de pH. Elle contribue ainsi à la fonction de barrière de la peau, la protégeant contre la lumière, la chaleur, les bactéries et les produits chimiques.

## 1. 2 Le derme

Le derme est la couche qui donne la souplesse et la résistance à la peau. Il est composé principalement de tissu conjonctif qui le rend compressible et élastique (Figure 27). Il constitue un support pour les différentes annexes cutanées : les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les poils, les terminaisons nerveuses et les glandes sébacées et sudoripares. Ces annexes entourées de fibres majoritairement constituées de **collagènes de type I et III**, sont arrangées en filet pour assurer souplesse et solidité. Les **fibroblastes** sont majoritaires et synthétisent tous les types de fibres et quelques constituants de la membrane basilaire. Les **fibrocytes**, les **fibroclastes** et les **myofibroblastes** sont des dérivés des fibroblastes ayant des fonctions plus spécifiques qui se trouvent aussi dans le derme. D'autres types cellulaires peuvent être présents en moindre quantité : des cellules dendritiques dermiques, des mastocytes, des macrophages et des lymphocytes (Kanitakis, 2002). L'épaisseur du derme varie considérablement selon la localisation anatomique.

Le derme peut être divisé en deux parties distinctes : **le derme papillaire** (superficiel) et **le derme réticulaire** (profond). Le derme papillaire constitue le cinquième de l'épaisseur totale du derme. Il forme des crêtes qui sont en contact avec les crêtes formées par l'épiderme. Ces papilles dermiques augmentent la surface de contact entre le derme et l'épiderme, ce qui permet une meilleure adhésion entre les deux couches. Le derme est composé de tissu conjonctif **lâche** et de minces fibres élastiques et contient plusieurs types cellulaires, des vaisseaux sanguins et des terminaisons nerveuses (Tortora et coll., 1994 ; Kanitakis, 2002). Le derme réticulaire, quant à lui, est fait de tissu conjonctif **dense** et irrégulier composé de faisceaux de fibres de collagène de type I et III et de grosses fibres élastiques. Les espaces entre les fibres sont occupés par des follicules pileux, des nerfs, des glandes sébacées et des canaux de glandes sudoripares (Tortora et coll., 1994).





PF : papillary fibroblasts (fibroblastes papillaires) ; RF : reticular fibroblasts (fibroblastes réticulaires)  
 BM : basement membrane (membrane basale) ; HF : hair follicle (follicule pileux)

Figure 27 : Structure du derme  
 Sorrell et coll., 2004

### 1. 3 L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Il est constitué de tissu adipeux qui a pour fonction d'emmagasiner l'énergie sous forme de graisse. Environ la moitié de la graisse emmagasinée dans le corps humain est retrouvée dans cette couche. L'hypoderme joue aussi un rôle de thermorégulation et de protection contre les agressions mécaniques. Les cellules qui peuplent l'hypoderme sont les adipocytes. Ce sont des cellules rondes remplies d'acides gras et de triglycérides comprimant le noyau contre la membrane plasmique (Kanitakis, 2002). Les adipocytes sont organisés en lobules primaires et secondaires et leurs morphologies varient selon la région du corps et l'origine ethnique. Cette couche contient aussi des fibroblastes et des macrophages, en plus de vaisseaux sanguins et des terminaisons nerveuses.

## 1.4. La matrice extracellulaire

On peut définir la matrice extracellulaire (MEC) comme un réseau de macromolécules sécrétées par les cellules, qui remplit l'espace extracellulaire (Figure 28).

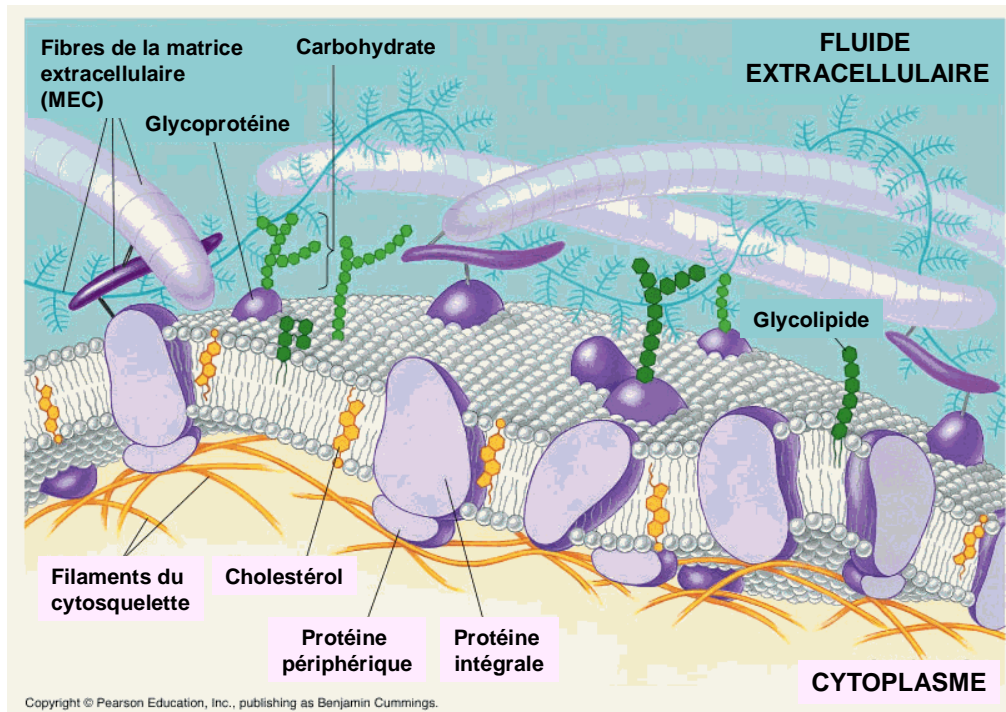


Figure 28 : Structure de la matrice extracellulaire

[www.kentsimmons.iwinnipeg.ca](http://www.kentsimmons.iwinnipeg.ca)

Selon sa composition, la MEC peut prendre divers aspects : 1) **liquide** comme le liquide interstitiel ou le liquide synovial riches en polysaccharides, 2) **gélatineux** comme les tendons riches en protéines fibreuses, 3) **solide** comme l'os riche en phosphates de calcium. La membrane basale qui sépare le tissu épithélial du tissu conjonctif constitue un type de MEC. La production des constituants de la membrane basale est le résultat de la coopération des kératinocytes de l'épiderme et des fibroblastes du derme (Fleischmajer et coll., 1998).

On peut distinguer deux types de composants de la MEC : les **éléments fibrillaires** comme les fibres de collagène et la fibronectine et les **composants non fibrillaires** comme l'acide hyaluronique, les protéoglycanes et certaines glycoprotéines. Les protéines de la MEC interagissent avec des récepteurs liés au cytosquelette pour réguler la morphologie et la migration cellulaire. Elles participent aussi à la régulation de la prolifération et à la survie cellulaire. L'ensemble de ces mécanismes est régulé par des **métalloprotéases** (MMPs) spécifiques qui modulent la MEC. Elle n'est donc pas un ensemble figé de molécules, mais plutôt un complexe dynamique.

## 1.4.1. Les composants de la matrice extracellulaire

### 1.4.1.1. Les protéoglycane

Les protéoglycane (PGs) sont des protéines portant des chaînes glycosaminoglycane (GAGs) (Figure 29).

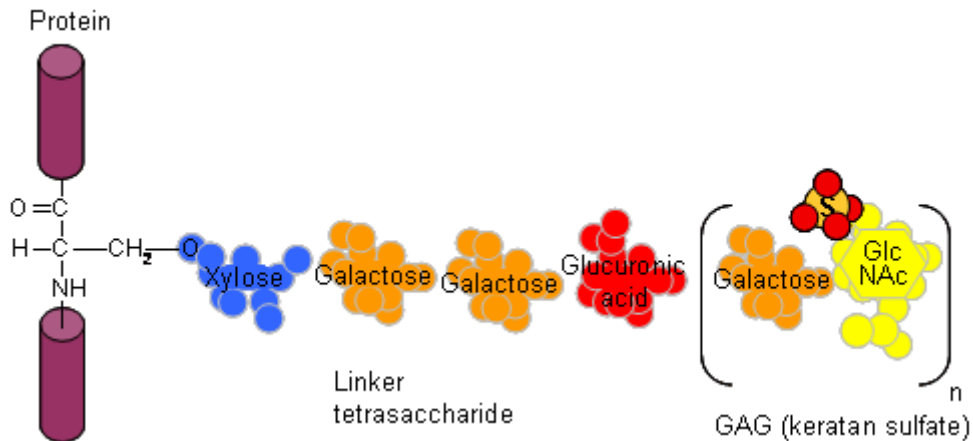


Figure 29 : Structure d'un protéoglycane

[www.steve.gb.com](http://www.steve.gb.com)

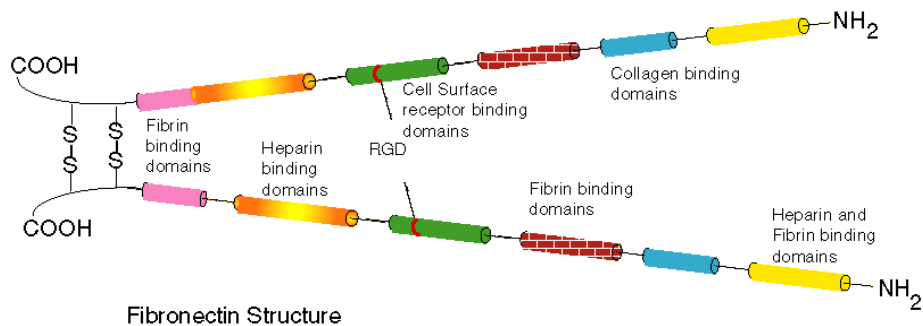
Les GAGs sont des polysaccharides sulfatés, composés d'un motif disaccharide répété de 40 à 100 fois en moyenne. On distingue quatre types de GAGs : le chondroïtine-sulfate, le dermatane-sulfate, l'héparane-sulfate/ héparine et le kératane sulfate.

Les principaux PGs de la MEC sont : la décorine présente dans tous les tissus conjonctifs, le perlécane et l'aggrécane, abondants dans le cartilage.

### 1.4.1.2. Les glycoprotéines

Les glycoprotéines sont des protéines participant à la formation du réseau moléculaire définissant la MEC, susceptibles d'être fortement glycosylées.

**La fibronectine** consiste en deux chaînes polypeptidiques similaires connectées l'une à l'autre par des ponts disulfure à leur extrémité C-terminale (Figure 30).



**Figure 30** : Structure de la fibronectine  
 bio.winona.msus.edu

Elle est très répandue dans le derme et absente dans l'épiderme et présente à la surface des fibroblastes. La fibronectine permet la migration cellulaire en s'associant à d'autres constituants structuraux de la MEC comme des fibres de collagène et des protéoglycanes particuliers, formant ainsi des zones fibrillaires éparées qui offrent des espaces où les cellules peuvent transiter.

**Les laminines** sont des molécules formées par l'assemblage de 3 chaînes polypeptidiques différentes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Il existe 15 isoformes différents de laminines, appelées laminines 1 à 15. Par leur interaction avec des intégrines et d'autres molécules de surface, les laminines contrôlent les activités cellulaires comme la migration, la différenciation, la polarité, la prolifération, l'apoptose ou l'expression de gènes.

**Les collagènes** sont les principales protéines constituant la MEC. Elles constituent une famille de molécules formées par des protéines classiques et des protéines portant des domaines de type collagénique. Ce sont des protéines fibreuses insolubles retrouvées dans la MEC et les tissus conjonctifs. Les fibres de collagène sont formées dans l'espace extracellulaire par assemblage de molécules de tropocollagène synthétisées et excrétées essentiellement par les fibroblastes, mais aussi par plusieurs types de cellules épithéliales.

#### 1.4.2. Les métalloprotéases matricielles

Les MMPs sont des endopeptidases dépendantes du zinc, capables de contrôler par clivage protéolytique l'activité des composants de la MEC et des molécules membranaires ou solubles impliquées dans la transmission des signaux intracellulaires comme par exemple les cytokines, les chimiokines, les protéines d'adhérence et différents récepteurs.

La famille des MMPs est composée de plus de 20 endopeptidases, classées en 6 groupes d'après leurs différences structurales : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines, les MMPs membranaires et les autres (Figure 31, Tableau4).

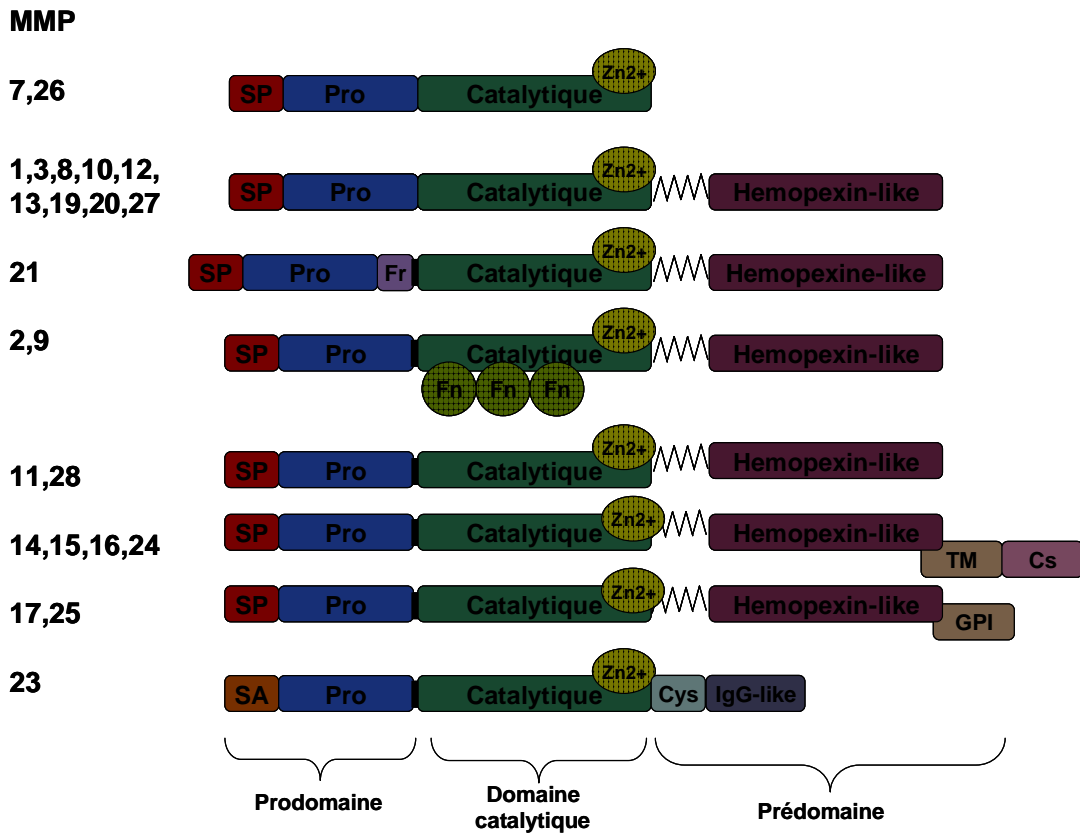


Figure 31 : Structure des MMPs (d'après Parks et coll., 2004)

Cs : cytosolic ; Cys : cysteine array ; Fn : Fibronectin repeat ; Fr : furin-cleavage site ; GPI: GPI anchor; Pro : pro-domain ; SA: N-terminal signal anchor ; SP: signal peptide; TM : transmembrane ; Zn : Zinc.

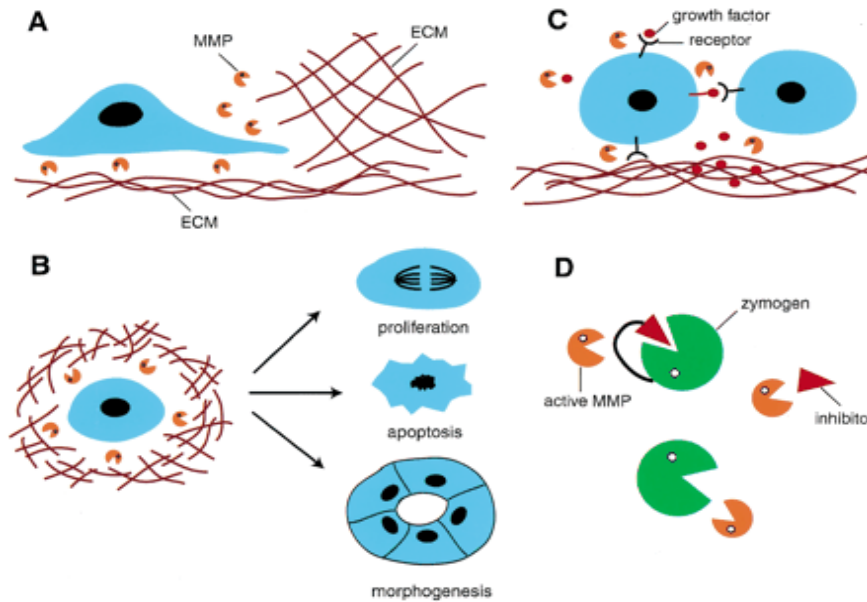
Les MMPs sont composées d'un prédomaine nécessaire à leur acheminement intracellulaire jusqu'à la surface cellulaire, d'un prodomaine et d'un domaine catalytique. L'activation des MMPs sécrétées sous forme latente est un point clé de la régulation. Un processus connu sous le nom « cysteine-switch » convertit la forme inactive (pro-MMP) en forme active. Le système d'activation du plasminogène (PLG) avec l'activateur du plasminogène type urokinase (u-PA) et l'activateur du plasminogène type tissulaire (t-PA) intervient dans cette activation physiologique. Certaines MMPs peuvent être inhibées dans le plasma par l' $\alpha$ 2-macroglobuline. Au sein des tissus, il existe 4 inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMP-1, -2, -3, -4), sécrétés par les kératinocytes, les fibroblastes, les ostéoblastes et les cellules endothéliales (Toriseva et Kähäri, 2009).

Désignation	Nom commun	Autre nom	substrat	Activités biologiques
<b><u>Collagénases</u></b>				
<b>MMP-1</b>	Collagénase A ColA ColB	Collagénase interstitielle Fibroblastes collagénase	Collagène de type I fibronectine  MCP-3  IGFBP-3,	Migration et ré-épithélialisation des KCs Agrégation plaquettaire Migration cellulaire Activité pro et anti-inflammatoire Augmentation de la biodisponibilité d'IGF-I et prolifération cellulaire
<b>MMP-8</b>	Collagénase-2	Neutrophile collagénase		
<b>MMP-13</b>	Collagénase-3		Collagène de type I BM-40 (SPARC/osteonectin) Perlecan MCP-3	Activation des ostéoclastes Augmentation de l'affinité au collagène Libération de FGF- $\beta$ Anti-inflammatoire
<b><u>Gélatinases</u></b>				
<b>MMP-2</b>	Gélatinase A	Gélatinase 72kDa Collagénase de type IV de 72kDa	Chondroïtin sulfate proteoglycan Fibronectine BM-40 (SPARC/osteonectin) IGFBP-3 Laminin 5_2 chain MCP-3 décorine	Développement des neurites Migration cellulaire Développement des cellules mésenchymateuses avec phénotype inflammatoire Augmentation de l'affinité au collagène Augmentation de la biodisponibilité d'IGF-I et de la prolifération cellulaire Migration des cellules épithéliales Anti-inflammatoire Augmentation de la biodisponibilité de TGF- $\beta$
<b>MMP-9</b>	Gélatinase B	Gélatinase de 92kDa Collagénase de type IV de 92kDa	Plasminogène BM-40 (SPARC/osteonectin) ICAM-1 Dégradation IL-1 $\beta$ IL-2R $\alpha$	Génération de fragments angiotensine-like Augmentation de l'affinité au collagène Pro-inflammatoire Résistance aux cellules tumorales Anti-inflammatoire Diminution de la réponse par IL-2
<b><u>Stromélysines</u></b>				
<b>MMP-3</b>	Stromélysine-1	Transine-1	Fibronectine Membrane basale Plasminogène BM-40 (SPARC/osteonectin) Perlecan IGFBP-3 MCP-3  Decorine E-cadhérine	Migration cellulaire Apoptose des cellules épithéliales de mammifère Génération des fragments de l'angiotensine-like Augmentation de l'affinité au collagène Libération de FGF- $\beta$ Augmentation de la biodisponibilité d'IGF-I et de la prolifération cellulaire Pro-inflammatoire Anti-inflammatoire Augmentation de la

				biodisponibilité de TGF- $\beta$ Augmentation de l'invasion cellulaire
MMP-10	Stromélysine-2	Transine-2		
MMP-11	Stromélysine-3		IGFBP-1	Augmentation de la biodisponibilité d'IGF-I et de la prolifération cellulaire
<b><u>matrylsines</u></b>				
MMP-7	Matrylsine	PUMP	Fibronectine Plasminogène  BM-40 (SPARC/osteonectin) Décorine E-cadhérine Fas ligand	Différenciation des adipocytes Génération des fragments de l'angiotensine-like Augmentation de l'affinité au collagène  Augmentation de la biodisponibilité de TGF- $\beta$ Augmentation de l'invasion cellulaire Apoptose médiée par le récepteur Fas
MMP-26	Endométase	Matrylsine-2	ND	
<b><u>MMP type membrane</u></b>				
MMP-14	MT-MMP1		CD44 Laminin 5_2 chain MCP-3 Cell surface tissue transglutaminase	Migration cellulaire Migration cellules épithéliales Antiinflammatoire Diminution de l'adhésion et la propagation cellulaire
MMP-15	MT-2 MMP		Cell surface tissue transglutaminase	Diminution de l'adhésion et la propagation cellulaire
MMP-16	MT-3 MMP		Cell surface tissue transglutaminase	Diminution de l'adhésion et la propagation cellulaire
<b><u>Autres</u></b>				
MMP-12	Métalloélastase		plasminogène	Génération de fragment angiotensine-like
MMP-19	MMP-18	RAS-1	Membrane basale	Prolifération, migration cellulaire, angiogenèse et adhésion

**Tableau 4** : Tableau récapitulatif des fonctions des différentes MMPs

Malgré une certaine spécificité des substrats, les spectres protéolytiques des différentes MMPs sont assez larges et se recouvrent, ce qui permet la dégradation de l'ensemble des composants de la MEC. Elles sont également capables de réguler des processus comme l'angiogenèse, la cicatrisation et la dégradation de la MEC (Figure 32) (Vu et coll., 2000).



**Figure 32 : Mécanisme d'action des MMPs**

Vu et coll., 2000

- (A) Les MMPs peuvent affecter la migration cellulaire en changeant le phénotype des cellules et par dégradation de la MEC.
- (B) Les MMPs peuvent affecter le micro-environnement de la MEC en déclenchant la prolifération cellulaire, l'apoptose ou la morphogénèse.
- (C) Les MMPs peuvent moduler l'activité de molécules bioactives tels que les facteurs de croissance ou les récepteurs de facteur de croissance par clivage ou libération de la MEC.
- (D) Les MMPs peuvent altérer la balance protéolytique en clivant les enzymes ou leurs inhibiteurs.

## 2. L'immunité innée de la peau

Notre organisme est confronté à un nombre très important de micro-organismes : bactéries, champignons, parasites et virus. Ceux-ci sont massivement présents aux portes d'entrées naturelles que sont la peau, les muqueuses aérienne, digestive et uro-génitale. La surface de la peau est le premier site de dépôt et d'introduction des micro-organismes et est constamment exposée aux blessures. Chez les individus sains, les couches les plus profondes de la peau restent vierges d'infections suggérant que la peau a la capacité de combattre les microbes environnants. L'immunité innée de la peau intervient à différents niveaux pour prévenir les agressions. Ceux-ci se caractérisent par le terme de barrières défensives qui peuvent être anatomique, physiologique, phagocytaire ou inflammatoire :



- **la barrière mécanique** : la peau est une barrière mécanique qui retarde l'entrée des microbes,

- **la barrière chimique** : plusieurs facteurs entrent en jeu dans cette barrière : la température, l'acidité du pH (3-5) qui freine la croissance des micro-organismes, et les médiateurs chimiques tels que les lysozymes et le complément, les peptides antimicrobiens, les acides gras et les enzymes qui agissent sur les membranes des micro-organismes,

- **la barrière microbiologique** : la flore microbienne est en compétition avec les pathogènes extérieurs,

- **la barrière phagocytaire ou endocytaire** se caractérise par le mécanisme de phagocytose qui consiste en l'ingestion d'un matériel particulaire pouvant inclure l'ensemble des micro-organismes pathogènes. La phagocytose est assurée par des cellules spécialisées comme les macrophages, les neutrophiles et les monocytes,

- **la barrière inflammatoire** se caractérise par la production de cytokines et permet l'arrivée de leucocytes et de protéines plasmatiques en quantité accrue.

Lorsque la barrière cutanée est compromise, la seconde couche de protection de l'hôte passe par le système de reconnaissance et de réponse contre les microbes inhérents à tous les organismes vivants. L'immunité innée a évolué depuis plus de 2 milliards d'années, et est la première ligne de défense pour les plantes, les invertébrés et les vertébrés (Nizet et Gallo, 2002 ; Gallo et Nizet, 2003 ; Ganz, 2003). Chez la plupart des organismes vivants, ce composant essentiel qu'est l'immunité innée est un ensemble de mécanismes cellulaires et anatomiques non spécifiques et préexistants pour combattre une infection. Le système immunitaire inné répond aux pathogènes de deux manières :

- il reconnaît le pathogène invasif et distingue les micro-organismes pathogènes et non pathogènes,
- il déclenche une réponse physiologique coordonnée pour détruire le pathogène.

## 2.1. Le complément

Le système du complément est un groupe de protéines circulantes ou membranaires dont 12 sont directement impliquées dans les différentes voies alors que les autres ont des fonctions régulatrices. Le complément est une cascade biochimique complexe du système immunitaire. Il est rapidement activé par la présence d'un pathogène mais aussi par des anticorps. Le complément stimule l'inflammation et l'opsonisation, facilite la phagocytose des antigènes et lyse directement certaines cellules. Il existe trois voies qui activent le système du complément : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (Carroll, 1998).

Les voies classique et alterne activent le complément aboutissant à la formation d'une C3 convertase, point de départ de la voie effectrice aux deux voies et qui détruit la cible par la formation d'un canal transmembranaire. Les protéines de C5 à C9 en s'assemblant forment le "complexe d'attaque membranaire" (membrane attack complex ou MAC) (Figure 33).

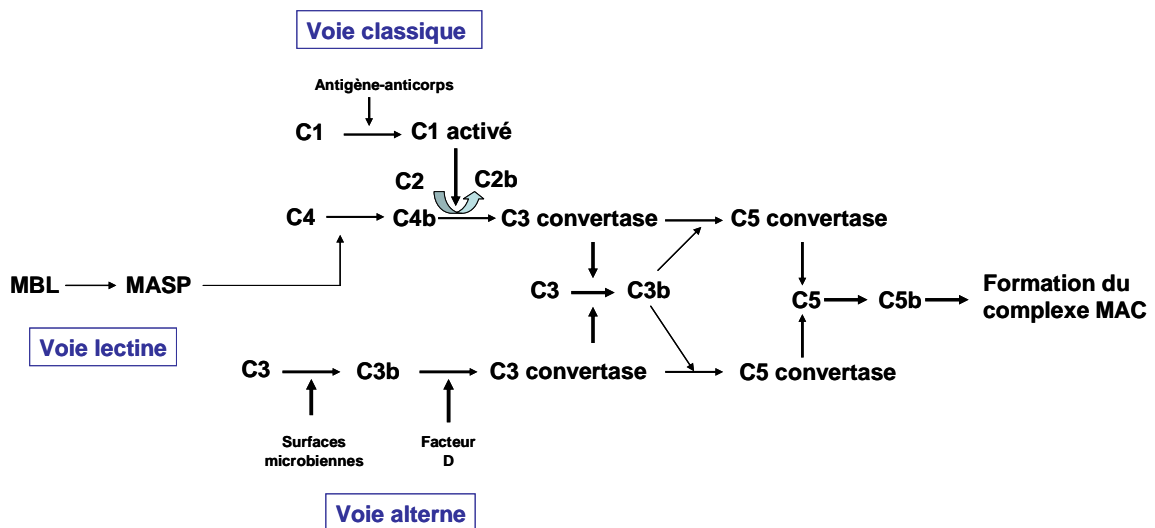


Figure 33 : Les voies du complément

Vue d'ensemble des voies d'activation du complément. La voie classique est initiée par la liaison du C1 aux complexes antigène-anticorps. La voie alterne est initiée par la liaison du C3b aux surfaces activatrices, telles que les parois cellulaires microbiennes. La voie lectine est initiée par la liaison de la protéine MBL à la surface d'un pathogène. La voie alterne utilise certains composants spécifiques, tandis que les voies classiques et lectines ont tous leurs composants en commun après le C1. Ces voies génèrent toutes trois les C3 et C5 convertases et le C5b lié, qui est converti en MAC par une séquence de réactions terminales communes.

**MAC** : membrane attack complex ; **MBL** : mannan binding lectin ; **MASP** : MBL-associated serine protease

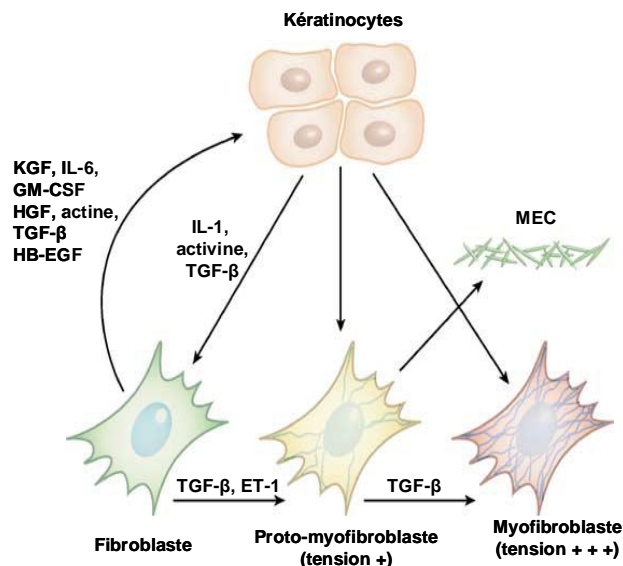
## 2.2. Les cellules du système immunitaire inné cutané

### 2.2.1. Les kératinocytes

Les kératinocytes, principaux constituants de l'épiderme, possèdent d'importants rôles dans les réponses cutanées inflammatoires et immunitaires. Les kératinocytes épidermiques contribuent aussi à la barrière protectrice des épithélia en tuant directement les micro-organismes invasifs. Ils expriment aussi l'enzyme iNOS (inducible nitric oxide synthase) et produisent de l'oxyde nitrique (NO) (Schwentker et coll., 2002). Le NO est un radical libre qui possède une activité anti-microbienne prononcée ; les virus, les mycobactéries, les bactéries et les champignons y sont sensibles.

Encore récemment, peu de choses étaient connues sur les récepteurs nécessaires à la reconnaissance des PAMPs (Pathogen associated molecular patterns) par les kératinocytes. Parmi les récepteurs identifiés, il y a le récepteur du mannose KcMR (keratinocyte mannose-binding receptor). Les kératinocytes expriment à leur surface les TLRs 1 à 6, 9 et 10 (Kawai et coll., 2002 ; Lebre et coll., 2007). Une fois stimulés, ils produisent et libèrent des médiateurs inflammatoires comme les cytokines, les chimiokines via la voie NF- $\kappa$ B et des peptides antimicrobiens (PAMPs) (Zanetti, 2004). Ces substances libérées sont notamment le TNF- $\alpha$ , l'IL-8, l'IFN- $\alpha$  (Fujisawa et coll., 1997), le CXCL16 (Tohyama et coll., 2007), le GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor) et MIP-1 $\alpha$ . La production des PAMPs par les kératinocytes (cathélicidine humaine, antileukoprotéase et défensines  $\beta$ ) a un rôle dans l'élimination des pathogènes dans l'épiderme et dans la prévention d'une invasion systémique par les microbes. Les kératinocytes humains peuvent cibler des virus comme celui de l'Herpès (HSV), le papillomavirus humain et le virus de la varicelle. Cependant les mécanismes de régulation restent encore incertains (Stanley, 2005 ; Black et coll., 2009 ; Megyeri et coll., 2009).

Les kératinocytes interviennent aussi dans la cicatrisation ou ré-épithélialisation et dans la défense contre les UV. Après une blessure, les kératinocytes proches de la blessure commencent à migrer non seulement autour mais aussi au niveau du creux formé par la blessure. Il y a souvent de nombreux petits îlots de cellules épithéliales qui contribuent au processus de ré-épithélialisation (Usui et coll., 2005 ; Patel et coll., 2006). Durant ce processus, des interactions kératinocytes – fibroblastes ont lieu pour permettre notamment l'expression de certains facteurs de croissance nécessaires soit aux kératinocytes soit aux fibroblastes (Werner et coll., 2007). Ces interactions entraînent la différenciation et la prolifération des kératinocytes mais aussi la formation d'une nouvelle membrane basale initiée par la différenciation des fibroblastes (Figure 34).



**Figure 34 : Interactions kératinocytes- fibroblastes**

Werner et coll., 2007

Aux premiers stades d'une blessure, des médiateurs pro-inflammatoires, tels que l'IL-1 dominent les interactions FBs-KCs. L'activité du TGF- $\beta$  est fortement augmentée dans des co-cultures KCs - FBs. Les molécules répondant à l'IL-1 tels que le KGF, IL-6, l'endothéline-1 (ET-1), héparine-binding EGF et le GMCSF, sont augmentés dans les FBs. Ces facteurs peuvent stimuler la prolifération et la différenciation des KCs. Les FBs commencent à augmenter la synthèse des constituants de la membrane basale et deviennent des proto-myofibroblastes. Dans les interactions KCs-FBs matures, les effets du TGF- $\beta$  régissent le phénotype des fibroblastes. La majorité des fibroblastes se différencieront en myofibroblastes.

### 2.2.2. Les fibroblastes

Les fibroblastes dermiques sont une composante essentielle de la peau, ils produisent et organisent la MEC du derme et communiquent avec d'autres types cellulaires, jouant un rôle crucial dans la régulation de la physiologie de la peau. Les fibroblastes dermiques représentent une population hétérogène de cellules définies en fonction de leur emplacement dans le derme. Deux sous-populations de fibroblastes dermiques résident dans des couche distinctes : le derme papillaire et le derme réticulaire. Un troisième groupe est associé aux follicules pileux (Jahoda et Reynolds, 1996).

Les fibroblastes ont un rôle bien établi dans la réparation de blessures et dans le processus de développement des tumeurs (Silzle et coll., 2003). Ils sont capables de produire de nombreux modulateurs immuns paracrins et autocrins, comme des facteurs de croissance, des cytokines comme l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- $\alpha$  qui ont des propriétés chimiotactiques et activatrices de leucocytes, des chimiokines (Smith et coll., 1997) et des médiateurs inflammatoires. Ces facteurs de croissance et les cytokines libérés peuvent favoriser la croissance, la différenciation et l'activation de cellules inflammatoires incluant les cellules T primaires et induire la maturation des cellules dendritiques (Saalbach et coll., 2007).

Les fibroblastes répondent à différents stimuli environnementaux. Ils peuvent être activés soit de manière directe par un pathogène (bactérie à Gram positif ou à Gram négatif (Perfetto et coll., 2003) soit par ses composants de surface. Ils induisent l'expression d'IL-6 et d'IL-8 ou de PAMs comme par exemple le BPI (bactericidal permeability increasing protein). C'est une protéine pluripotente ayant un pouvoir antimicrobien contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif en neutralisant les endotoxines (Schultz et Weiss, 2007). Les porines bactériennes ont un effet pro-inflammatoire sur les fibroblastes en raison de leur capacité à libérer des cytokines. Elles entraînent une augmentation de l'expression d'ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 est une glycoprotéine de surface exprimée sur de nombreuses lignées cellulaires qui sert de ligand d'adhésion pour les intégrines). L'interaction porine-fibroblastes induit la phosphorylation et la dégradation de I $\kappa$ -BK et active la voie de NF- $\kappa$ B et d'AP-1 (Perfetto et coll., 2003). Les fibroblastes peuvent aussi être activés de manière indirecte par des cytokines inflammatoires dérivées de cellules immunocompétentes en réponse à une infection. D'autres cytokines sont alors produites avec expression de molécules d'adhésion par les fibroblastes activés.

Les fibroblastes répondent aux facteurs solubles comme les endotoxines de bactéries, les cytokines et les facteurs de croissance. Ils interagissent par contact direct avec les lymphocytes T (White et coll., 1994), les cellules NK (Müller et coll., 2000).

Les interactions cellules - cellules ou cellules - matrice interviennent dans le contrôle de la balance entre synthèse et dégradation de la MEC. Des altérations dans cette balance peuvent entraîner des événements pathologiques comme l'invasion des tissus par des cellules malignes. Ces interactions se font grâce à la présence de molécules d'adhésion présentes à la surface des fibroblastes et des molécules costimulatrices comme CD40. Parmi les molécules d'adhésion, on retrouve ICAM-1 et Thy-1 qui interagissent avec les intégrines  $\beta$ 2 des cellules dendritiques. Les fibroblastes non stimulés ont un faible voire indétectable niveau d'expression d'ICAM-1. En présence d'IFN- $\beta$  et de TNF- $\alpha$ , l'expression d'ICAM-1 augmente (Horikoshi et coll., 1995).

### 2.2.3. Les autres cellules

#### 2.2.3.1 Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans (CLs) ont, dans un premier temps, été décrites comme des neurones intra-épidermiques, par Paul Langerhans. Ce n'est que beaucoup plus tard qu'il fut montré que les CLs sont en réalité des cellules dendritiques à un stade immature de leur vie (Romani et coll., 1989). Elles représentent 2% à 4% de la population des cellules épidermiques, et leur densité varie de 200 à 1 000 cellules/mm<sup>2</sup> selon leur localisation anatomique.

Les CLs, localisées dans les couches basales et suprabasales de l'épiderme, sont caractérisées par la présence d'extensions cytoplasmiques longues et fines, émergeant de corps cellulaires de petite taille, un noyau plurilobé et des organites intracytoplasmiques spécifiques : les granules de Birbeck. Les CL expriment une lectine de type II et la langerine, qui leur sont spécifiques (Valladeau et coll., 2000). Le phénotype des CLs est lié à leurs fonctions : en tant que leucocyte, elles expriment plusieurs marqueurs spécifiques. La cytokine TGF- $\beta$ , qui est fortement synthétisée dans les cellules épithéliales, est requise pour le développement des CLs (Geissmann et coll., 1998). Les CLs expriment également des molécules d'adhérence, telle que l'E-cadhérine, qui permet une adhérence avec les kératinocytes ainsi que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II (Valladeau et Saeland, 2005).

### 2.2.3.2 Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules retrouvées dans tous les tissus vascularisés mais sont plus abondants dans les zones de frontière avec l'environnement comme par exemple les muqueuses aériennes, l'intestin et la peau. Cette distribution particulière et leur capacité à répondre directement ou indirectement aux pathogènes leur permettent d'agir comme des sentinelles du système immunitaire. Dans cette fonction, ils peuvent initier et contrôler une réponse immunitaire innée efficace contre les pathogènes invasifs. De plus, ils peuvent agir comme des initiateurs d'une réponse immunitaire acquise contre les pathogènes en effectuant la migration, la maturation des cellules dendritiques et en interagissant avec les cellules B et T (Matsushima et coll., 2004 ; Maurer et coll., 2006). Ils peuvent aussi recruter les neutrophiles qui permettent la formation de granulomes cutanés qui sont cruciaux dans le maintien et l'élimination de nombreux pathogènes (Metz et coll., 2007).

Les mastocytes possèdent à leur surface de nombreux récepteurs pour les immunoglobulines, des TLRs et des récepteurs spécifiques à des cytokines et autres médiateurs inflammatoires (Gilfillan et Tkaczyk, 2006). Leur capacité à réagir à de nombreux stimuli (bactéries, virus, parasites, UV, etc.) et à libérer des puissants produits inflammatoires et immunomodulateurs en font des cellules idéales pour détecter et réagir à un grand nombre de signaux de danger (Metz et coll., 2007).

Les mastocytes de la peau contribuent à la fonction de barrière et peuvent agir en tant que sentinelle aidant à limiter ou même à empêcher les dommages résultant d'une agression extérieure. En réponse à une blessure physique, les mastocytes peuvent aider à diminuer le risque d'infection en accélérant le processus de cicatrisation (Weller et coll., 2006). Ils peuvent aussi libérer les médiateurs inflammatoires qui préviennent les dommages causés par le soleil (Metz et coll., 2006a) et sont réactifs vis-à-vis du venin de serpent et d'abeille (Metz et coll., 2006b). Enfin les mastocytes peuvent sécréter des PAMs dont la cathélicidine et ont donc une activité bactéricide directe (Di Nardo et coll., 2003).

### 2.2.3.3 Les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, et les cellules NK

L'ensemble des phagocytes constitue la première ligne de défense contre beaucoup de micro-organismes communs. Cependant, ils ne peuvent ni éliminer tous les agents infectieux ni reconnaître tous les micro-organismes. Les monocytes, les macrophages et les neutrophiles sont les phagocytes les plus efficaces.

**Les monocytes et les macrophages** sont des phagocytes qui participent à l'immunité innée et adaptative. Leur rôle est de phagocyter les débris cellulaires et les pathogènes. À l'instar des cellules dendritiques, ils sont capables de se comporter comme des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ils sont attirés vers le lieu d'une inflammation par chimiotactisme. Contrairement aux neutrophiles, qui sont les cellules phagocytaires présentes le plus rapidement au lieu de l'inflammation et qui ne vivent que quelques jours, la durée de vie d'un macrophage va de plusieurs mois à des années. Comme il s'agit de cellules complètement différenciées, qui ne se divisent pas.

**Les polynucléaires neutrophiles (PNN)** ont un rôle primordial de phagocytose lorsqu'ils rencontrent une cellule étrangère ou infectée. Les neutrophiles sont bien plus nombreux que d'autres cellules douées de phagocytose (les macrophages), mais survivent dans le sang bien moins longtemps. Dans la circulation, les neutrophiles ne vivent guère plus de 10 à 12 heures. Dans les tissus, cette durée de vie semble être plus longue (2 à 3 jours). Ce sont des cellules sécrétrices de PAMs : les HNPs (Grutkuski et coll., 2003 ; Yang et coll., 2009).

**Les cellules NK** (Natural Killer) constituent une population particulière de lymphocytes, ils participent activement à la réponse immunitaire. La lyse par les cellules NK joue un rôle à part dans l'immunité innée. Ces cellules exercent une cytotoxicité naturelle en agissant essentiellement contre les pathogènes intracellulaires. La lyse par les cellules NK met en jeu la libération de molécules cytotoxiques telles que la perforine et les granzymes contenues dans des granules et ce au contact des cellules cibles. La perforine va créer des pores dans la membrane des cellules infectées facilitant l'entrée des granzymes. Il faut noter que les cellules NK jouent un rôle important dans le développement de la réponse adaptative grâce essentiellement à leur capacité à produire des cytokines.

## 2.3. Les peptides antimicrobiens

Les PAMs ont d'abord été décrits comme des antibiotiques endogènes dont leur fonction était de seulement tuer les microbes. Aujourd'hui il est clair que les PAMs agissent pour former une barrière à la surface de la

peau. Ils entraînent le déclenchement et la coordination de multiples composants du système immunitaire inné et adaptatif. De nombreuses cellules résidentes de la peau produisent les PAMs comme les kératinocytes, les sébocytes, les mastocytes ainsi que les glandes eccrines. Les cellules circulantes recrutées par la peau comme les neutrophiles et les cellules NK sont aussi des agents qui contribuent à la libération des PAMs (Schauber et Gallo, 2008). Les cathélicidines et les défensines sont les PAMs les mieux caractérisés mais plus de 20 autres protéines ayant une activité antimicrobienne ont été identifiées au niveau de la peau (Pivarcsi et coll., 2005 ; Schroder et Harder, 2006).

### 2.3.1. Les défensines

Les défensines représentent une des deux principales familles de PAMs. Celles-ci correspondent à un groupe de molécules amphipathiques cationiques riches en feuillet  $\beta$ . Les défensines sont toutes composées de 6 résidus cystéine invariants formant des ponts disulfures qui donnent la structure tertiaire des défensines.

Les défensines ont été identifiées chez de nombreux organismes pluricellulaires tels que les plantes (Lai et coll., 2005), les invertébrés (Rodriguez de la Vega et Possani, 2005) et les vertébrés (Lehrer et Ganz, 2002 ; Ganz, 2003). Les défensines se différencient entre elles par l'agencement de leurs ponts disulfures, c'est-à-dire par le nombre de résidus présents entre les cystéines. Elles sont divisées en trois classes :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\theta$  (Figure 35).

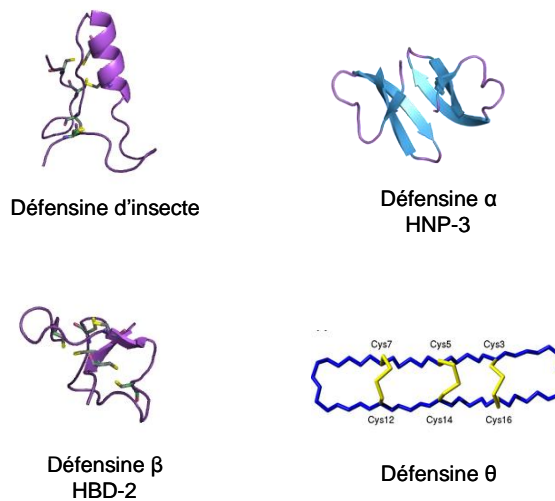


Figure 35 : Les défensines

**HNP-3** : Human neutrophil 3 ; **HBD-2** : Human beta defensin 2



### 2.3.1.1. Les défensines $\theta$

Les défensines  $\theta$  sont différentes des autres défensines au niveau structural car elles sont cycliques. Même si quelques peptides circulaires sont connus chez les plantes (Tam et coll., 1999), la défensine décrite par Selted (2004) chez le singe rhésus est le premier exemple de peptide circulaire chez l'animal. Le peptide appelé RDT-1 possède deux ARNm précurseurs différents, chacun codé par un gène muté des défensines  $\alpha$ . Les produits de ces gènes sont traduits et maturés par un épissage permettant de cycliser le peptide. Au moins 6 gènes pouvant coder cette défensine ont été retrouvés chez l'homme mais la présence précoce d'un codon stop dans la séquence empêche la production du peptide mature (Selsted et coll., 2004).

### 2.3.1.2. Les défensines $\alpha$

#### 2.3.1.2.1. Description

Chez l'homme, six défensines  $\alpha$  ont été décrites : HNP-1 à 4 (human neutrophil protein) et HD-5 et HD-6 (human defensin). Leurs gènes se situent sur le chromosome 8p23 et la protéine est synthétisée constitutivement par les précurseurs des neutrophiles de la moelle osseuse (Cowland et Borregaard, 1999). HNP-1 à 4 sont essentiellement produites dans les granulocytes (Lehrer et coll., 1993) et certains leucocytes (Agerberth et coll., 2000). HNP-1 et -3 sont les plus abondantes dans les granules azurophiles des neutrophiles et constituent 30 à 50% des protéines de ces granules. HD-5 et HD-6 sont, quant à elles, produites par les cellules de Paneth situées dans l'intestin grêle (Leher et Ganz., 2002). La concentration de ces peptides dans le plasma dans des conditions physiologiques est de 40 ng/ml mais peut atteindre 0,9 à 170  $\mu$ g/ml durant des infections sévères (Panyutich et coll., 1993).

Toutes les défensines  $\alpha$  subissent des modifications post-traductionnelles à partir des précurseurs (préprodéfensines) qui contiennent la séquence signal, la partie anionique d'environ 45 acides aminés et le domaine défensine carboxy-terminal. La protéolyse se fait en plusieurs étapes avec la formation de deux intermédiaires : une prodéfensine de 75 acides aminés résultant du clivage du peptide signal ; l'autre intermédiaire est une prodéfensine de 56 acides aminés qui résulte d'un clivage protéolytique au niveau d'un aspartate (Valore et coll., 1992). Le dernier clivage donne le peptide antimicrobien actif.

A l'origine, HNP-1 à 3 ont été identifiées comme des peptides antibiotiques naturels permettant de lutter contre divers bactéries, champignons, virus, mais d'autres fonctions ont été mises en évidence. Ces PAMs fonctionnent comme des signaux de danger à des concentrations inférieures à celles requises pour leur activité antimicrobienne et sont impliqués dans la cicatrisation d'une plaie en favorisant la prolifération des cellules (Yang et coll., 2004). D'autres propriétés biologiques ont été décrites comme la neutralisation des toxines sécrétées par les bactéries pathogènes : *Bacillus anthracis*, l'exotoxine de *P. aeruginosa* (Kim et coll., 2006) et la neutralisation de facteurs de virulence de *S. aureus* (Jin et coll., 2004).

#### 2.3.1.2.2. Les différentes activités des défensines $\alpha$

Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées sur les sites d'infection où ils agissent comme les phagocytes professionnels pouvant tuer rapidement les micro-organismes (Gudmundsson et Agerberth, 1999).

HNP1- à -3 exercent des activités antimicrobiennes distinctes dans des niches comme le phagosome des neutrophiles, où les bactéries sont exposées à de fortes concentrations de HNPs (1 mg/ml) (Ganz, 2003). Cependant leurs activités microbicides directes restent incertaines. Le plus souvent les activités des défensines ont été étudiées *in vitro* en l'absence de sérum et avec de faibles concentrations en ions (Yang et coll., 2002 ; Ganz, 2003).

Il a été proposé que HNP-1, -2 et -3 induisent leurs activités antimicrobiennes par la perméabilisation des membranes de manière similaire à d'autres protéines lytiques (Leher et coll., 1989). Ces peptides se lient à des récepteurs distincts comme par exemple à l' $\alpha$ -2 macroglobuline (Nassar et coll., 2002). Ils peuvent initier une réponse inflammatoire locale ainsi qu'une réponse immunitaire adaptative systémique en servant de chimio-attractant et d'activateur de cellules immunes telles les cellules T et les cellules dendritiques par une voie de signalisation mettant en jeu les récepteurs couplés aux protéines Gi (Yang et coll., 2000). Enfin HNP-1 à 3 entraînent la sécrétion d'anticorps et de cytokines distinctes par les cellules immunitaires (Tani et coll., 2000).

### 2.3.1.3. Les défensines $\beta$

La première défensine  $\beta$  fut isolée dans la langue de vache. Elle fut nommée peptide antimicrobien de la famille des défensines de part ses similarités structurales avec les défensines  $\alpha$  retrouvées dans les neutrophiles. La principale différence avec les défensines  $\alpha$  et défensines  $\beta$  est l'arrangement des ponts S-S.

#### 2.3.1.3.1. Distribution génique et organisation

La première défensine  $\beta$  humaine, hBD-1, a été identifiée en 1995 et isolée à partir de plasma de patients ayant une insuffisance rénale (Yang et coll., 1999). Depuis, d'autres défensines  $\beta$  humaines ont été caractérisées que ce soit au niveau génomique ou protéique. hBD-2 et hBD-3 ont été isolées dans la peau de patients atteints de psoriasis (Harder et coll., 2001). Pour hBD-4 des études ont montré une modification de l'expression du gène notamment par l'IL-1 $\beta$  mais ceci n'a pas été encore démontré au niveau protéique (Harder et coll., 2004).

Les analyses génomiques ont révélé 40 gènes pouvant potentiellement être traduits en défensines  $\beta$  (DEFBs) (Rodriguez-Jimenez et coll., 2003), mais ce nombre pourrait être plus élevé du fait de la présence de clusters de gènes des défensines  $\beta$ , situés dans les régions chromosomiques 8p21 et p23 mais aussi au sein des chromosomes 6p12, 20q11.1 et 20p13 (Bevins et coll., 1996).

La structure génomique des défensines  $\beta$  est construite de la manière suivante : deux exons et un intron sauf exception pour une défensine *DEFB105* qui contient trois exons et deux introns. Pour l'ensemble des gènes, le premier exon code le peptide signal, le second exon code le propeptide (Garcia et coll., 2001). Les modifications post-traductionnelles impliquent un clivage protéolytique de la séquence signal et un autre clivage : celui de la pro-pièce en N-terminal (Valore et coll., 1997).

#### 2.3.1.3.2 Sites d'expression et régulation des gènes

A ce jour, seules les quatre premières défensines  $\beta$  humaines ont été caractérisées en détail. **hBD-1** est principalement exprimée dans le revêtement épithélial de l'appareil urinaire et les voies respiratoires (Mc Cray et coll., 1997 ; Goldman et coll., 1997 ; Valore et coll., 1998) mais aussi dans l'épithélium et les

leucocytes (Harder et coll., 2001). L'expression d'hBD-1 peut être modulée par une inflammation (Feng et coll., 2005 ; Sorensen et coll., 2005). Cependant elle peut être induite par le LPS, *Pseudomonas aeruginosa* ou l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Fang et coll., 2003).

**hBD-2** est observée dans la peau, les voies respiratoires et gastro-intestinales, mais elle est principalement retrouvée dans l'ensemble des épithélia (Singh et coll., 1998). **hBD-3**, en plus des épithélia est retrouvée dans certaines cellules du cœur, du foie, et dans le placenta (Dunsche et coll., 2002). Enfin la source naturelle d'**hBD-4** n'a pas encore été déterminée (Selsted et coll., 2005). Les ARNm de cette défensine sont retrouvés dans les testicules, l'épididyme et son expression serait induite dans les kératinocytes (Harder et coll., 2004) mais la protéine n'a pour le moment été détectée que dans le poumon (Yanagi et coll., 2005).

**La  $\beta$ -défensine 2 humaine (hBD-2)** représente l'un des principaux PAMs contenus dans les extraits squameux provenant de lésions psoriasiques (Harder et coll., 1997 ; Harder et Schroder, 2005). Inactive sur *S. aureus* (Nomura et coll., 2003), hBD-2 possède une activité antimicrobienne essentiellement dirigée contre diverses bactéries à Gram négatif. Cette activité est toutefois inhibée par une concentration de 150 mM de NaCl (Harder et coll., 2000). Elle est probablement absente dans le sérum ou sur les surfaces cutanées recouvertes de sueur évaporée. hBD-2 est notamment exprimée par certaines cellules différenciées de la peau (Ali et coll., 2001), ce qui suggère qu'elle est induite localement, et qu'un état de différenciation et d'inflammation suffisant est nécessaire à cette induction (Harder et coll., 2004). Dans les cellules épithéliales, les interleukines IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , de même qu'une souche vivante de *P. aeruginosa*, sont les inducteurs les plus puissants, compatibles avec ce qui pourrait être observé *in vivo* (Liu et coll., 2003 ; Harder et coll., 2004). hBD-2 est exprimée dans les kératinocytes, les muqueuses gingivales et l'épithélium trachéal (Harder et coll., 1997 ; Bals et coll., 1998 ; Mathews et coll., 1999 ). hBD2 peut être induite par le TNF et le LPS de bactéries et par le contact de bactéries entières à Gram négatif (*E. coli*) et à Gram positif (*S. aureus*) et la levure *C. albicans* (Harder et coll., 1997 ; Huttner et Bevins, 1999 ; Mathews et coll., 1999 ; Chadebech et coll., 2003). De plus hBD-2 est induite par la protéine kinase C et son expression est augmentée au cours de désordres inflammatoires (Schonwetter et coll., 1995 ; Hiratsuka et coll., 1998 ; Singh et coll., 1998). D'autres inducteurs d'hBD-2 ont été identifiés comme par exemple le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), l'isoleucine et la vitamine D3 (Harder et coll., 2000 ; O'Neil et coll., 1999 ; Fang et coll., 2003 ; Tsutsumii et Nagaoka, 2003 ; Wang et coll., 2004 ; Selsted et Ouellette, 2005).

L'activation de la phospholipase D est importante pour l'induction d'hBD-2 dans les cellules épithéliales orales en réponse à une bactérie des muqueuses ou pharyngées *F. nucleatum* (Krisanaprakornkit et coll., 2000). La phospholipase D joue un rôle important dans la différenciation des kératinocytes (Bollinger-Bollag et Bollag, 2001).

Les mécanismes utilisés par les bactéries pour induire la production d'hBD-2 reste toutefois non élucidés. Bien que le CD14 et les récepteurs TLRs (Birchler et coll., 2001) aient été proposés comme acteurs importants dans le système de reconnaissance, il existe aujourd'hui une controverse quant à l'implication directe des TLRs dans l'induction d'hBD-2 *in vivo* (Froy, 2005). En cas d'inflammation, il est cependant possible que l'induction d'hBD-2 intervienne principalement via la signalisation par l'IL-1 dérivée des phagocytes mononucléaires (Sorensen et coll., 2003). Les bactéries peuvent également stimuler directement la production épithéliale d'hBD-2, comme cela a été montré, pour diverses bactéries, dans des cellules épithéliales de la bouche (Krisanaprakornkit et coll., 2000 ; Chung et coll., 2004). Dans une étude sur des cellules épithéliales issues du tractus respiratoire, seul un isolat clinique de *P. aeruginosa* était capable d'induire la production d'hBD-2 (Harder et coll., 2000). Ces résultats suggèrent que, hormis les ligands activateurs de TLR, d'autres molécules encore inconnues peuvent induire la production d'hBD-2, probablement même en absence d'inflammation.

**La  $\beta$ -défensine 3 humaine (hBD-3)**, un peptide de 5 kDa hautement basique (pI 10,08) a été initialement découvert dans des extraits squameux de lésions psoriasiques (Harder et coll., 2001). Elle présente une activité antimicrobienne à large spectre, puissante mais sensible au NaCl. Son activité antimicrobienne est dirigée contre des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif et des champignons. Le mécanisme par lequel hBD-3 est bactéricide sur *S. aureus* est là encore inconnu. L'analyse structurale de *S. aureus* soumis à l'action d'hBD-3 révèle des modifications morphologiques similaires à celles observées lorsque la bactérie est mise en présence de pénicilline (Harder et coll., 2001). hBD-3 est exprimée dans les épithéliums de divers organes, ainsi que dans certains tissus non épithéliaux (Harder et coll., 2001). Bien que ce peptide soit une défensine  $\beta$  inductible, son expression est régulée différemment par rapport à hBD-2. Dans les kératinocytes, hBD-3 est modérément induite par le TNF- $\alpha$ , et plus fortement par l'IFN- $\gamma$  (Garcia et coll., 2001). L'IGF-I (insulin-like growth factor) et le TGF- $\beta$  (transforming growth factor) induisent également la synthèse d'hBD-3 par un mécanisme de transactivation (relargage du TGF- $\alpha$  par un processus dépendant d'une métalloprotéase) du récepteur de l'EGF (epidermal growth factor) (Sorensen et coll., 2005). L'expression d'hBD-3 est aussi induite dans les cellules épithéliales gastriques infectées par *H. pylori* (Boughan et coll., 2006) aussi bien que dans les kératinocytes infectés avec *S. aureus* (Menzies et coll., 2006).

La différenciation des kératinocytes induite par ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) (Sayama et coll., 2001 ; 2005) entraîne la production d'hBD-2 et -3. ASK1 est une kinase appartenant à la super-famille des MAP kinases. La production des PAMs est dépendante d'un mécanisme induit par ASK1 mais qui diffère de celui induit par les bactéries. Les kératinocytes ont donc plusieurs mécanismes pour induire les PAMs : (1) La cascade ASK1 -p38 et (2) la voie des TLRs durant la différenciation épidermique.

### 2.3.1.3.3 Les voies d'activation des défensines $\beta$

La région promoteur du gène *hBD-2* contient les sites de fixation pour NF- $\kappa$ B mais aussi pour AP-1 (Activator-protein-1) (Wehkamp et coll., 2004). La mutation des trois sites de fixation de NF- $\kappa$ B bloque presque complètement l'activation du promoteur d'hBD-2 de même après traitement par l'IL-1 $\beta$ , indiquant que NF- $\kappa$ B joue un rôle crucial dans la régulation de l'induction d'hBD-2. Ces observations ont été aussi confirmées par l'action d'un inhibiteur spécifique de NF- $\kappa$ B, l'helanaline qui abolit l'induction d'hBD-2 dans les KCs (O'Neil et coll., 1999 ; Ogushi et coll., 2001 ; Wada et coll., 2001 ; Wehkamp et coll., 2004). La liaison des sous-unités de NF- $\kappa$ B p50 et p65 aux trois sites de fixation de NF- $\kappa$ B sont nécessaires dans l'induction d'hBD-2. L'ensemble des études montre que le premier site proximal de fixation de NF- $\kappa$ B représente une région cruciale par le promoteur d'hBD-2. D'autres facteurs de transcription que NF- $\kappa$ B ont été mis en évidence. Ainsi, Krisanaprakornit et coll. ont démontré que l'induction d'hBD-2 par *F. nucleatum* est régulée via la voie p38 et JNK à travers le facteur de transcription AP-1 (Krisanaprakornit et coll., 2002). L'induction d'hBD-2 dans les KCs se fait via AP-1. AP-1 peut être activé par diverses voies des MAP kinases incluant ERK, JNK, MAP p38 (Whitmarsh et Davis, 1996 ; Jang et coll., 2004).

Des stimuli endogènes et exogènes peuvent activer les mêmes voies de transduction du signal. Il a été montré que les TLRs répondent différemment aux produits microbiens. Les voies de signalisation activées sont similaires à celles induites par l'IL1-1R (O'Neill, 2002). De plus, il a été montré que les KCs expriment plusieurs TLRs et que l'induction d'hBD-2 est dépendant de TLR2 et TLR4 pour *Propionibacterium acnes* (Nagy et coll., 2005). D'autres facteurs de transcription peuvent participer dans l'induction d'hBD-2 par l'IL-1 comme par exemple les MAPK, mais celle induite par NF- $\kappa$ B et AP-1 est essentielle.

Le signal via l'IL-1R induit la synthèse d'hBD-2 par les KCs (Liu et coll., 2003), les cultures épidermiques (Sorensen et coll., 2005), pulmonaires (Kao et coll., 2006), utérines (Pioli et coll., 2006), gingivales (Ouhara et coll., 2006) et intestinales (Zilbauer et coll., 2005). L'expression d'hBD-2 dans les cellules épithéliales est associée à une réponse pro-inflammatoire ; cela est en accord avec la découverte, dans la dermatite atopique, de la production de cytokines anti-inflammatoires IL-10 et IL-13 associée à une diminution d'expression d'hBD-2 (Howell et coll., 2005).

En ce qui concerne hBD-3, la voie NF- $\kappa$ B ne semble pas jouer un rôle prédominant dans son expression, mais l'induction semble se faire principalement via MAPK/P38 (Menzies et coll., 2006) et la voie EGFR/ERK (Boughan et coll., 2006). Dans les PBMCs (peripheral blood mononuclear cells), hBD-2 mais non hBD-3 est un fort inducteur de cytokines (Boniotto et coll., 2006), tandis que dans les KCs, hBD-2 et hBD-3 sont inducteurs de cytokines. hBD-2 et -3 augmentent la phosphorylation d'EGFR, STAT1 et STAT3 et la prolifération et migration des KCs (Niyonsaba et coll., 2007).

#### 2.3.1.3.4 Structure des défensines $\beta$

Les défensines  $\beta$  possèdent un agencement tridimensionnel qui est dépendant des 6 cystéines présentes dans leur structure primaire. Ces cystéines sont très conservées dans la plupart des séquences des défensines. Elles sont caractérisées aussi par une structure en feuillets  $\beta$  (Figure 36). Ces peptides sont fortement chargés positivement par la haute teneur en résidus cationiques comme la lysine et l'arginine, charge essentielle pour l'activité antimicrobienne des défensines (Izadpanah et Gallo, 2005 ; Sahl et coll., 2005).

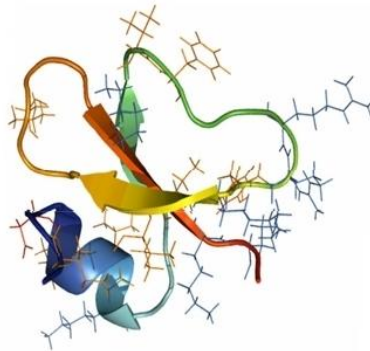


Figure 36 : Structure tridimensionnelle des défensines  $\beta$   
Suresh et Verma, 2006

À ce jour, seules les structures des trois premières défensines  $\beta$  humaines ont été décrites (Hoover et coll., 2001 ; Schibli et coll., 2002). Celles-ci possèdent une structure tertiaire similaire entre elles. Le noyau structurel de ces défensines est composé de trois brins  $\beta$  antiparallèles qui sont construits en fonction des ponts disulfures intramoléculaires. Dans les défensines  $\beta$ , le brin  $\beta$  est suivi par une hélice  $\alpha$  de longueur variable, formée par le fragment N-terminal de la molécule (Hoover et coll., 2001). L'orientation de l'hélice  $\alpha$  par rapport au feuillet  $\beta$  est stabilisée par le pont disulfure (Cys1-Cys5). Un deuxième motif commun à toutes les défensines est un motif Gly-X-Cys qui forme un bourrelet  $\beta$  (Yount et coll., 2004). Son rôle principal est d'accentuer la torsion du feuillet  $\beta$ . Sa présence est nécessaire au repliement et à la structure native des défensines des mammifères (Xie et coll., 2005).

Les défensines  $\beta$  humaines possèdent la capacité à former diverses structures oligomériques (Hoover et coll., 2001), qui pourraient jouer un rôle significatif ou influencer les activités biologiques et les fonctions de ces peptides. Les premières études d'oligomérisation d'hBD-2 ont permis de mettre en évidence deux formes distinctes cristallines, décrivant un assemblage octomérique mis en place par quatre dimères non covalents d'hBD-2, stabilisés par des interactions entre les premiers brins  $\beta$  de chaque monomère.

### 2.3.1.3.5 Le mécanisme d'action des défensines $\beta$

De nombreuses études ont été réalisées pour comprendre le mécanisme d'action des défensines. Les défensines  $\beta$  se lient à la membrane cytoplasmique chargée négativement perturbant leur intégrité et conduisant à la fuite des composants intracellulaires et à l'inhibition de la synthèse d'ADN, d'ARN et des protéines (Ganz et coll., 1998 ; Brogden, 2005) (Figure 37).

Les détails moléculaires montrant les interactions entre les défensines  $\beta$  et les membranes ne sont pas encore totalement éclaircis. Certains modèles de membrane ont montré que ces peptides pourraient former des pores s'étendant à travers la membrane bactérienne (Oren et Shai, 1998 ; Kagan et coll., 2000 ; Tossi et coll., 2000). Un deuxième modèle est proposé formant une sorte de tapis de défensines  $\beta$  à la surface de la membrane microbienne (Hristova et coll., 1996). Dans ce modèle, le peptide agirait comme un détergent en se fixant à la surface des membranes par interaction avec les phospholipides.

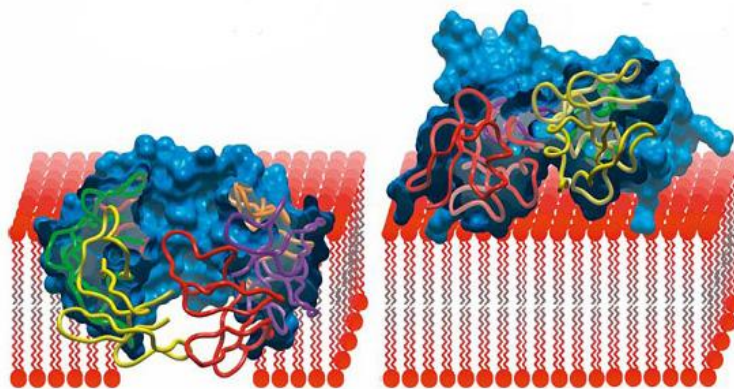


Figure 37 : Mode d'action des défensines  $\beta$  sur les membranes

Pazgier et coll., 2006 avec l'autorisation de Cellular and molecular life science



### 2.3.1.3.6 Les activités biologiques

L'activité principale des défensines  $\beta$  est l'activité antimicrobienne. En plus de leurs propriétés antimicrobiennes reconnues, des études récentes mettent en avant d'autres propriétés ; comme leur capacité immunomodulatrice que ce soit sur l'immunité innée ou adaptative (Medzhitov et coll., 1999 ; Yang et coll., 1999 ; Ganz et coll., 2003 ; Yang et coll., 2004 ; Oppenheim et Yang, 2005 ; Selsted et coll., 2005).

#### 2.3.1.3.6.1. Les activités chimiotactiques

**hBD-2** agit comme un chimio-attractant direct et spécifique pour les mastocytes. Elle peut aussi stimuler les mastocytes pour libérer de l'histamine, mobiliser le calcium intracellulaire ou générer de la prostaglandine via des récepteurs spécifiques. hBD-2 attire les cellules T mémoire et les cellules dendritiques immatures. Cependant, les cellules dendritiques générées à partir de monocytes et de précurseurs de la moelle osseuse sont marginalement mobilisées par les défensines en tests *in vitro* et aucune migration n'est observée dans un test de chimiotactisme. Les auteurs concluent que les cellules dendritiques ne représentent pas les premières cellules touchées par l'activité des défensines  $\beta$ . L'IL-4 possède une action suppressive dans le chimiotactisme par les défensines  $\beta$  (Soruri et coll., 2003).

L'activité chimio-attractrice peut être due à la liaison au récepteur CCR6 (Yang et coll., 1999 ; Biragyn et coll., 2001). CCR6 appartient à une large famille de récepteurs couplés à la protéine G. Bien que l'importance physiologique de cette interaction n'ait pas encore été montrée, la haute concentration d'hBD-2 dans l'inflammation cutanée explique qu'hBD-2 puisse interagir avec CCL20. CCL20 est le seul ligand connu pour le récepteur CCR6. Deux lignées cellulaires indépendantes exprimant de manière stable CCR6 ne répondent ni à hBD-3 ni à hBD-2 en dépit d'une forte réponse à CCL20. Par contraste, des études utilisant des cellules HEK exprimant CCR6 montrent un lien entre les défensines  $\beta$ , les cellules T et les cellules dendritiques. Soruri et coll. (2007) n'ont pas trouvé d'impact entre les défensines et CCR6 sur différents types cellulaires. La chimio-attraction des macrophages et des mastocytes par les défensines  $\beta$  se ferait par un récepteur commun mais qui ne serait pas CCR6.

**hBD-3** attire les monocytes (Niyonsaba et coll., 2002) tandis qu'hBD-2 ne possède pas cette capacité. L'ensemble des défensines  $\beta$  attire les macrophages (Soruri et coll., 2007). Le chimiotactisme se fait via la voie de signalisation des MAPK mettant en jeu les trois kinases ERK, JNK et p38. Chacune d'elles a un rôle dans la migration des cellules par des mécanismes distincts (Huang et coll., 2004).

Le concept des défensines  $\beta$  contribuant à l'immunité innée et adaptative grâce à la production de cytokines pro-inflammatoires a été décrit dans les KCs (Niyonsaba et coll., 2003). Pernet et coll. (2003) ont montré une coopération entre hBD-2 et MIP-3 $\alpha$  (ligand du récepteur CCR6). Ces deux molécules sont produites par les kératinocytes lorsqu'ils sont stimulés par du calcium. hBD-2 et MIP-3 $\alpha$  utilisent le même récepteur CCR6 et recrutent des cellules dendritiques et des cellules T. Leur action commune pourrait contribuer à l'immuno-surveillance de la barrière cutanée. D'autres récepteurs semblent être mis à contribution dans le chimiotactisme sachant qu'hBD2 et hBD-3 ont la capacité d'attirer des monocytes et macrophages déficients en CCR6 (Soruri et coll., 2007). Niyonsaba et coll. ont démontré en 2005 une induction individuelle ou synergique d'IL-18 avec d'autres cytokines (IL-20 et IL-8) par les défensines  $\beta$ .

Les détails moléculaires décrivant l'activité chimiotactique des défensines  $\beta$  ne sont pas encore connus, cependant il semblerait que la topologie des ponts disulfures soit importante dans l'activité des défensines (Wu et coll., 2003). Un motif particulier, retrouvé sur les défensines ainsi que sur MIP-3 $\alpha$  (Skelton et coll., 1995), situé en N terminal et composé de deux cystéines et des résidus proches, serait aussi important pour l'activité chimiotactique (Jarnagin et coll., 1999).

#### 2.3.1.6.2. Les autres activités des défensines $\beta$

Plusieurs études indiquent d'autres fonctions physiologiques des défensines comme par exemple dans le remodelage tissulaire articulaire (Varoga et coll., 2005). hBD-2 à hBD-3 sont aussi surexprimées durant la maturation et la différenciation des kératinocytes (Abiko et coll., 2003). Elles jouent un rôle dans l'activation des mastocytes entraînant une perméabilité vasculaire de la peau (Chen et coll., 2007). Les défensines pourraient aussi contribuer au contrôle de la réplication du VIH-1 chez l'homme en inhibant la réplication *in vitro* du virus (Sun et coll., 2005 ; Klotman et coll., 2006).

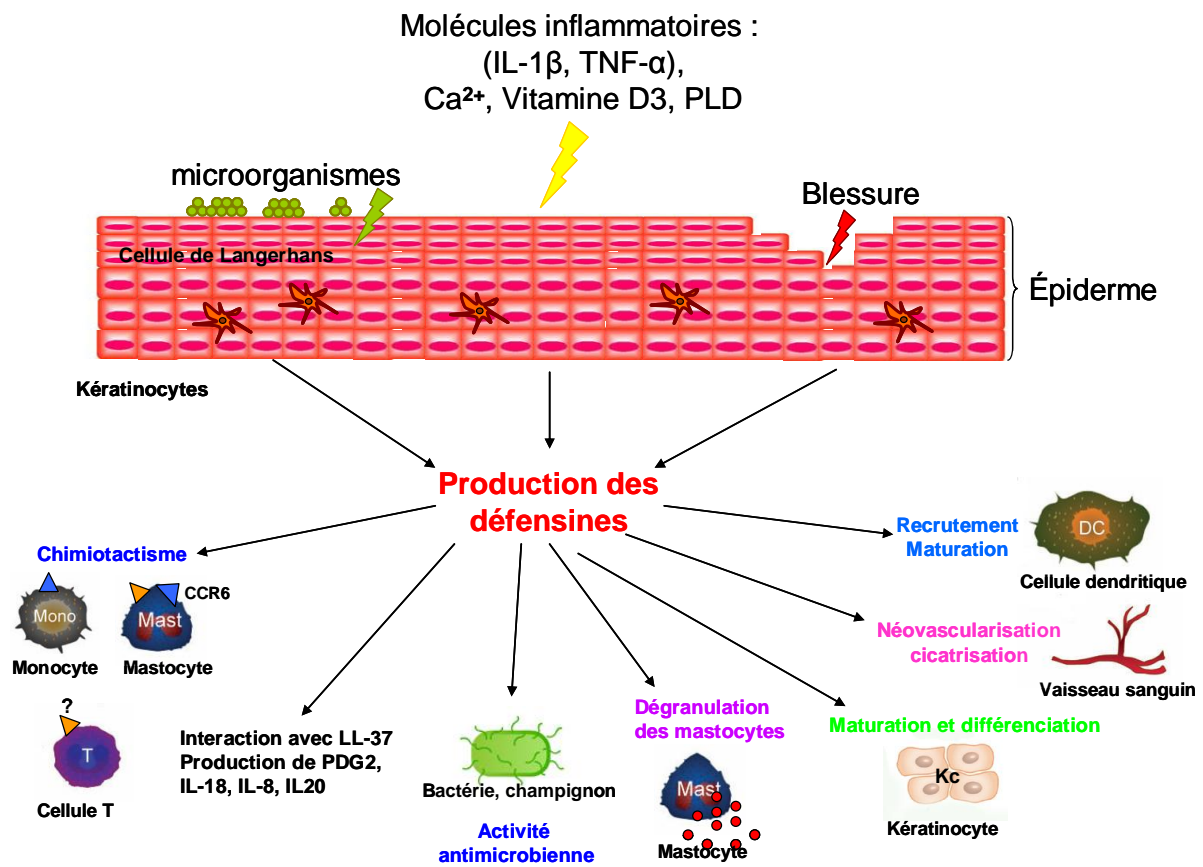


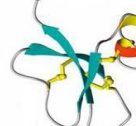


Figure 38 : Les actions des défenses  
PLD : phospholipase D ; PDG2 : prostaglandine 2

Tableau 5 :

Principales caractéristiques des défensines  $\beta$

Nom	Gène	Localisation génomique	Régulation	Caractéristiques	Séquence	Structure	Représentation 3D	Localisation tissulaire	Fonctions	Références
<b>HBD-1</b>	<i>DEFB1</i>	8p23.2-p23.1	Constitutif Augmentation expression lors d'inflammation, LPS, PGN Sensible aux sels	3,9 kDa (36aa) +4	DHYNCSVSSGGQCLYSA CPFTFKIQGTCYRGKAKCK	Feuillet $\beta$ avec trois ponts disulfure intramoléculaires. 1-5;2-4;3-6		Cellules épithéliales : Couches supra basales des kératinocytes, glandes sébacées, glandes sudoripares Cellules du tractus respiratoire et urogénital Plasma	Activité antimicrobienne <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> Activité chimiotactante Pour les cellules ayant un récepteur CCR6	Abiko <i>et al.</i> , 2003; Lehrer <i>et al.</i> , 1989; Nyonsaba <i>et al.</i> , 2005, 2007; Yang <i>et al.</i> , 1999
<b>HBD-2</b>	<i>DEFB4</i>	8p23.1-p22	Inducible LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , bactéries, différenciation des Kcs (augmentation de Ca <sup>2+</sup> ) PMA, Vitamine D3, histamine, phospholipase D Sensibles aux sels	4,3 kDa (41aa) +6	GICDPVTCILKSGAICHPV FCPRRYKQIGTCGLPGTKCKK P	Feuillet $\beta$ avec trois ponts disulfure intramoléculaires. 1-5;2-4;3-6		Cellules épithéliales Peau : couches supérieures de l'épiderme (stratum corneum) et stocké dans des corps lamellaires tractus respiratoire et gastro-intestinal	Activité antimicrobienne <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>E. faecalis</i> , HIV-1, HSV leuves Activités chimiotractantes Mastocytes, neutrophiles, Cellules T cellules dendritiques Induit la dégranulation des mastocytes et la production de PGD <sub>2</sub> , induit l'expression de IL-8, IL-18 et IL-20.	Chen <i>et al.</i> , 2005; Chen <i>et al.</i> , 2007; Feng <i>et al.</i> , 2005 Kanda <i>et al.</i> , 2007; Koiman <i>et al.</i> , 2006; Koiman <i>et al.</i> , 2007; Krisanaprakornkit <i>et al.</i> , 2008; Lehrer <i>et al.</i> , 1989; Midoikawa <i>et al.</i> , 2003; Nyonsaba <i>et al.</i> , 2004; 2005, 2007; Permet <i>et al.</i> , 2003; Yang <i>et al.</i> , 1999
<b>HBD-3</b>	<i>DEFB103</i>	8p23	Inducible IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , P. aeruginosa, <i>S. aureus</i> , IFN- $\gamma$ PMA, Vitamine D3 Insensibles aux sels	5,1 kDa (48aa) +9	GINTLQKYCYRVRGRCAY LSCLPKEEQIGKSTRGKCCR KKK	Feuillet $\beta$ avec trois ponts disulfure intramoléculaires. 1-5;2-4;3-6		Cellules épithéliales Kératinocytes, Faible expression dans le tractus respiratoire, gastro-intestinal et uro-génital Cellules non épithéliales Amygdales, œsophage, trachée, placenta, cœur d'adulte, muscle squelettique et thymus fœtal.	Activité antimicrobienne <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>B. cepacia</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , HIV-1 Champignons Nyonsaba <i>et al.</i> , 2003; 2007; Permet <i>et al.</i> , 2003; Vanoga <i>et al.</i> , 2005; Yang <i>et al.</i> , 1999	Abiko <i>et al.</i> , 2003; Chen <i>et al.</i> , 2005; Dunesche <i>et al.</i> , 2002; Feng <i>et al.</i> , 2005; Koiman <i>et al.</i> , 2006; Lehrer <i>et al.</i> , 1989; Midoikawa <i>et al.</i> , 2003; Nyonsaba <i>et al.</i> , 2005, 2007; Permet <i>et al.</i> , 2003; Vanoga <i>et al.</i> , 2005; Yang <i>et al.</i> , 1999
<b>HBD-4</b>	<i>DEFB104</i>	8p23	Inducible dans kératinocytes Augmentation expression du gène par PMA et bactéries. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$	4,4 kDa (37aa) +7	ELDRICGYGTA RCBKRCR SQEYRGRCPNTYACCLRK			Cellules épithéliales Kératinocytes Testicules, neutrophiles, épithéla de glandes thyroïdiennes, poumon, utérus et rein.		Chen <i>et al.</i> , 2007; Nyonsaba <i>et al.</i> , 2005, 2007; Yanagi <i>et al.</i> , 2005

### 2.3.2. Les différentes cathélicidines

L'autre principale famille de PAMs ayant des propriétés dans la défense de la peau est la famille des cathélicidines. Ce sont des peptides retrouvés dans de nombreux types cellulaires et pouvant être activés par différents stimuli comme par exemple les stimuli inflammatoires, bactériens etc. Les cathélicidines sont synthétisées sous la forme d'une protéine mature et possèdent beaucoup de propriétés notamment des propriétés antimicrobiennes, chimio-attractantes, et angiogéniques.

La découverte des cathélicidines a débuté par l'isolement d'un dodecapeptide cyclique contenant un pont disulfure dans des lysats de neutrophiles bovins (Romeo, 1988). L'identification de ces dodecapeptides a été rapidement suivie par la mise évidence d'autres PAMs de neutrophiles appelés bactenecines : Bac 5 et Bac 7 (Gennaro, 1989). Chaque espèce possède un nom particulier : CRAMP (cathelin related antimicrobial peptide) pour la souris, BMAP (bovin myeloïd antimicrobial peptide) pour les bovins ou LL-37 chez l'homme, qui désigne le peptide fonctionnel de la cathélicidine (Tableau 6).

Cathélicidine	Expression	
	Constitutive	Inductible
LL-37	Neutrophiles immatures, mastocytes, cellules NK, B, T peau de nouveau né, épithelia du tractus digestif et reproducteur, glandes salivaires et eccrines	Kératinocytes (inflammation, blessure, infection), cellules épithéliales intestinales, membrane synoviale et muqueuse nasale (inflammation)
CRAMP	Neutrophiles immatures, rate, épithelia intestinaux et respiratoires, peau de nouveau-né, testicules	Kératinocytes (blessure, infection)
PR-39	Neutrophiles immatures, organes lymphoïdes	Cellules de la moelle osseuse (LPS, IL-6, acide rétinoïque)
Bac 5	Neutrophiles immatures, organes lymphoïdes	Neutrophiles périphériques (bactéries, LPS)
Dodecapeptide et BMAPs	Neutrophiles immatures, organes lymphoïdes, langue, glandes mammaires, tractus reproducteur	Non déterminé

Tableau 6 : Expression tissulaire ou cellulaire spécifique de quelques cathélicidines

D'après Zanetti, 2005

### 2.3.3. La cathélicidine humaine : LL-37

Chez l'homme et le singe, il n'existe qu'une seule cathélicidine (Durr et coll., 2005). La cathélicidine de l'homme a été identifiée en 1995 par trois groupes de recherche différents et isolée dans des neutrophiles (Cowland et coll., 1995). Le nom hCAP18 se réfère à la masse prédite du polypeptide entier (environ 18 kDa) et au caractère cationique de la séquence C-terminale (PAMs cationiques). La désignation alternative "FALL-39" a été utilisée initialement sur l'hypothèse que Phe-Ala-Leu-Leu (FALL) étaient les résidus N-terminaux du domaine antimicrobien (Gudmundsson et coll., 1995). Le nom a ensuite été changé pour LL-37 lorsque ce PAM a été isolé de neutrophiles et montré comme étant composé de 37 résidus avec deux leucines en N-terminal (Gudmundsson et coll., 1996). Le terme hCAP18 désigne désormais le prépropeptide, tandis que LL-37 désigne le peptide mature (Figure 39).

#### 2.3.3.1. Synthèse de LL-37

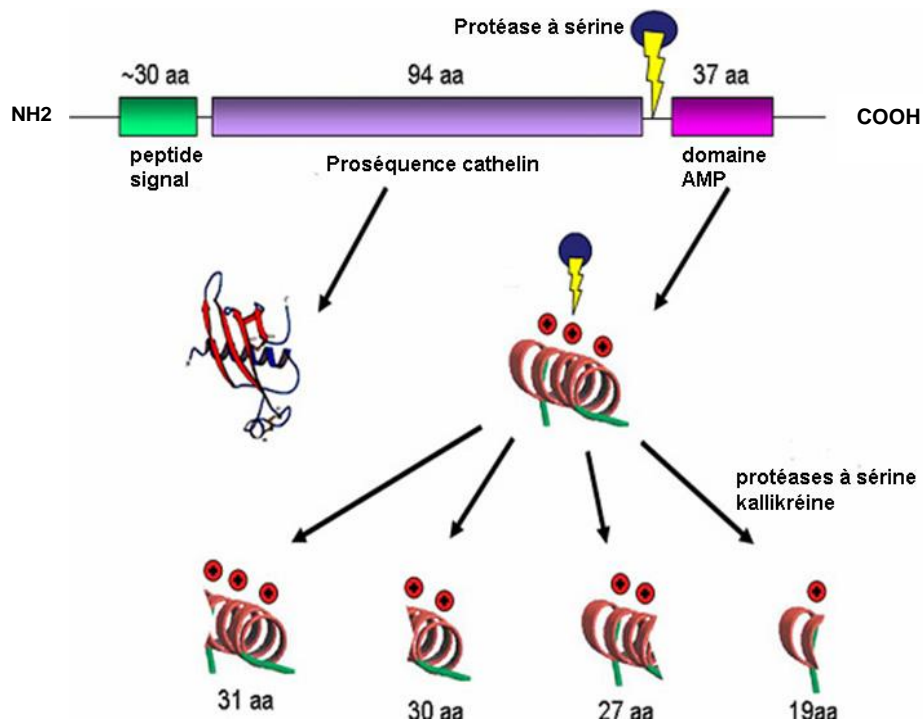


Figure 39 : Processus de maturation de la cathélicidine LL-37  
Izadpanah et coll., 2005, avec la permission d'Elsevier

### 2.3.3.2. Les sites d'expression

LL-37 est produite dans les neutrophiles immatures (Sorensen et coll., 1997) et dans diverses populations de cellules sanguines qui sont impliquées dans les réponses immunitaires et inflammatoires, y compris les cellules NK, les cellules T  $\gamma\delta$ , les cellules B, les monocytes (Agerberth et coll., 2000), les mastocytes (Di Nardo et coll., 2003), ainsi que dans les lignées de cellules hématopoïétiques (Yang et coll., 2003). En outre, le gène de la cathélicidine est largement exprimé dans la peau, et notamment dans les corps lamellaires des kératinocytes (Braff et coll., 2005), dans l'épithélium des voies respiratoires, la bouche, la langue, l'œsophage, l'intestin, (Hase et coll., 2002), la sueur et les glandes salivaires (Murakami et coll., 2002) et dans les testicules et l'épididyme. Le polypeptide est aussi sécrété au cours d'une blessure (Frohm et coll., 1996), dans le mucus des voies aériennes (Bals, 1998) et est détecté en quantités élevées (85  $\mu\text{g}$  /ml, en moyenne) dans le liquide séminal.

### 2.3.3.3. Mécanismes d'action de LL-37

LL-37 adopte une structure en hélice  $\alpha$  en formant des dimères voire des oligomères dans des conditions physiologiques. Elle reste en hélice lorsqu'elle est associée à une membrane (Johansson et coll., 1998). Les interactions ioniques et hydrophobes entre les peptides et les membranes sont favorisées par la présence de résidus chargés négativement et d'une courte chaîne hydrophobe dans la région N-terminale de LL-37 (Oren et coll., 1999).

Ainsi LL-37, sous sa forme hélicoïdale, détruit les organismes cibles en perturbant leur intégrité membranaire (Turner et coll., 1998). Des mesures biophysiques (Oren et coll., 1999 ; Henzler-Wildman et coll., 2003) indiquent que le mécanisme de perturbation membranaire implique une orientation de l'hélice amphipathique parallèle à la surface des deux couches anioniques. LL-37 s'accumule alors sur la membrane et forme une sorte de tapis et provoque des fuites de cytoplasme (Oren et coll., 1999 ; Henzler-Wildman et coll., 2003). Un autre modèle est proposé ; les fuites peuvent se faire éventuellement grâce à la formation de pores dans les lipides (Figure 40) (Henzler-Wildman et coll., 2003).

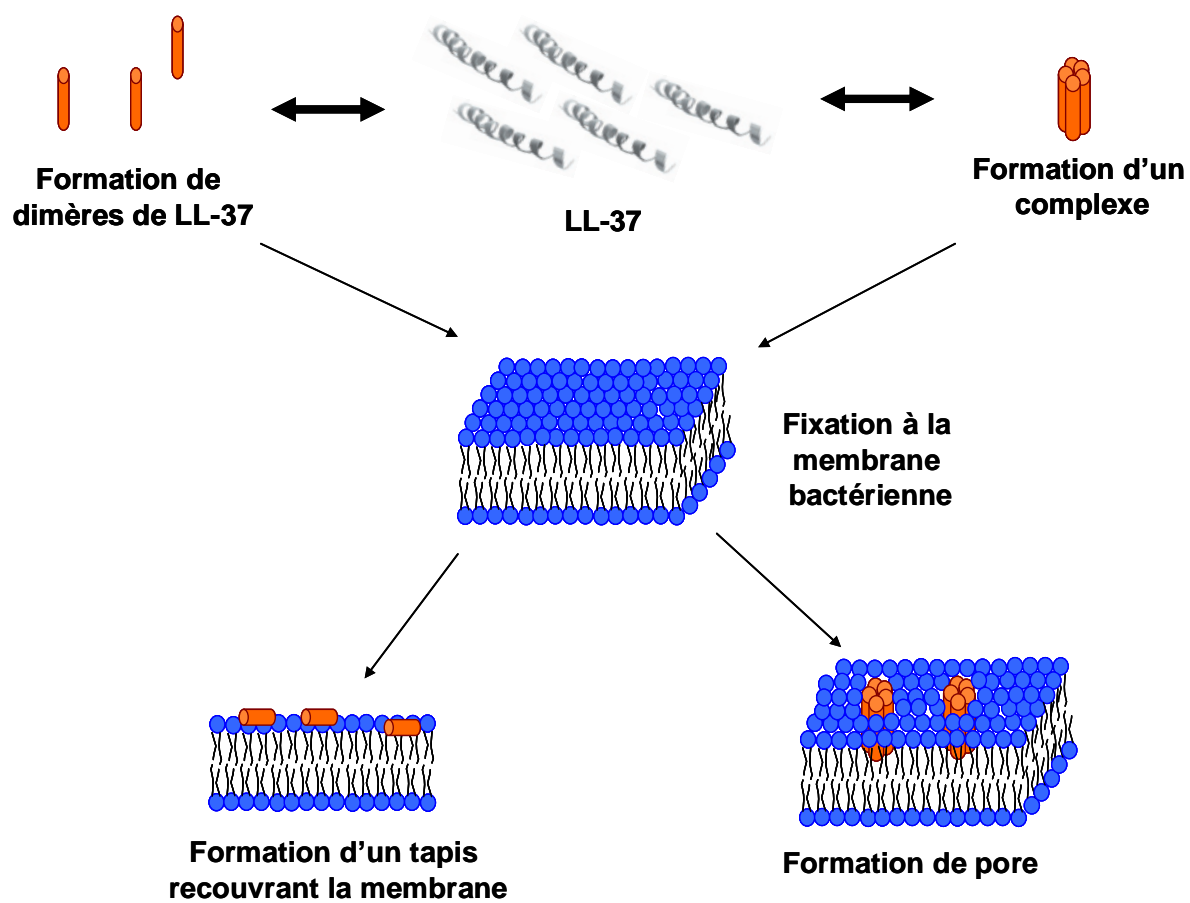


Figure 40 : Mécanisme d'action de LL37

LL-37 interagit moins avec des lipides possédant des groupes contenant de la choline ou du cholestérol. La choline aurait ainsi un rôle protecteur contre les effets de LL-37 sur la membrane (Henzler-Wildman et coll., 2003). Cette observation s'appuie sur la résistance de certaines bactéries. Il a été ainsi montré que *Hemophilus influenzae*, dont la membrane externe riche en groupements choline liés aux lipopolysaccharides de cette membrane externe, résiste mieux à l'action de LL-37 (Lysenko et coll., 2000).

#### 2.3.3.4. La régulation de LL-37

De nombreux facteurs influencent l'expression de LL-37 comme les bactéries et les stimuli inflammatoires. La synthèse des cathélicidines est aussi liée à l'état de différenciation cellulaire (Hase et coll., 2002 ; Schaubert et coll., 2003). Dans certaines pathologies comme la dermatite atopique, une diminution de



l'expression de LL-37 a été observée (Ong et coll., 2002). La raison de cette sous-expression de LL-37 n'est pas encore expliquée. Dans certaines maladies inflammatoires comme celle du côlon, aucune modification d'expression de LL-37 n'est observée (Hase et coll., 2002 ; Schaubert et coll., 2003) mais ce peptide peut être induit par le butyrate et d'autres acides gras à chaîne courte qui sont connus pour induire la différenciation des cellules du côlon humain (Schauber et coll., 2003) mettant en jeu la voie de signalisation MEK-ERK. Un autre facteur de la régulation de LL-37 s'effectue via la voie de différenciation cellulaire ASK-1 (Sayama et coll., 2001 ; Sayama et coll., 2005)

### 2.3.3.5. Rôle de la vitamine D3 dans la régulation de LL-37

Le métabolite actif de la vitamine D3 ; le 1,25 dihydroxyvitamine D3 (1,25 D3) est une molécule de signal importante contrôlant les réponses immunitaires innées dans les kératinocytes. Dans la peau blessée, le métabolisme de la vitamine D3 est activé et aboutit à une rapide induction de gènes nécessaires à la reconnaissance microbienne et à la défense antimicrobienne (Schauber et coll., 2007). La vitamine D3 induit ainsi l'expression de LL-37 qui renforce le pouvoir de protection des kératinocytes (Wang et coll., 2004 ; Weber et coll., 2005 ; Schaubert et coll., 2007 ; 2008) (Figure 41).

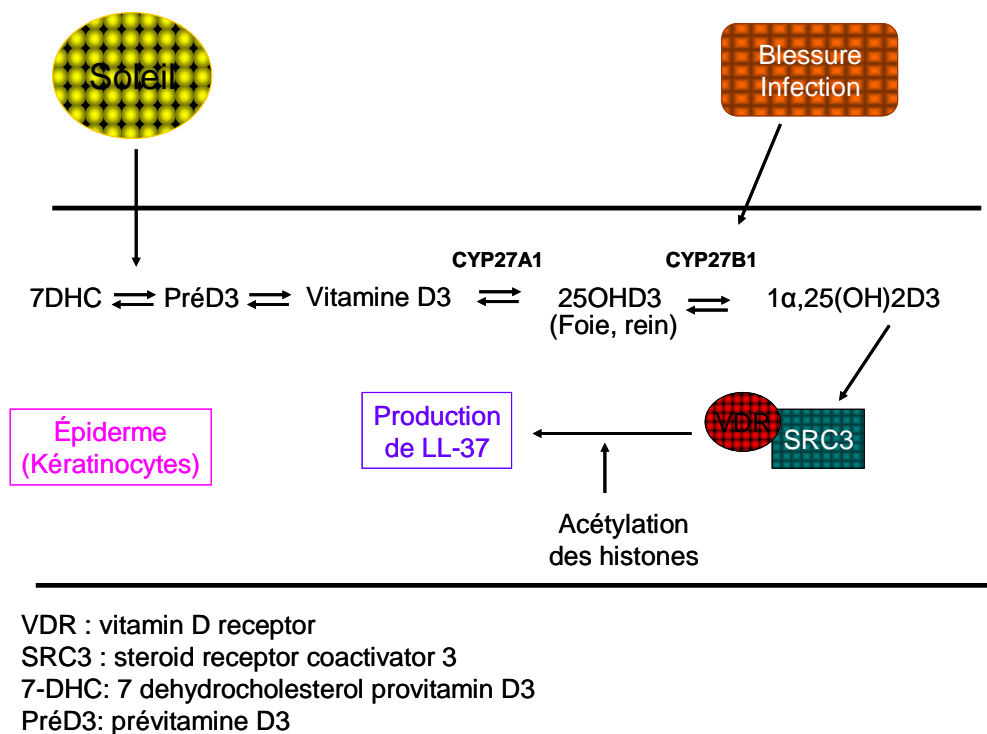


Figure 41 : Mécanisme d'action de la vitamine D3

### 2.3.3.6. Les activités de LL-37

#### 2.3.3.6.1. Activités antimicrobiennes et cytotoxiques

LL-37 est un PAM qui possède une charge nette de +6 à pH neutre. Sa principale activité inhibitrice vis à vis de bactéries à Gram négatif (*P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. coli* -Tanaka et coll., 2000), et à Gram positif (*S. aureus* -Midorikawa et coll., 2003). LL-37 est aussi active contre les streptocoques du groupe A retrouvés dans certaines blessures cutanées (Dorschner et coll., 2001 ; Lee et coll., 2005). Des taux élevés de LL-37 ont été mesurés dans les cellules épithéliales des voies respiratoires au cours d'infections (Schaller et Bals, 2002) et aussi dans les lésions cutanées psoriatiques (environ 304  $\mu\text{M}$  - Ong et coll., 2002). En outre, l'activité antimicrobienne *in vitro* de LL-37 est renforcée en présence des défensines  $\beta$  et  $\alpha$ , confortant l'idée de synergie entre les PAMs pour former une barrière efficace contre la prolifération microbienne (Ong et coll., 2002). Contrairement à la plupart des défensines, LL-37 est active contre des bactéries en présence de fortes concentrations en sels (jusqu'à 150 mM de NaCl qui correspond à la concentration retrouvée dans la sueur) ou dans différentes conditions physiologiques (Turner et coll., 1998).

Il est toutefois à noter que *S. aureus* s'est adapté pour se défendre contre les PAMs en développant un mécanisme de défense afin d'utiliser LL-37 à ses propres fins grâce aux staphylokinases (Braff et coll., 2007). En effet la cathélicidine se lie à l'activateur de plasminogène bactérien, la staphylokinase et entraîne l'activation du plasminogène et de la fibrinolyse par *S. aureus*.

#### 2.3.3.6.2. Activité chimio-attractante

Il a été montré que LL-37 interagit avec les KCs permettant un dialogue intercellulaire induisant ainsi diverses réponses de défense antimicrobienne. LL-37 a une activité chimiotactique et entraîne la migration de monocytes humains, de neutrophiles et de lymphocytes T CD4 (Agerberth et coll., 2000). L'activité chimiotactique de LL-37 dépend de la contribution de certains récepteurs situés à la surface de ces cellules inflammatoires et immunitaires comme les récepteurs FPRL-1 (formyl peptide receptor like 1), P2X7 et EGFR (epithelial growth factor receptor) (Tjabringa et coll., 2003).

De plus, les cathélicidines ont la capacité d'attirer les mastocytes (Niyonsaba et coll., 2002 ; Di Nardo et coll., 2003). LL-37 ainsi induit leur dégranulation et conduit à la libération de médiateurs inflammatoires, dont l'histamine, qui favorise l'infiltration de neutrophiles dans les tissus au cours d'une inflammation en augmentant la perméabilisation vasculaire (Niyonsaba et coll., 2003).

#### 2.3.3.6.3. Réparation tissulaire et angiogénèse

LL-37 possède aussi un rôle dans la réparation des tissus endommagés par l'initiation de la ré-épithélialisation de la peau (Heilborn et coll., 2003). Dans les kératinocytes elle peut être induite par différents facteurs de croissance, produits lors de la réparation d'une blessure comme par exemple le TGF- $\alpha$  (Sorensen et coll., 2003).

Koczulla et coll. (2003) ont montré que LL-37 peut jouer un rôle fonctionnel important dans l'angiogénèse. L'activité angiogénique de LL-37 dépend de la fixation du peptide au récepteur FRLP-1 et implique les voies PLC- $\gamma$ /PKC/NF- $\kappa$ B, la voie des Erk-1 et -2 MAPK et la voie PI3K/Akt dans les cellules endothéliales. LL-37 possède de plus un effet angiogénique direct sur les cellules endothéliales mais aussi un rôle dans la croissance des vaisseaux en attirant les neutrophiles et les monocytes.

#### 2.3.3.6.4. Prolifération / migration cellulaire

LL-37 peut être activée et ne plus être antimicrobien à faibles concentrations, mais induire la libération de chimiokines et cytokines comme par exemple l'IL-18 (Niyonsaba et coll., 2007) via des récepteurs couplés aux protéines G dans les kératinocytes (Braff et coll., 2005). Elle induit aussi la prolifération et la migration de ces mêmes kératinocytes via STAT1 et STAT3 (Braff et coll., 2005 ; Niyonsaba et coll., 2005).

#### 2.3.3.6.5. LL-37 et les pathologies de la peau

Plusieurs études convergent pour indiquer un rôle crucial de LL-37 *in vivo* (Nizet et Gallo, 2003). Ainsi une augmentation de LL-37 a été observée dans la peau et les muqueuses en réponse à une infection systémique et locale ainsi que dans les désordres inflammatoires et d'autres pathologies de la peau (Frohman et coll., 1997; Dorschner et coll., 2001; Ong et coll., 2002 ; Kim et coll., 2003).

Certaines bactéries peuvent provoquer une diminution de l'expression de LL-37. En effet, l'expression de LL-37 est inhibée dans le tube digestif de patients atteints d'infection à *Shigella* ainsi que dans les monocytes infectés par *Shigella* (Islam et coll., 2001), suggérant une virulence particulière des bactéries intestinales compromettant les défenses immunitaires innées.

#### 2.3.3.6.6. Liaison au LPS

LL-37 se lie avec une forte affinité au LPS libre *in vitro* (Golec, 2007). Elle inhibe ainsi les réponses cellulaires induites par le LPS telle que la libération de cytokines et chimiokines, d'oxyde nitrique et de facteurs tissulaires (Larrick et coll., 1995 ; Ohgami et coll., 2003).

#### 2.3.3.6.7. LL-37 et les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes jouant un rôle central dans l'immunité innée ainsi que dans l'immunité adaptative. Les cellules dendritiques immatures (iDCs) provenant de monocytes sanguins ont en présence de LL-37, une capacité endocytaire augmentée. LL-37 modifie l'expression des récepteurs phagocytiques, augmente l'expression de molécules co-stimulatrices et augmente la sécrétion de cytokines induisant une réponse Th1 (Davidson, 2004). Kandler (2006) dans son étude a démontré que LL-37 rend les cellules dendritiques moins aptes à activer les lymphocytes T et influencerait le développement de la réponse immunitaire adaptative. LL-37 jouerait alors un rôle de régulateur dans l'immunité adaptative mais aussi innée par un rétrocontrôle (Kandler et coll., 2006).

Récemment, un autre rôle pour LL-37 a été évoqué dans le psoriasis (Baumgarth et Bevins, 2007 ; Lande et coll., 2007). Dans le psoriasis, LL-37 est fortement augmenté. Celui-ci peut se fixer sur des brins d'ADN de l'hôte et former un complexe. Ce complexe active alors les cellules dendritiques plasmacytoïdes qui à leur tour induisent la production d'IFN- $\gamma$  qui est une des principales cytokines produites lors d'un psoriasis.

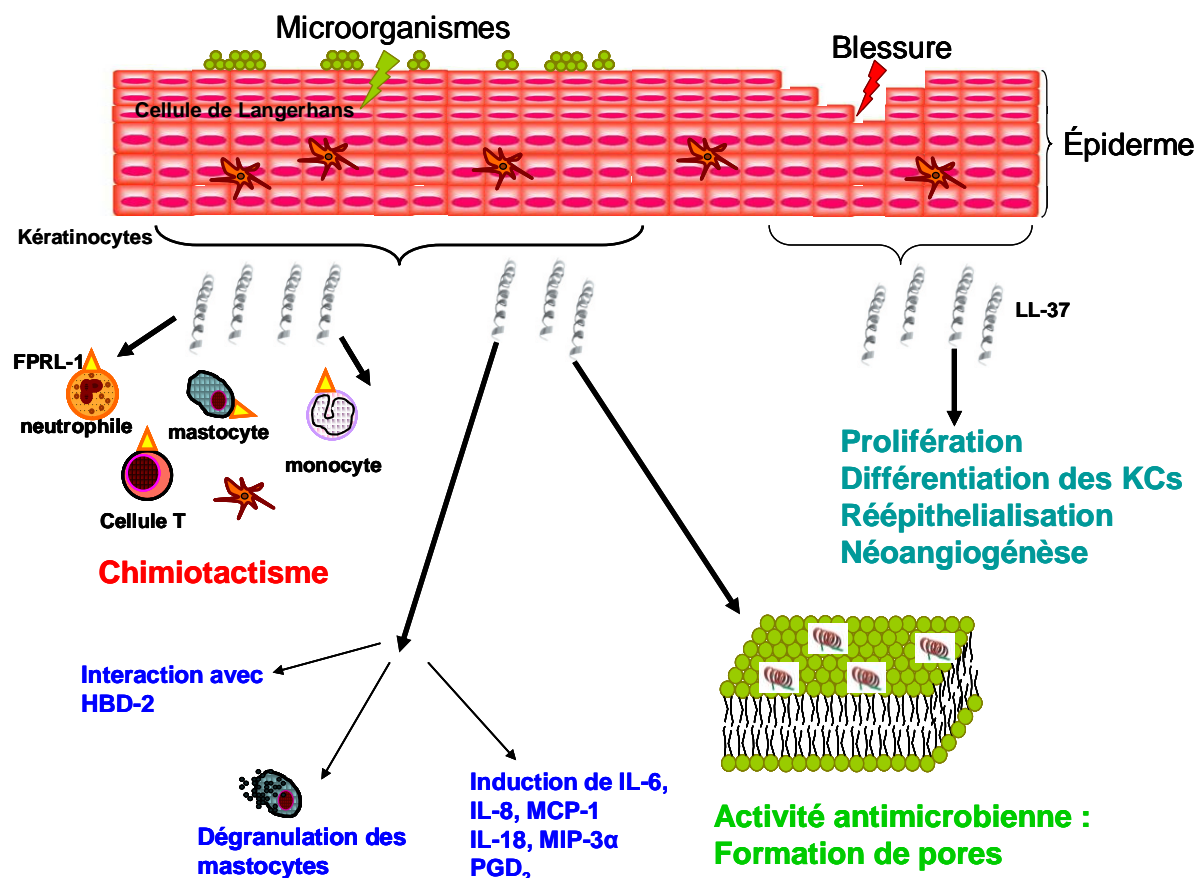


Figure 42 : Récapitulatif des actions de LL-37 dans la peau

**FPRL-1** : formyl peptide receptor like 1 ; **HBD-2** : human beta defensin 2; **MCP-1** : Monocyte chemotactic protein-1; **PGD<sub>2</sub>**: prostaglandine 2; **MIP-3α** : Macrophage inflammatory protein-3α; **IL-8**: interleukine 8

#### 2.3.4. Les autres peptides antimicrobiens

Les cathélicidines et les défensines sont les familles les plus connues pour leurs propriétés antimicrobiennes, cependant d'autres peptides ont été décrits comme ayant des activités antimicrobiennes dans la peau. Le tableau suivant résume l'ensemble des peptides et protéines ayant une activité antimicrobienne identifiés dans la peau (Tableau 7).

<b>PAMs identifiés dans les cellules résidentes</b>	
Cathélicidine	Frohm et coll., 1997
Défensines $\beta$	Harder et coll., 1997
BPI (bacterial/ permeability increasing protein)	Takahashi et coll., 2004
Lactoferrine	Cumberbatch et coll., 2000
Lysozyme	Marchini et coll., 2002
Dermacidine	Schittek et coll., 2001
Histones	Rose et coll., 1998
S100A15	Büchau et coll., 2007
RNase 7	Harder et coll., 2002
<b>PAMs identifiés dans les cellules non résidentes</b>	
Cathélicidine	Gallo et coll., 1994
$\alpha$ -Defensins	Harwig et coll., 1993
Lactoferrine	Caccavo et coll., 2002
Granulysine	Stenger et coll., 1998
<b>PAMs identifiés comme chimiokines</b>	
Psoriasine (S100A7)	Glaser et coll., 2005
Monokine induced by IFN- $\gamma$ (MIG/CXCL9)	Cole et coll., 2001
IFN-g-inducible protein of 10 kd (IP-10/CXCL10)	Cole et coll., 2001
Perforine	Stenger et coll., 1998
Eosinophil cationic protein (ECP)/RNase 3	Domachowske et coll., 1998
Eosinophil-derived neurotoxin (EDN)/RNase 2	Domachowske et coll., 1998
RANTES	Tang et coll., 2002
IFN-g-inducible T cell a chemoattractant (ITAC/CXCL11)	Cole et coll., 2001
<b>PAMs identifiés comme inhibiteurs de protéases</b>	
hCAP18/LL-37 prosequence (cathelin-like domain)	Zaiou et coll., 2003
Secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI)/antileukoprotease	Wingens et coll., 1998
Elafin/skin-derived antileukoprotease (SKALP)	Simpson et coll., 1999 Meyer-Hoffert et coll., 2003
P-cystatine A	Takahashi et coll., 2004
Cystatine C	Blankenvoorde et coll., 1998

Tableau 7 : Les peptides et les protéines à activité antimicrobienne de la peau

Un grand nombre de peptides et de protéines ont une activité antimicrobienne dans la peau (Tableau 7). Les défensines  $\beta$  et d'autres PAMs humains montrent souvent une superposition dans la distribution tissulaire. Dans certains cas, les différentes répartitions tissulaires et l'induction des signaux conduisant à la synthèse des PAMs (Hase et coll., 2002), suggèrent que ces peptides fonctionnels occupent des sites particuliers et peuvent être mis en jeu en réponse à des stimuli distincts au sein d'un même tissu.

#### 2.3.4.1 La RNase 7

La RNase 7 est l'un des principaux PAMs de la peau saine. Ce peptide de 14 kDa révèle une forte activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*) et à Gram positif (*P. acnes*, *S. aureus*) et contre la levure *C. albicans*.

La RNase 7 appartient à la superfamille des RNase A où l'on trouve également la RNase 2 (neurotoxine dérivé d'éosinophile), la RNase 3 (protéine cationique dérivée d'éosinophiles) et la RNase 5 (angiogénine). La RNase 7 est une des protéines liant l'héparine dans la couche cornée de l'épiderme, dans la peau saine. Malgré son taux basal important, la RNase7 peut être induite dans les KCs par des cytokines inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , l'IFN- $\gamma$  et à moindre degré par le TNF- $\alpha$ . Le mécanisme moléculaire induisant la RNase 7 par les KCs n'est pas encore connu (Harder et Schröder, 2002).

#### 2.3.4.2. La psoriasine (S100A7)

La psoriasine appartient à la famille des protéines S100 et est sur-exprimée dans des maladies cutanées comme le psoriasis où elle a été initialement découverte. Elle est sécrétée par les KCs et est considérée comme le principal agent bactéricide d'*E. coli* (Glaser et coll., 2005). En plus de son expression constitutive dans les KCs sains, la psoriasine peut être induite par l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ . La capacité des KCs à produire de fortes concentrations en psoriasine expliquerait pourquoi *E. coli* colonise rarement la peau. La psoriasine détruit préférentiellement *E. coli* mais possède aussi une faible activité sur *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *S. epidermidis*.

### 2.3.5. Le concept alarmine

En réponse à une infection et/ ou un dommage tissulaire, les cellules du système immunitaire de l'hôte produisent rapidement différents médiateurs qui fonctionnent non seulement comme des effecteurs de l'immunité innée mais peuvent agir aussi comme des alarmes du système immunitaire en induisant le recrutement et l'activation des leucocytes grâce à des récepteurs distincts.

Pour pouvoir différencier les molécules endogènes et exogènes qui entraînent un signal de danger dans la cellule, le terme d'alarmine a été proposé en 2005 par Oppenheim. Ce terme désigne les molécules induites lors d'une agression endogène. Les alarmines et les PAMPs constituent une large famille appelée DAMPs (damage-associated molecular patterns).

Les alarmines sont des molécules endogènes. Elles ont plusieurs caractéristiques :

- 1) Elles sont rapidement libérées,
- 2) Les cellules du système immunitaire peuvent être induites pour produire et libérer des alarmines,
- 3) Elles recrutent et activent des cellules du système immunitaire inné, en incluant les cellules dendritiques, et donc initient directement ou indirectement les réponses immunitaires adaptatives,
- 4) Elles peuvent induire la reconstruction des tissus qui ont été détruits soit de manière directe soit par des effets inflammatoires.

Les médiateurs de l'immunité innée possédant une activité alarmine comprennent les défensines, la cathélicidine, la neurotoxine dérivée des éosinophiles (EDN ou eosinophil-derived neurotoxin) (Yang et coll., 2004), et la HMGB1 (high mobility group box protein 1) (Dumitriu et coll., 2005). Ces molécules structurellement différentes ont d'autres fonctions bien établies. De nombreuses alarmines sont stockées dans des compartiments anatomiques distincts : neutrophiles, mastocytes, éosinophiles, etc. ou sont induites par des stimuli inflammatoires.

Toutes les alarmines sont multifonctionnelles et ont des activités antimicrobiennes. Les défensines, la cathélicidine et HMGB1 initient des réactions immunitaires innées inflammatoires en induisant des médiateurs pro-inflammatoires comme l'histamine, les prostaglandines, les chimiokines et induisent l'augmentation de la phagocytose. Les récepteurs utilisés par les alarmines pour activer les CPAs (cellules présentatrices d'antigènes) peuvent être les GiPCRs, FRPL1 et certains TLRs (TLR2 et TLR4). Bien que durant une infection ou au cours d'une agression tissulaire, de nombreux signaux solubles endogènes soient générés et/ou sécrétés, les alarmines sont uniques parce que, sur la base de leur capacités à attirer et activer



les CPAs (Yang et coll., 2009), elles agissent comme des adjuvants endogènes augmentant l'immunité (Oppenheim et coll., 2007 ; Peric et coll., 2009).

Il reste certainement d'autres alarmines à identifier. L'urokinase, les HSP (heat shock proteins), l'acide urique, certaines protéines de la famille des S100 ont montré des activités chimio-attractantes. La grande variété de cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines qui apparaissent sur le site d'inflammation peuvent en théorie avoir le même effet qu'une alarmine (Bianchi, 2007).

# Chapitre 2

## Objectifs

### de la thèse

## Objectifs de la thèse

La borréliose de Lyme est une infection bactérienne due à un spirochète, *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Le vecteur qui transmet cette bactérie est une tique du genre Ixodes, arthropode hématophage qui a besoin d'une période d'attachement de 3 à 10 jours sur l'hôte vertébré pour la prise complète du repas sanguin. Cet évènement dans la transmission des pathogènes souligne : (1) le rôle de l'interface cutanée et de son immunité dans la transmission de la bactérie, (2) le rôle de la tique qui par sa salive devra moduler pharmacologiquement et immunologiquement la réponse de l'hôte pour rester fixé plusieurs jours.

- (1) La peau n'est pas seulement une barrière physique contre les agressions extérieures mais c'est aussi une barrière immunologique. De nombreuses cellules immunitaires comme les cellules de Langerhans et les **kératinocytes** dans l'épiderme, les mastocytes, les cellules dendritiques, les macrophages et les **fibroblastes** dans le derme, participent à l'immunité innée mais aussi à l'immunité adaptative. L'immunité innée intervient notamment en produisant des cytokines, des chimiokines et des **peptides antimicrobiens**. Les peptides antimicrobiens sont de petites molécules cationiques qui ont la capacité de cibler un large spectre de pathogènes (virus, champignons, bactéries et parasites) et de les détruire. Ils sont aussi chimio-attractants et participent à la formation de la matrice extracellulaire. Ces peptides sont largement retrouvés dans les épithélia comme la peau et plus particulièrement produits par les kératinocytes. Cependant, leur rôle dans les maladies à transmission vectorielle comme la maladie de Lyme n'a pas été encore étudié. Nous nous sommes donc intéressés à leur rôle potentiel au niveau de la peau lors de la transmission de *Borrelia*. La réponse inflammatoire des cellules résidentes de la peau, kératinocytes et fibroblastes, a été étudiée *in vitro* en présence de la bactérie entière *B. burgdorferi* ou en présence de deux de ses principales protéines de surface, Osps (OspA et OspC). La lipoprotéine OspC est notamment essentielle pour la transmission de *Borrelia* à l'hôte vertébré.
- (2) La **salive de tique** : Plusieurs études ont montré que les *Borrelia*, transmises via la piqûre de tique, sont plus pathogènes que les *Borrelia* cultivées *in vitro* et inoculées via la seringue. Ceci souligne un rôle majeur de la salive de tique dans la pathogénicité du micro-organisme. Tandis que le rôle de la salive de la tique dans l'immunité adaptative est clairement démontré, peu d'études ont été initiées concernant le rôle de la salive de tique dans l'immunité innée.

Nous avons donc analysé le **pouvoir immunomodulateur** potentiel de la salive de tique sur l'immunité innée de la peau en mesurant son effet sur la sécrétion des molécules pro-inflammatoires par les kératinocytes.

Enfin, la maladie de Lyme est caractérisée par une variété de manifestations cliniques touchant divers organes (peau, cœur, système nerveux et articulation). Nous avons tenté d'analyser si l'interface cutanée pouvait avoir un rôle déterminant sur l'organotropisme de *Borrelia*. Pour cela, nous avons testé différents pathotypes de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, en étudiant différentes souches et espèces de *Borrelia* responsables de différentes manifestations cliniques chez l'homme et nous avons étudié leur potentiel inflammatoire *in vitro* sur les cellules résidentes de la peau.

# Chapitre 3

## Résultats

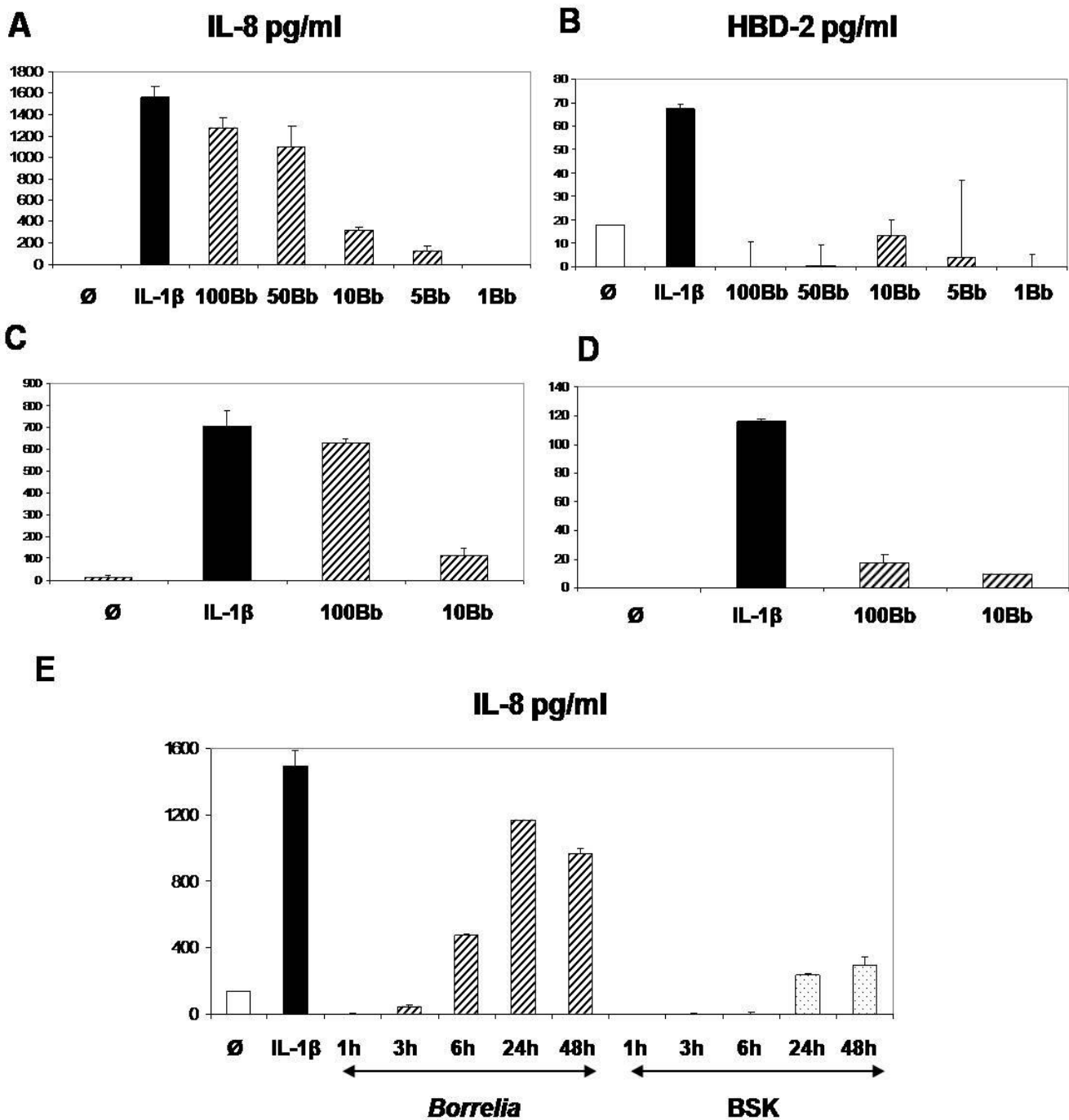
# Introduction

## 1. Mise au point de la culture cellulaire

Comme nous l'avons décrit dans la première partie, l'interface cutanée joue un rôle essentiel dans le développement de la borréliose de Lyme. Les spirochètes transmis à l'hôte par la tique se multiplient d'abord localement au niveau du site de piqûre. Comme dans d'autres infections cutanées bactériennes, l'immunité innée de la peau qui est non spécifique du pathogène, mais essentielle pour le déclenchement de l'immunité spécifique, est de plus en plus souvent incriminée dans le contrôle des infections cutanées (Ong et coll., 2002). L'épiderme, couche la plus externe de la peau et le derme sous-épidermique fournissent la première ligne de défense contre l'infection. Parmi les cellules qui composent l'épiderme on retrouve majoritairement des KCs ainsi que des cellules de Langerhans. Dans le derme par contre, on trouve des FBs, des mastocytes et des cellules dendritiques dermiques. A ce jour, le rôle de l'immunité innée cutanée et plus particulièrement celui des PAMs n'a pas été étudié lors de la borréliose de Lyme.

Afin d'étudier les interactions entre cellules cutanées et agents de la borréliose de Lyme, nous avons développé dans un premier temps un modèle *in vitro* de culture cellulaire de KCs et de FBs. Une fois les conditions de cultures adéquates déterminées, nous avons étudié l'immunité innée cutanée et plus particulièrement l'induction des PAMs en réponse à la stimulation par *Borrelia*. Les premières expériences ont été faites sur une lignée de KCs : les cellules Hacat. La réponse inflammatoire, notamment la production de la chimiokine IL-8 a été étudiée lorsque ces cellules étaient co-incubées avec *B. burgdorferi* ss souche N40 pendant 24h. Dans l'ensemble des expériences, l'IL-1 $\beta$  était le témoin positif, que ce soit dans l'expression de l'IL-8 mais aussi dans l'expression d'hBD-2. L'activation des cellules Hacat par *Borrelia* montre une induction de la chimiokine IL-8 (Figure 43A) à 24h et ce de manière dose dépendante. Cependant, ces cellules ne produisent pas le peptide antimicrobien hBD-2 (Figure 43B).

Nous avons ensuite travaillé non plus sur une lignée cellulaire cutanée, mais sur des KCs humains primaires afin de voir si ces cellules primaires produisaient des PAMs. Ces KCs se développent en monocouche avec au départ formation d'une première couche de KCs basaux. Une fois à confluence, l'ajout de calcium entraîne la différenciation des KCs, qui correspondent alors aux cellules de la couche la plus externe de la peau (Pillai et coll., 1990).



**Figure 43 : Mesure par ELISA de la sécrétion d'IL-8 et d'HBD-2 par la lignée cellulaire Hacat et des kératinocytes humains primaires stimulés par *B. burgdorferi* ss N40 pendant 24 heures.**

A : Titration de la sécrétion d'IL-8 par les Hacat stimulées par *Borrelia*

B : Titration de la sécrétion d'HBD-2 par les Hacat stimulées par *Borrelia*

C : Titration de la sécrétion d'IL-8 par les KCs provenant d'abdominoplasties stimulés par *Borrelia*

D : Titration de la sécrétion d'HBD-2 par les KCs provenant d'abdominoplasties stimulés par *Borrelia*

E : Cinétique de la sécrétion d'IL-8 par les KCs humains primaires stimulés par des *Borrelia* lavées et par le milieu BSK traité dans les mêmes conditions.

Bb : *Borrelia burgdorferi* ss N40

100Bb; 50Bb; 10Bb; 5Bb; 1Bb : 100, 50, 10, 5, 1 *Borrelia* pour un KC

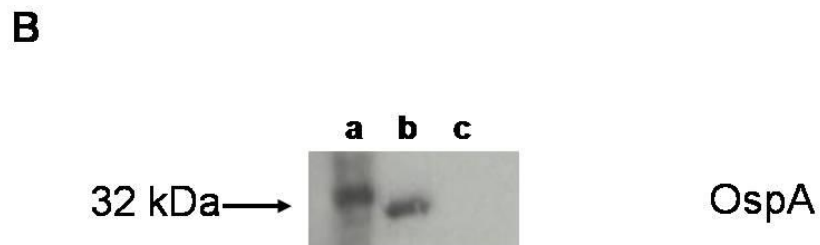
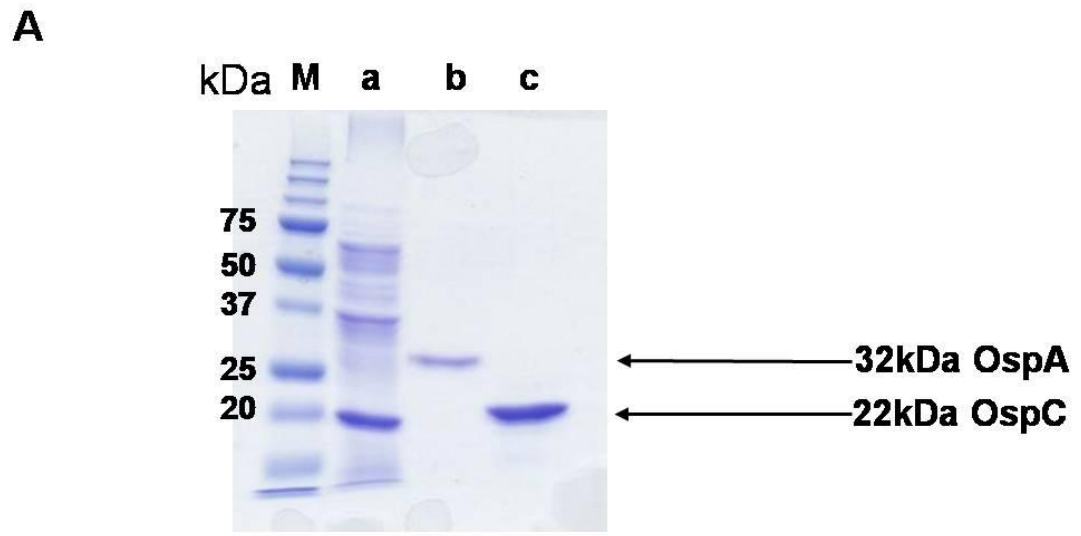


Nous avons initialement travaillé avec des KCs provenant d'abdominoplasties de sujets adultes (18- 65 ans). Les cellules activées par *B. burgdorferi* N40, sécrètent de l'IL-8 et de l'HBD-2. Elles montrent une meilleure réactivité par rapport à la ligné cellulaire Hacat (Figure 43C et 43D). Cependant, les résultats obtenus sont hétérogènes. Nous avons ainsi pu observer que ces KCs humains primaires ne sont pas, d'une abdominoplastie à l'autre, stimulables de la même façon par les bactéries et par l'IL-1 $\beta$ . Ce manque de reproductibilité dans les résultats nous a conduit à tester d'autres KCs humains primaires issus de prépuce (1-6 ans) (Andrei et coll., 2005). Ces KCs juvéniles induisent une meilleure réponse à *Borrelia* et montrent une bonne reproductibilité dans les résultats. Ce sont les cellules utilisées dans l'ensemble des résultats présentés par la suite (I, II, III et IV). Ils sont soit d'origine commerciale (Promocell), soit isolés de patients (service de chirurgie infantile du Pr. Becmeur, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France).

#### 1. *Borrelia burgdorferi* sl

Le milieu de culture BSK qui permet la croissance des *Borrelia* est un milieu riche contenant 6% de sérum de lapin. Afin de vérifier la spécificité d'activation des cellules par les *Borrelia*, nous avons stimulé les KCs humains primaires avec des *Borrelia* lavées et avec le BSK seul traité dans les mêmes conditions. Les bactéries et le BSK subissent ainsi deux centrifugations de 30 minutes à 20°C, à 5 000 xg dans du milieu de lavage (milieu Hanks (Invitrogen)). Les expériences sont menées avec la souche *B. burgdorferi* ss N40 toujours utilisée au passage P8. La figure 43E montre que le milieu BSK a un effet négligeable sur l'expression de l'IL-8, par comparaison avec l'expression liée aux *Borrelia*.

Plusieurs études ont montré que les *Borrelia* cultivées *in vitro* n'expriment pas les mêmes antigènes de surface que les *Borrelia* qui se développent chez la tique. De ce fait, nous avons voulu vérifier si la culture de *Borrelia* que nous utilisons pour stimuler les cellules possèdent bien à leur surface certaines protéines d'intérêt, notamment OspC, décrite comme essentielle dans la transmission de la bactérie et OspA qui est importante dans l'étape de fixation de *Borrelia* à l'intestin de la tique (Ohnishi et coll., 2001 ; Tilly et coll., 2006 ; 2007). Par la technique de Western Blot, OspA et OspC ont été mises en évidence dans les cultures de *B. burgdorferi* ss N40 (Figure 44).



**Figure 44 : Identification d'OspA et OspC dans la culture de *B. burgdorferi* ss N40 sur gel SDS-PAGE 15% et Western Blot.**

A : gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de coomassie

B : Western Blot pour la détection d'OspA avec un anticorps anti-OspA (dilution au 1/1000) (Baxter)

C : Western Blot pour la détection d'OspC avec un anticorps anti-OspC (dilution 1/1000) (Baxter)

a : bactéries totales ; b : OspA non lipidée; c : OspC non lipidée

M : marqueur de poids moléculaire

## 2. Les glandes salivaires de tiques *I. ricinus*

Les extraits de glandes salivaires proviennent de tiques *I. ricinus* qui sont originaires d'un élevage de Neuchâtel (Suisse), et qui sont maintenues à Strasbourg. Les tiques qui proviennent de Neuchâtel sont des tiques femelles adultes et leur ponte. Les œufs une fois éclos donnent des larves qui seront mises sur des souris pour leur premier repas sanguin. Les larves sont récupérées et mises en pilulier à température ambiante, 80% d'humidité. Après la mue, les nymphes sont mises de façon similaire sur souris. Enfin, les tiques adultes obtenues sont mises sur un lapin pour un dernier repas sanguin pour l'obtention des oeufs. Pour la production des extraits de glandes salivaires (GS), des tiques adultes sont nourries pendant trois jours sur souris. Les tiques sont ensuite collectées, lavées dans l'éthanol, puis dans du PBS. Les GS sont ensuite disséquées sous une lampe binoculaire et mises dans du PBS. La préparation subit trois congélations/ décongélations successives et les extraits sont centrifugés pendant 10 minutes à 10 000 xg. Le surnageant est récupéré et gardé à -80°C jusqu'à utilisation. La concentration en protéines des GS est déterminée par la technique de Bradford (Biorad) et un test en endotoxine (Endosafe ®, Charles River, USA) est effectué pour vérifier que l'échantillon n'est pas contaminé. Dans les expériences suivantes, un équivalent des GS d'une tique (qui correspond à 20 µg/ml) est utilisé pour étudier la modulation de l'inflammation.

# Publication n°1

**Defensin is suppressed by tick saliva gland extract during the *in vitro* interaction of resident skin cells with *Borrelia burgdorferi***

J. Invest. Dermatol,  
129, 2515-7, 2009

**I. Defensin is suppressed by tick salivary gland extract during the *in vitro* interaction of resident skin cells with *Borrelia burgdorferi*.**

J. Invest. Dermatol, 129, 2515-7, 2009

Dans les maladies à transmission vectorielle, l'interface cutanée joue un rôle très important. Lors de la maladie de Lyme, l'érythème migrant, infection cutanée typique caractérisée par une lésion inflammatoire plus ou moins circulaire, apparaît le plus souvent quelques jours après la piqûre de tique.

Dans cette première partie de thèse, nous avons étudié le rôle de l'immunité innée cutanée lors de la borréliose de Lyme (Publication I). Nous nous sommes intéressés aux cellules résidentes que sont les kératinocytes (KCs) et les fibroblastes (FBs). Nous avons étudié la réactivité de ces cellules primaires en réponse à une titration de *B. burgdorferi* ss N40, à la concentration de 100, 10 et 1 *Borrelia* pour une cellule. Pour les deux types cellulaires, la concentration de 100 *Borrelia* pour une cellule est la plus efficace. Nous avons également réalisé une étude cinétique de cette réponse car les molécules inflammatoires n'ont pas toutes le même pic d'activité au cours du temps. Les PAMs notamment sont en effet souvent sécrétés de façon précoce au cours de l'inflammation (Harder et Schröder, 2005). Les KCs ont ensuite été choisis pour mesurer l'effet d'un extrait de glandes salivaires (GS) d'*I. ricinus* sur la sécrétion d'IL-8 et d'hBD-2 à 6 heures et à 24 heures.

Nous avons ainsi montré que les KCs induisent l'expression d'hBD-2 de manière précoce mais pas de LL-37 lorsqu'ils sont stimulés par *B. burgdorferi* ss N40. Par contre l'inverse est observé dans les FBs, ils produisent LL-37 mais pas d'hBD-2. De plus l'effet immunosuppresseur de l'extrait de salive de tique d'*I. ricinus* a été clairement démontré que ce soit pour le PAM hBD-2 mais aussi pour la chimiokine IL-8.

Cet article a fait l'objet d'un commentaire de Hovius dans le numéro 129 de « J. Invest. Dermatol. » où a été publié notre article.

report and a brief review. *Int J Dermatol* 46:287-9

Judge M, McLean WHI, Munro CS (2004) Disorders of keratinization. In: *Rook's Textbook of Dermatology*. (Burns T, Breathnach S, Cox C, Griffiths C, eds). Vol. 2. Blackwell Scientific: Oxford, 34.54-6

Kurban AK, Azar HA (1969) Familial continual skin peeling. *Brit J Derm* 81:191-5

Mevorah B, Frenk E, Saurat JH, Siegenthaler G (1987) Peeling skin syndrome: a clinical, ultrastructural and biochemical study. *Br J Dermatol* 116:117-25

Sardy M, Fay A, Karpati S, Horvath A (2002) Come'l-Netherton syndrome and peeling skin syndrome type B: overlapping syndromes or one entity? *Int J Dermatol* 41: 264-8

Silverman AK, Ellis CN, Beals TF, Woo TY (1986) Continual skin peeling syndrome. An electron microscopic study. *Arch Dermatol* 122:71-5

Shwyder T, Conn S, Lowe L (1997) Acral peeling skin syndrome. *Arch Dermatol* 133:535-6

Traupe H (1989) *The Ichthyoses: A Guide to Clinical Diagnosis, Genetic Counseling, and Therapy*. Springer-Verlag: Berlin

See related commentary on pg 2337

# Defensin Is Suppressed by Tick Salivary Gland Extract During the In Vitro Interaction of Resident Skin Cells with *Borrelia burgdorferi*

*Journal of Investigative Dermatology* (2009) 129, 2515-2517; doi:10.1038/jid.2009.73; published online 2

April 2009

## TO THE EDITOR

The causative agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, is a spirochete parasitizing vertebrates and transmitted by the tick, *Ixodes* sp. Lyme disease is the most common vector-borne disease in the Northern Hemisphere (Piesman and Gern, 2004). It manifests itself frequently with an erythema migrans rash at the site of the infection. However, the infection can progress and disseminate, affecting other skin sites, the joints, the heart, and the nervous system in humans. Control of the initial cutaneous phase may play a crucial role in the outcome of the disease, as not all patients develop disseminated clinical infection (Steere and Glickstein, 2004).

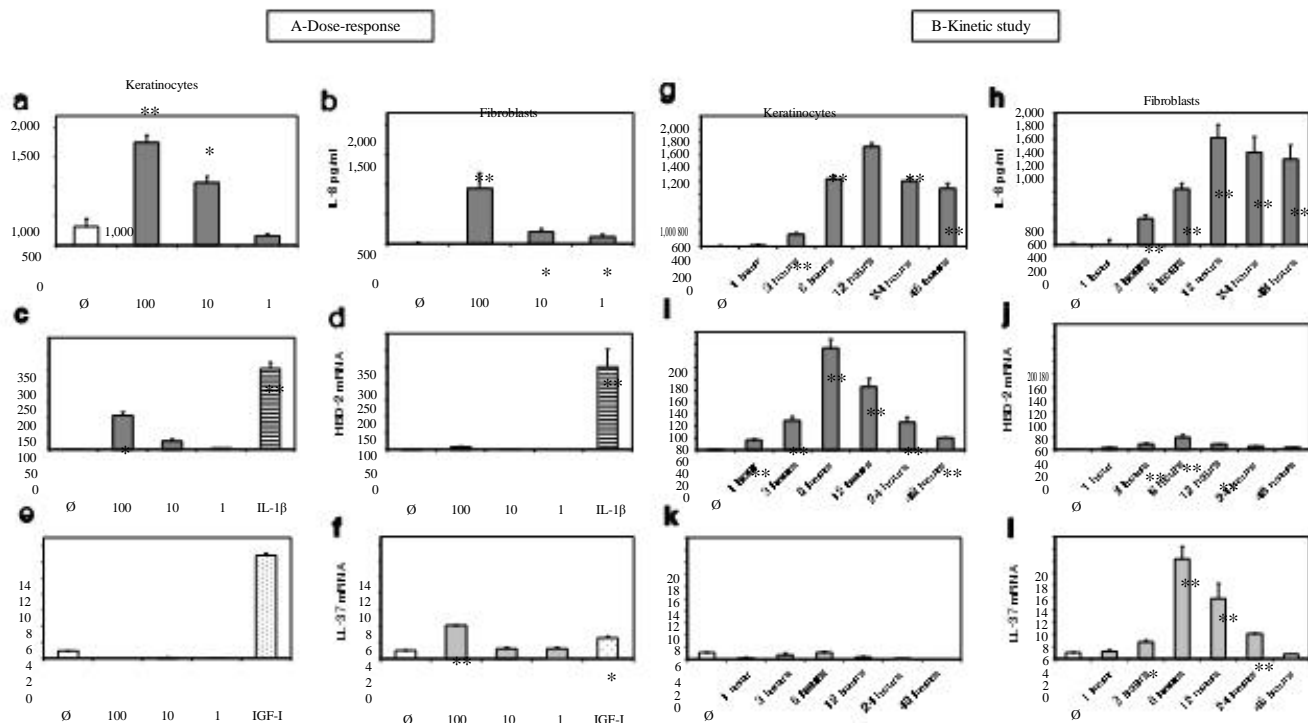
The skin constitutes a complex physical barrier. First, the epidermis comprises mainly keratinocytes (KCs) and Langerhans cells. These cells possess specific Toll-like receptors (TLRs) that recognize certain defined patterns, the pathogen-associated molecular patterns, present on pathogens. The interaction between pathogen-associated molecular patterns and TLRs leads to the activation of the NF- $\kappa$ B pathway, with the production of inflammatory molecules including chemokines, cyto-

kines, and antimicrobial peptides (AMPs) (Pivarsci et al., 2004). These molecules of innate immunity are essential to the control of infection. Dermal fibroblasts (FBs) constitute a second group of resident skin cells that secrete the extracellular matrix and communicate with other cell types such as dermal dendritic cells, mast cells, macrophages, and KCs (Sorrell and Caplan, 2004).

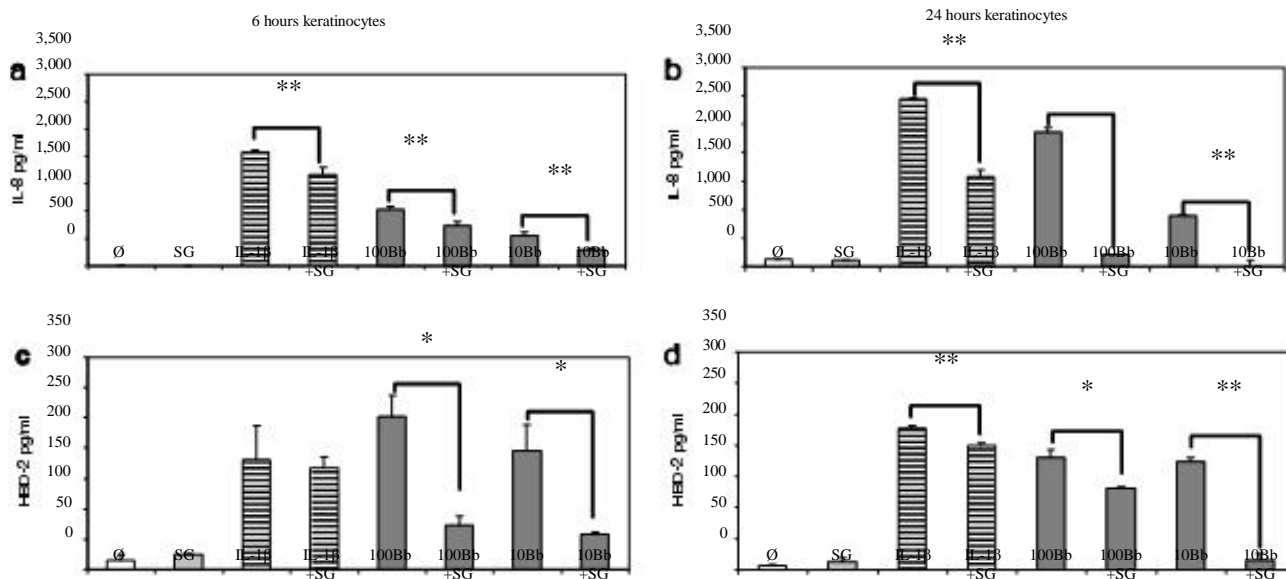
Ebnet et al. (1997) reported the activation of NF- $\kappa$ B upon the interaction of *Borrelia* with human KCs and FBs. However, no recent study has investigated the potential induction of AMPs in the interaction of *B. burgdorferi* with resident skin cells. We studied the induction of the proinflammatory molecule IL-8, defensins, and cathelicidin. IL-8 is a chemokine that attracts neutrophils, major cells involved in inflammation and secreting AMPs. Defensins are produced by leukocytes and various epithelial cells (Ganz, 2003). The cathelicidin LL-37, in humans, is present constitutively in neutrophil granules and is inducible in epithelial cells in response to infection. Their role in the control of several skin inflammations is well established (Nizet et al., 2001; Ong et al., 2002; Braff et al.,

2005). We used ELISA to measure the secretion of IL-8 and HBD-2 (human b-defensin-2) and quantitative real-time reverse transcriptase-PCR to study the induction of HBD-2 and LL-37 mRNAs by KCs and FBs. IL-8 was induced by *B. burgdorferi* in a dose-dependent manner in KCs and FBs (Figure 1a and b). Regarding AMP mRNAs, defensin, but not cathelicidin, was induced in KCs (Figure 1c and f). In FBs, *Borrelia* did not induce HBD-2 and a weak expression of LL-37 mRNA was observed (Figure 1d and f). A kinetic study revealed that IL-8 secretion reached its highest level at 12 hours for both KCs and FBs (Figure 1g and h), whereas HBD-2 mRNA reached a peak at 6 hours in KCs (Figure 1i), also confirmed by the measure of HBD-2 secretion by ELISA (data not shown). Only very weak amounts were found to be secreted by FBs upon stimulation with *Borrelia* (Figure 1j). For LL-37 mRNA, only marginal expression by KCs was shown (Figure 1k), whereas *Borrelia* elicited a much higher expression in FBs, which peaked at 6 hours (Figure 1l). As *Borrelia* are transmitted by the *Ixodes* tick, we analyzed the effect of tick salivary gland (SG) extract on host cell inflammation. As can be seen in Figure 2, induction of IL-8 and HBD-2 was significantly inhibited by SG extract. The inhibitory effect on IL-8

Abbreviations: AMP, antimicrobial peptide; FB, fibroblast; HBD, human b-defensin; KC, keratinocyte; SG, salivary gland; TLR, Toll-like receptor



**Figure 1. The co-incubation of resident skin cells with *B. burgdorferi* N40 induces an inflammatory response.** (A) Dose-response of human primary keratinocytes (KCs) and fibroblasts (FBs) stimulated with various concentrations of *B. burgdorferi* N40 for 24 hours. IL-8 (a, b), human b-defensin-2 (HBD-2) mRNA (c, d), and LL-37 mRNA (e, f) were measured as selected markers of inflammation. KCs and FBs were incubated with 100 *Borrelia*, 10 *Borrelia*, and 1 *Borrelia* per cell, negative control: KCs and FBs with medium alone ( $\emptyset$ ). IL-1 $\beta$  was the positive control for HBD-2, and IGF-1 was the positive control for LL-37. (B) Kinetic study of the inflammatory response of KCs and FBs: measure of IL-8 secretion by ELISA (g, h), measure of HBD-2 (i, j) and LL-37 mRNA expression (k, l) by quantitative real-time reverse transcriptase-PCR. Cells were incubated with *B. burgdorferi* (100 to 1 cell) for various times. Negative control was unstimulated cells ( $\emptyset$ ). Each bar shows the mean $\pm$ SD from three separate experiments. \*\*\* $P$ 0.001; \*\* $P$ 0.01; and \* $P$ 0.05 compared between stimulated and non-stimulated cells.



**Figure 2. Tick salivary gland extract exerts an inhibitory effect on the interaction of human primary keratinocytes with *B. burgdorferi* N40 at 6 and 24 hours.** Two cell-bacteria ratios were tested: 100 *Borrelia* (100 Bb) to 1 cell and 10 *Borrelia* to 1 cell (10 Bb). Measure of the inhibition of IL-8 (a, b) and human b-defensin-2 (HBD-2) (c, d) secretions by ELISA.  $\emptyset$ : negative control and IL-1 $\beta$ : positive control. The data are representative of three independent experiments with  $\pm$ SD. \*\*\* $P$ 0.001; \*\* $P$ 0.01; and \* $P$ 0.05 compared with control cells.

and HBD-2 secretions was seen as early as 6 hours after the incubation of SG extracts (Figure 2a-c) and was most remarkable after 24 hours of incubation (Figure 2 b-d).

The skin is the first organ to be infected by *Borrelia*, and innate resistance may be particularly important in limiting spirochetal dissemination. IL-8 and defensin secretion by these resident cells makes KCs important actors in the play of innate cutaneous immunity in the early phase of Lyme disease. They interact in the epidermis with Langerhans cells, secreting significant amounts of IL-1b, and also with FBs by secreting IL-1b and TGF- $\beta$  (Werner et al., 2007).

The tick feeds for 24–48 hours before inoculating the organism into the skin (Fikrig and Narasimhan, 2006). Many studies have shown the immunomodulatory properties of tick saliva on adaptive immunity, but only a few studies have reported its effect on innate immunity (Brossard and Wikel, 2004; Hovius et al., 2007). The surface lipoproteins of *Borrelia* interact with TLR2 (Hirschfeld et al., 1999), present on KCs (Pivarsci et al., 2004). Recently, it was postulated that in the early phase of *Borrelia* transmission, a protein of tick saliva, Salp15, could help the bacteria to evade the host immune response by binding to OspC, inhibiting antibody-mediated killing (Ramamoorthi et al., 2005); to the CD4 T-cell receptor (Garg et al., 2006); and to the DC-SIGN receptor of dendritic cells (Hovius et al., 2008). SG extract could also exert its effect by inhibiting the interaction between TLR and Osp antigens (Fikrig and Narasimhan, 2006). Preliminary data support this hypothesis: OspC, a TLR2 ligand, preincubated with Salp15 inhibits KC inflammation (data not shown). AMPs have been described as multifunctional molecules—they have antimicrobial activities but also chemotactic properties on immune cells (Yang et al., 2002; Schroder and Harder, 2006). LL-37 and a-defensin isolated from neutrophil granules can affect the survival of *Borrelia* in vitro (Lusitani et al., 2002). We also observed such an effect of HBD-2 and LL-37 on *Borrelia* in vitro, but the effect was transient, as the bacteria recovered after 24 hours (data

not shown). Tick saliva would inhibit defensin and chemokines not as AMP molecules but as chemotactic molecules, active on immune cells. This local inhibition of cellular infiltrate could allow *Borrelia* to multiply locally before disseminating to the rest of the body. The cutaneous inflammation constitutes the initial phase of Lyme disease, and the innate immune response could be essential to controlling the development of the disease. At this point, it is interesting to point out that tick saliva exerts its effects directly on the antichemotactic and antibacterial arms of the immune response as well as by skewing the immune response to a less harmful antibacterial response. During natural transmission, *Borrelia* may benefit from these two tick-saliva-induced complementary mechanisms to escape the immune system.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank C Dezutter, from EA 3732, University Lyon I, France, for her scientific support in human primary KC culture, and B Betschart and L Gern, University of Neuchâtel, for their help in maintaining the tick colony. This research was supported in part by a grant from the School of Medicine of Strasbourg. Claire Marchal was supported by grant 07/908/225 from the Conseil Régional d'Alsace.

Claire MP Marchal<sup>1</sup>, Benjamin J. Luft<sup>2</sup>, Xiaohua Yang<sup>2</sup>, Jean Sibilia<sup>1</sup>, Benoît Jaulhac<sup>1,3</sup> and Nathalie M Boulanger<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> UPRES EA 3432, Physiopathologie des

dermatoses, Faculté de

Médecine, Université de Louis

Pasteur, Strasbourg, France and <sup>2</sup>Division of Infectious Diseases, Stony Brook University, Stony Brook, New York, USA

E-mail: nathalie.boulanger@pharma.u-strasbg.fr

<sup>3</sup> BJ and NB contributed equally to the paper

#### REFERENCES

- Braff MH, Zaiou M, Fierer J, Nizet V, Gallo RL (2005) Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens. *Infect Immun* 73:6771–81
- Brossard M, Wikel SK (2004) Tick immunobiology. *Parasitology* 129:161–76
- Ebnet K, Brown KD, Siebenlist UK, Simon MM, Shaw S (1997) *Borrelia burgdorferi* activates nuclear factor- $\kappa$ B and is a potent inducer of chemokine and adhesion molecule gene expression in endothelial cells and fibroblasts. *J Immunol* 158:3285–92
- Fikrig E, Narasimhan S (2006) *Borrelia burgdorferi*-traveling incognito? *Microbes Infect* 8:1390–9
- Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3:710–20
- Garg R, Juncadella JJ, Ramamoorthi N, Ashish, Ananthanarayanan SK, Thomas V et al. (2006) Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *J Immunol* 177:6579–83
- Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, Wesche H, Weis JH, Wooten RM et al. (1999) Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J Immunol* 163:2382–6
- Hovius JW, de Jong MA, den Dunnen J, Litjens M, Fikrig E, van der Poll T et al. (2008) Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog* 4:e31
- Hovius JW, van Dam AP, Fikrig E (2007) Tick-host-pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends Parasitol* 23:434–8
- Lusitani D, Malawista SE, Montgomery RR (2002) *Borrelia burgdorferi* are susceptible to killing by a variety of human polymorphonuclear leukocyte components. *J Infect Dis* 185:797–804
- Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA et al. (2001) Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414:454–7
- Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T et al. (2002) Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 347:1151–60
- Piesman J, Gern L (2004) Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology* 129(Suppl):S191–220
- Pivarsci A, Kemeny L, Dobozy A (2004) Innate immune functions of the keratinocytes. *Acta Microbiol Immunol Hung* 51:303–10
- Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao F, Yang XF, Fish D et al. (2005) The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* 436:573–7
- Schroder JM, Harder J (2006) Antimicrobial skin peptides and proteins. *J Cell Mol Life Sci* 63:469–86
- Sorrell JM, Caplan AI (2004) Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci* 117:667–75
- Steere AC, Glickstein L (2004) Elucidation of Lyme arthritis. *Nat Rev Immunol* 4:143–52
- Werner S, Krieg T, Smola H (2007) Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 127:998–1008
- Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ (2002) Mammalian defensins: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 23:291–5



that additional NO is beneficial only at certain phases in the wound healing cascade, and different wounds may require different NO donors. Infected wounds would be an obvious target for nanoparticle NO (Martinez *et al.*, 2009), whereas other NO donors have exhibited efficacy at healing wounds in diabetic mice. Somewhat counterintuitively, the relatively large number of NO donors shown to improve wound healing seems to have slowed the clinical development of this family of drugs. The ubiquity and simplicity of NO have produced a complex intellectual property environment in which the pharmaceutical industry, the government, and charitable donors are unwilling to fund clinical trials lest they lose the commercial benefits resulting from a successful outcome to a patent holder with a competing claim. One hopes that such concerns will not hinder the clinical development of this promising line of therapies.

#### CONFLICT OF INTEREST

Richard B. Weller has advised a number of companies on the development of NO donors for clinical applications.

#### References

- Fang FC (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Micro* 2:820–32
- Friedman AJ, Han G, Navati MS, Chacko M, Gunther L, Alfieri A *et al.* (2008) Sustained release nitric oxide releasing nanoparticles: characterization of a novel delivery platform based on nitrite containing hydrogel/glass composites. *Nitric Oxide* 19:12–20
- Hardwick JB, Tucker AT, Wilks M, Johnston A, Benjamin N (2001) A novel method for the delivery of nitric oxide therapy to the skin of human subjects using a semi-permeable membrane. *Clin Sci (Lond)* 100:395–400
- Khan F, Pearson RJ, Newton DJ, Belch JJ, Butler AR (2003) Chemical synthesis and microvascular effects of new nitric oxide donors in humans. *Clin Sci (Lond)* 105:577–84
- Lopez-Jaramillo P, Ruano C, Rivera J, Teran E, Salazar-Irigoyen R, Esplugues JV *et al.* (1998) Treatment of cutaneous leishmaniasis with nitric-oxide donor. *Lancet* 351:1176–7
- Luo JD, Chen AF (2005) Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol Sin* 26:259–64
- Martinez LR, Han G, Chacko M, Mihu MR, Jacobson M, Gialanella P *et al.* (2009); Antimicrobial and healing efficacy of sustained release nitric oxide nanoparticles against *Staphylococcus aureus* skin infection. *J Invest Dermatol* 129:2463–9
- Mowbray M, Tan X, Wheatley PS, Morris RE, Weller RB (2008) Topically applied nitric

oxide induces T-lymphocyte infiltration in human skin, but minimal inflammation. *J Invest Dermatol* 128:352–60

Weller R, Finnen MJ (2006) The effects of topical treatment with acidified nitrite on wound healing in normal and diabetic mice. *Nitric Oxide* 15:395–9

Weller R, Price RJ, Ormerod AD, Benjamin N, Leifert

C (2001) Antimicrobial effect of acidified nitrite on dermatophyte fungi, Candida and bacterial skin pathogens. *J Appl Microbiol* 90:648–52

Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, Tzeng E, Lizonova A, Kovesdi I *et al.* (1998) Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* 101:967–71

See related article on pg 2515

## spitting Image: Tick saliva Assists the causative Agent of Lyme Disease in evading Host skin's Innate Immune Response

Joppe W.R. Hovius<sup>1</sup>

**Lyme disease is caused by the spirochete *Borrelia burgdorferi* and is transmitted through ticks. Inhibition of host skin's innate immune response might be instrumental to both tick feeding and *B. burgdorferi* transmission. The article by Marchal *et al.* describes how tick saliva suppresses *B. burgdorferi*-induced antimicrobial peptide production. This inhibition directly facilitates survival of the spirochete and might lead to diminished chemotaxis of leukocytes toward the site of the tick bite.**

*Journal of Investigative Dermatology* (2009) 129, 2337–2339. doi:10.1038/jid.2009.202

first recognized as a distinct clinical entity in 1975 in Old Lyme, Connecticut, in children at the Yale–New Haven Hospital who were initially thought to have juvenile rheumatoid arthritis (Steere *et al.*, 1977). Previously, however, certain clinical signs of the disease had been described in Europe (Afzelius, 1921). *Ixodes scapularis*, *Ixodes ricinus*, and *Ixodes persulcatus* are the most important vectors for Lyme borreliosis in the United States, Europe, and Asia, respectively, and the disease is caused by spirochetes of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato group (Wang *et al.*, 1999). In Europe and Asia, three major *Borrelia* genospecies (*B. burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, and *Borrelia afzelii*) are the causative agents. By contrast, only *B. burgdorferi* sensu stricto strains are present in the United States. The obligate enzootic life cycle of the spi-

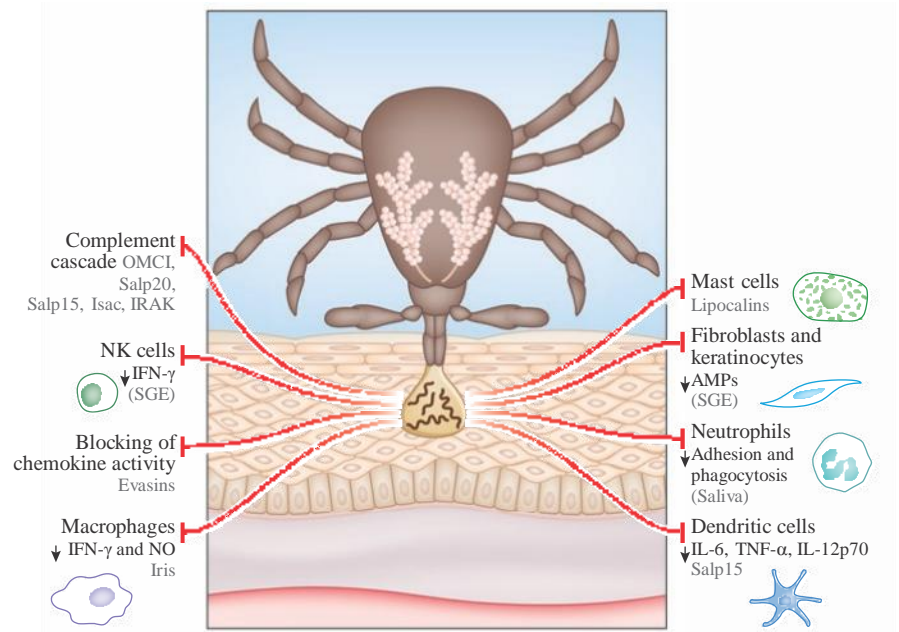
rochetes involves ticks, primarily *Ixodes* ticks, and a variety of vertebrate hosts, including small rodents, large mammals, and birds (Anderson and Magnarelli, 1980). In general, uninfected tick larvae acquire the bacterium by feeding on infected animals. Ticks remain infected during their consecutive molting periods, enabling both nymphal and adult ticks to transmit spirochetes to (larger) animals and humans.

To secure attachment of the tick and to ensure susceptibility of reservoir hosts for future tick infestations, tick saliva contains modulators of host immune responses. During the course of a blood meal, which can take up to seven days, ticks introduce saliva containing a wide range of physiologically active components. Immunosuppressive proteins in tick saliva interfere with

Lyme disease, or Lyme borreliosis, was

<sup>1</sup>Center for Experimental and Molecular Medicine, University of Amsterdam, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

the host's innate and adaptive immune responses (Figure 1), including inhibition of the complement cascade (Ribeiro, 1987); binding of histamine (Mans, 2005); impairment of natural killer cell (Kopecky and Kuthejlova, 1998), dendritic cell (Hovius *et al.*, 2008a), and neutrophil function (Montgomery *et al.*, 2004); reduction in antibody titers (Wikel and Bergman, 1997); repression of production of cytokines such as interleukin (IL)-2, interferon- $\gamma$  (Anguita *et al.*, 2002; Gillespie *et al.*, 2001; Kotsyfakis *et al.*, 2006), IL-4 (Muller-Doblies *et al.*, 2007), and IL-10 (Hannier *et al.*, 2003); blocking of chemokine activity (Deruaz *et al.*, 2008); and inhibition of T-lymphocyte proliferation (Ramachandra and Wikel, 1992). In recent years, many tick proteins with specific functions have been identified (reviewed by Hovius *et al.*, 2008b). Importantly, immunosuppression by tick saliva may result in more efficient transmission of several tick-borne pathogens (Wikel, 1999).



**Figure 1. Inhibition of skin innate immune responses by tick saliva.** During feeding, a tick introduces saliva into the host skin. Tick saliva contains numerous proteins with specific functions. The figure depicts those with immunosuppressive activity affecting host innate immunity. Several specific immunosuppressive functions have been attributed to tick saliva and to salivary gland extract (SGE). Also, as depicted in the figure, several salivary proteins with specific functions have been identified. It should be noted that inhibition of host innate immune responses by tick saliva could be beneficial for both tick attachment and *Borrelia burgdorferi*. For related references, see the text. AMP, antimicrobial peptide; IFN- $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; IL, interleukin; NO, nitric oxide; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ .

### Tick salivary gland extract inhibits antimicrobial peptide production.

For both the tick and the spirochete, it is of paramount importance to inhibit the host innate immune response, the first line of host defense. A crucial part of the innate immune response against invading microorganisms is the complement cascade. Many bacteria, such as *Streptococcus pneumoniae* (Neeleman *et al.*, 1999) and *Neisseria meningitidis* (Ram *et al.*, 1999), have evolved mechanisms to inhibit complement-mediated killing. *B. burgdorferi* utilizes complement regulating-acquiring surface proteins (Kraiczy *et al.*, 2001) and Osp E/F related proteins (Alitalo *et al.*, 2002; Hellwage *et al.*, 2001) to bind factor H or FHL protein and consequently inhibit complement-mediated borreliacidal activity. In addition, several tick salivary proteins have been identified that inhibit different pathways within the

complement cascade (Schroeder *et al.*, 2007; Schuijt *et al.*, 2008; Tyson *et al.*, 2008; Valenzuela *et al.*, 2000).

Innate immune responses also include the family of antimicrobial peptides, an ancient form of host defense found in both plants and animals that possesses bactericidal capacities. Production of antimicrobial peptides at the site of infection—for instance, the skin—also results in chemotaxis of leukocytes. Marchal *et al.* (this issue, 2009) and others demonstrate that *B. burgdorferi* is able to induce the production of several antimicrobial peptides, including human  $\beta$ -defensin-2 and cathelicidin LL-37, in human resident skin cells (fibroblasts and keratinocytes). In addition, they show that a selection of these antimicrobial peptides exhibit transient growth-inhibiting properties against *B. burgdorferi*. Induction of antimicrobial peptides could favor a robust innate immune response at the site of the tick bite, which could not only result in clearance of *B. burgdorferi* but also hamper tick feeding. Interestingly, Marchal and collaborators now demonstrate that salivary gland extract from *Ixodes ricinus* has the capacity to inhibit *B. burgdorferi*-induced antimicrobial peptide production. This would favor *B. burgdorferi* survival and facilitate infection as well as inhibit chemotaxis of leukocytes to the site of the tick bite, thereby making the tick-host-pathogen interface a less hostile environment and

favoring tick attachment to the host.

Identification of novel functions of tick saliva and tick salivary gland extract contributes to the understanding of the pathogenesis of Lyme disease. This may help researchers identify tick saliva proteins that could serve as templates for new pharmacological compounds and could reveal new ways to prevent or treat tick-borne infections such as Lyme disease and other emerging tick-borne infections.

#### CONFLICT OF INTEREST

The author states no conflict of interest.

#### References

- Afzelius A (1921) Erythema chronicum migrans. *Acta Derm Venereol* 2:120–5
- Alitalo A, Meri T, Lankinen H, Seppala I, Lahdenne P, Hefty PS *et al.* (2002) Complement inhibitor

factor H binding to Lyme disease spirochetes is mediated by inducible expression of multiple plasmid-encoded outer surface protein E paralogs. *J Immunol* 169:3847–53

Anderson JF, Magnarelli LA (1980) Vertebrate host relationships and distribution of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) in Connecticut, USA. *J Med Entomol* 17:314–23

Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius JW, Das S, Thomas V, Persinski R *et al.* (2002) Salp15, an ixodes scapularis salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity* 16:849–59

Deruaz M, Frauenschuh A, Alessandri AL, Dias JM, Coelho FM, Russo RC *et al.* (2008) Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *J Exp Med* 205:2019–31

Gillespie RD, Dolan MC, Piesman J, Titus RG (2001). Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *J Immunol* 166:4319–26

Hannier S, Liversidge J, Sternberg JM, Bowman AS (2003). 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* 25:27–37

Hellwage J, Meri T, Heikkila T, Alitalo A, Panelius J, Lahdenne P *et al.* (2001) The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem* 276:8427–35

Hovius JW, de Jong MA, den Dunnen J, Litjens M, Fikrig E, van der PT *et al.* (2008a) Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog* 4:e31

Hovius JW, Levi M, Fikrig E (2008b) Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva. *PLoS Med* 5:e43

Kopecky J, Kuthejllova M (1998) Suppressive effect of Ixodes ricinus salivary gland extract

on mechanisms of natural immunity in vitro.

*Parasite Immunol* 20:169–74

Kotsyfakis M, Sa-Nunes A, Francischetti IM, Mather TN, Andersen JF, Ribeiro JM (2006) Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick Ixodes scapularis. *J Biol Chem* 281:26298–307

Kraiczy P, Skerka C, Kirschfink M, Zipfel PF, Brade V (2001) Mechanism of complement resistance of pathogenic *Borrelia burgdorferi* isolates. *Int Immunopharmacol* 1:393–401

Mans BJ (2005) Tick histamine-binding proteins and related lipocalins: potential as therapeutic agents. *Curr Opin Investig Drugs* 6:1131–5

Marchal CMP, Luft BJ, Yang X, Sibilia J, Jaulhac B, Boulanger NM (2009) Defensin is suppressed by tick salivary gland extract during the *in vitro* interaction of resident skin cells with *Borrelia burgdorferi*. *J Invest Dermatol* 129:2515–7

Montgomery RR, Lusitani D, de Boisfleury CA, Malawista SE (2004) Tick saliva reduces adherence and area of human neutrophils. *Infect Immun* 72:2989–94

Muller-Doblies UU, Maxwell SS, Boppana VD, Mihalyo MA, McSorley SJ, Vella AT *et al.* (2007) Feeding by the tick, Ixodes scapularis, causes CD4(+) T cells responding to cognate antigen to develop the capacity to express IL-4. *Parasite Immunol* 29:485–99

Neeleman C, Geelen SP, Aerts PC, Daha MR, Mollnes TE, Roord JJ *et al.* (1999) Resistance to both complement activation and phagocytosis in type 3 pneumococci is mediated by the binding of complement regulatory protein factor H. *Infect Immun* 67:4517–24

Ram S, Mackinnon FG, Gulati S, McQuillen DP, Vogel U, Frosch M *et al.* (1999) The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Mol Immunol* 36:915–28

Ramachandra RN, Wikel SK (1992) Modulation

## commentary

of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *J Med Entomol* 29:818–26

Ribeiro JM (1987) Ixodes dammini: salivary anti-complement activity. *Exp Parasitol* 64:347–53

Schroeder H, Daix V, Gillet L, Renaud JC, Vanderplasschen A (2007) 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* 9:247–50

Schuijt TJ, Hovius JW, van Burgel ND, Ramamoorthi N, Fikrig E, van Dam AP (2008) Salp15 inhibits the killing of serum sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Infect Immun* 76:2888–94

Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR *et al.* (1977) Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum* 20:7–17

Tyson KR, Elkins C, de Silva AM (2008) A novel mechanism of complement inhibition unmasked by a tick salivary protein that binds to properdin. *J Immunol* 180:3964–8

Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN, Ribeiro JM (2000) Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, Ixodes scapularis. *J Biol Chem* 275:18717–23

Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J (1999) Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 12:633–53

Wikel SK (1999) Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int J Parasitol* 29:851–9

Wikel SK, Bergman D (1997) Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitol Today* 13:383–

# Publication n°2

**Salp15, a tick protein, has an effect on innate immunity of human primary keratinocytes infected with *Borrelia burgdorferi***

Submitted

## II. Salp15, a tick protein, has an effect on innate immunity of human primary keratinocytes infected with *Borrelia burgdorferi*.

Submitted

Nous avons ensuite choisi d'analyser le rôle des KCs dans l'immunité innée de la peau et de définir plus précisément le rôle de ces cellules au cours de leurs interactions avec *B. burgdorferi* ss N40. Les lipoprotéines, OspA et OspC, ont également été testées afin d'évaluer leur rôle dans l'inflammation cutanée. Le rôle de la salive de tique comme facteur immunosuppresseur est également précisé. Salp15, une protéine de la salive de tique incriminée dans différents processus inflammatoires lors de la transmission de *Borrelia* a été testée dans notre modèle (Gillespie et coll., 2001 ; Anguita et coll., 2002 ; Ramamoorthi et coll., 2005 ; Hovius et coll., 2008a). Pour cette étude, nous avons élargi le nombre de molécules inflammatoires étudiées, chimiokines et PAMs, afin de délimiter plus spécifiquement les points d'impacts de la salive au niveau cutané (Publication II). Nous avons montré que les PAMs, hBD-2, hBD-3, LL-37, la psoriasine et la RNase7 sont affectés par la salive de tique et plus particulièrement par Salp15. Dans notre modèle, LL-37 n'est pas induite par les KCs. Son induction n'est observée qu'en présence de la vitamine D3 (Schauber et coll., 2007). De plus, les tests antimicrobiens faits sur *Borrelia* avec hBD-2 et LL-37 n'ont pas montré d'effets bactéricides de ces deux PAMs sur la bactérie. Les PAMs joueraient alors plus un rôle d'alarmines sur la bactérie que de PAMs. La lipoprotéine OspC est un élément clé dans la transmission de *Borrelia*. Nous avons montré qu'OspC induit l'expression des PAMs par les kératinocytes et Salp15, ligand d'OspC, inhibe l'induction de ces PAMs. Ainsi la salive de tique, et notamment Salp15 possède un pouvoir immunomodulateur sur l'expression des PAMs dans les KCs. Ceci permet de créer un environnement favorable au développement et à la dissémination des bactéries.



Salp15, a tick protein, has an immunosuppressive effect on innate immunity of human primary keratinocytes infected with *Borrelia burgdorferi*

Journal:	Journal of Investigative Dermatology
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Boulanger, Nathalie; School of Pharmacy, Parasitology Marchal, Claire; School of Pharmacy, Parasitology Schramm, Frederic; School of medicine, Bacteriology Kern, Aurelie; School of medicine, Bacteriology Luft, Benjamin; StonyBrook university, Infectious diseases Yang, Xiaohua; StonyBrook university, Infectious diseases Hovius, Joppe; University of Amsterdam, Center for Experimental and Molecular Medicine Jaulhac, Benoit; School of medicine, Bacteriology; School of medicine, Bacteriology
Key Words:	innate immunity, borrelia, antimicrobial peptides, tick saliva, alarmin

1  
2  
3 Dear Editor,  
4

5  
6 We would like to submit our manuscript for consideration. It is entitled: Salp15, a tick  
7 protein, has an immunosuppressive effect on innate immunity of human primary  
8 keratinocytes infected with *Borrelia burgdorferi* by Claire Marchal, Frederic Schramm,  
9 Aurélie Kern, Benjamin J. Luft, Xiaohua Yang, Joppe Hovius, Benoît Jaulhac, Nathalie  
10 Boulanger.  
11

12  
13 We feel that this manuscript is particularly suited for Journal of Investigative Dermatology  
14 since it deals with the major role of human keratinocytes during the complex interaction of the  
15 pathogen, the tick vector and the host in the successful establishment of Lyme infection. The  
16 paper is particularly relevant in the field of innate immunity and arthropod borne diseases. We  
17 took the model of Lyme disease to show that proinflammatory molecules such as chemokines  
18 (MCP-1, IL-8) and antimicrobial peptides (AMPs) (cathelicidin, defensins, psoriasin and  
19 RNase7) are induced by human primary keratinocytes co-cultured with *Borrelia burgdorferi*  
20 *sensu stricto*, and its major outer surface protein OspC (Osp: outer surface protein).  
21  
22

23  
24 Recently we published our preliminary findings already in Journal of Investigative  
25 Dermatology (Marchal et al., 2009, in press) that demonstrated markers of keratinocyte  
26 inflammation (IL-8 and HBD-2 secretions) to be inhibited by crude salivary gland extract  
27 (SGE) of *Ixodes ricinus*. In the paper, we have extended these findings to show that a specific  
28 tick derived protein, Salp15, mediates this action. We show a potential new receptor for  
29 Salp15 in addition to CD4 on T cell and DC-SIGN on dendritic cells, the IL-1 receptor on  
30 keratinocytes.  
31  
32

33  
34 We also describe a new effect of tick saliva on skin innate immunity. It has an anti-alarmin  
35 effect by inhibiting the danger signals represented by chemokines and AMPs. Tick saliva  
36 would affect AMPs and chemokines not as antimicrobial molecules but as chemotactic  
37 molecules, active on immune cells. This local inhibition of cellular infiltrate could allow  
38 *Borrelia* to multiply locally before disseminating to the rest of the body as described in figure  
39 6.  
40  
41

42  
43 These findings are important in understanding the pathogenesis of Lyme disease, but  
44 even more importantly, we believe may represent a new paradigm for understanding the very  
45 complex cutaneous interface shared by the pathogen, vector and host for a wide variety of  
46 vector borne diseases.  
47

48 We look forward to hearing from you.  
49

50  
51 Sincerely yours,  
52  
53

54  
55 Nathalie Boulanger  
56  
57  
58  
59  
60

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

Salp15, a tick protein, has an immunosuppressive effect on innate immunity of human primary keratinocytes infected with *Borrelia burgdorferi*

Claire Marchal<sup>1</sup>, Frederic Schramm<sup>1</sup>, Aurélie Kern<sup>1</sup>, Benjamin J. Luft,<sup>2</sup> Xiaohua Yang,<sup>2</sup> Joppe Hovius<sup>3</sup>, Benoît Jaulhac<sup>1#</sup>, Nathalie Boulanger<sup>1\*#</sup>

<sup>1</sup> EA 4438, Physiopathologie et médecine translationnelle des interactions hôtes-bactéries: borréliose de Lyme, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Strasbourg, France.

<sup>2</sup> Stony Brook University, Division of Infectious Diseases, Stony Brook, NY 11794-8153, USA.

<sup>3</sup> Department of Internal Medicine, Center for Experimental and Molecular Medicine (CEMM), Center for Infection and Immunity Amsterdam at the University of Amsterdam (CINIMA), Academic Medical Center, University of Amsterdam, 1105 AZ, Amsterdam, The Netherlands

~~Key words: innate immunity, *Borrelia burgdorferi*, cutaneous inflammation, antimicrobial peptides, keratinocytes, tick saliva, Salp15, alarmins.~~

~~\* Corresponding author: [nathalie.boulanger@pharma.u-strasbg.fr](mailto:nathalie.boulanger@pharma.u-strasbg.fr), phone: 33 3 90 24 41 25, fax: 33 3 90 24 41 51~~

~~# BJ and NB contributed equally to the paper.~~

~~Abbreviations: KCs: keratinocytes, AMPs: antimicrobial peptides, TLR: Toll-like receptor, DCs: dendritic cells; SGE: Salivary gland extract; hBD: human  $\beta$  Defensin; q-RT-PCR: quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction~~



## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

## ABSTRACT

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Tick saliva has potent immunomodulatory properties. In arthropod borne diseases, this effect is largely used by microorganisms to increase their pathogenicity and to evade host immune responses. We here show that in Lyme borreliosis, a secreted protein in tick saliva, Salp15, downregulates *B. burgdorferi*- as well as its major outer surface lipoprotein, OspC-induced production of chemokines (IL-8 and MCP-1) and several antimicrobial peptides (defensins, cathelicidin, psoriasin, RNase 7) by human primary keratinocytes. Interestingly, antimicrobial peptides (AMPs) tested in vitro, transiently, inhibited bacterial motility. We conclude that tick saliva affects the chemotactic properties of chemokines and AMPs on immune cells, inhibiting alarmins (danger signals) secreted by keratinocytes. Inhibition of local immune responses and of cellular migration to the site of the tick bite ensures a favorable environment for *Borrelia*, which allows the bacterium to multiply locally and subsequently disseminate to the target organs including joints, heart, and central nervous system.

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

### INTRODUCTION

The cutaneous interface is a key locus in arthropod-borne diseases (Frischknecht, 2007). The efficiency of pathogen transmission is essential for their survival. We investigated Lyme borreliosis, a zoonosis caused by spirochetes belonging to the *Borrelia burgdorferi* sensu lato group and transmitted by Ixodes ticks as a model to analyze the role of resident cells of the skin in the development of the disease and to study the potential effect of tick saliva on the inflammatory response of human keratinocytes. Lyme borreliosis is wide spread in the Northern hemisphere. According to its geographic distribution, it is associated with different clinical features. In the United States, the main clinical sign is arthritis caused by *B. burgdorferi* sensu stricto, transmitted by *I. scapularis*. In Europe, the disease is transmitted by *I. ricinus* and three major *Borrelia* species have been described responsible for different clinical symptoms: *B. burgdorferi* sensu stricto (arthritic signs), *B. afzelii* (dermatologic signs) and *B. garinii* (neurologic signs) (Steere et al., 2004).

Arthropods are not simple vehicles of pathogens. Saliva from insects and ticks increases the pathogenicity of the microorganisms they transmit. This has been well-documented for sandflies infected with the flagellate parasite, *Leishmania*, and ticks infected with *Borrelia* spp. (Titus et al., 2006). *Borrelia* transmitted during tick bite are much more virulent than *Borrelia* injected directly via a syringe, underscoring the importance of tick saliva in the virulence of the bacteria (Wikel, 1999). As a blood sucking arthropod, the tick stays on its host for a period of 3 to 10 days and therefore must modulate vertebrate host immune responses to avoid rejection (Fikrig and Narasimhan, 2006). Ticks act directly on the host adaptive immunity by down regulating the T cell proliferation (Garg et al., 2006). More recently, studies begun to analyze how ticks act on innate immunity. Different proteins have been identified in tick saliva that inactivate the alternative pathway of the complement or modify the oxidative burst of macrophages (Brossard and Wikel, 2004). A pluripotent protein,

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

Salp15, present in both engorging *I. scapularis* and *I. ricinus* (Hovius et al., 2007) has been identified as a protective protein for *B. burgdorferi*. Salp15 was shown to inhibit T cell proliferation (Anguita et al., 2002), dendritic cell activation (Hovius et al., 2008) and to protect *Borrelia* from complement- and antibody-mediated killing by the host (Ramamoorthi et al., 2005; Hovius et al., 2008). Once ticks start feeding on the vertebrate host, spirochetes present in the gut migrate to the salivary glands and are injected into the vertebrate host, two to three days after tick attachment. During this migration, *Borrelia* are subject to major antigenic modifications (Ohnishi et al., 2001). Before the blood meal, bacteria in ticks mainly produce OspA that functions as a ligand for the tick gut receptor TROSPA (Pal et al., 2004). Once the ticks start to feed, OspA is downregulated, whereas, OspC is upregulated. OspC is essential for *Borrelia* transmission from the tick to the host and for the multiplication and dissemination of *Borrelia* in the vertebrate host (Grimm et al., 2004). These *Borrelia* lipoproteins encompass specific patterns with the capability to stimulate antigen presenting cells (APCs) via Toll-like receptors (TLRs), mainly TLR2 in combination with TLR1 and TLR6 (Guerau-de-Arellano and Huber, 2005; Singh et al., 2006). This interaction leads to the induction of different inflammatory genes such as chemokines, cytokines. Antimicrobial peptides (AMPs) are also an important part of the vertebrate innate immunity (Ganz, 2003; Braff and Gallo, 2006) and play a role in the control of several skin infections (Ong et al., 2002; Schröder and Harder, 2006). We have previously shown that the interaction of *B. burgdorferi* sensu stricto with human primary KCs induces the secretion of the IL-8 chemokine and of the human  $\beta$ -defensin2 (hBD-2). Noteworthy, this secretion was repressed by crude *I. ricinus* salivary gland extract (SGE) (Marchal et al., 2009). In the current study, we analyzed more precisely whether the major surface lipoprotein of *Borrelia*, OspC, might be responsible of KC inflammation. We investigated additional molecules potentially induced during this inflammation and their possible repression by tick SGE and Salp15 protein. We

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

1  
2  
3 describe a potential new receptor for Salp15, the IL1-receptor, where the tick protein might  
4  
5 replace the function of IL-1 receptor antagonist to inhibit KC inflammation. We conclude  
6  
7  
8 from these experiments that the tick saliva could inhibit "alarmin molecules" and chemokines  
9  
10 (Oppenheim et al., 2007) secreted by KCs in the skin, inhibiting cellular signaling and  
11  
12 trafficking, potentially facilitating Borrelia transmission, multiplication and dissemination in  
13  
14  
15 the vertebrate host.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Review Only

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

## RESULTS

Keratinocyte inflammation induced by lipidated outer surface proteins is inhibited by crude salivary gland extract.

We showed previously that *B. burgdorferi* ss, strain N40, induced a strong inflammatory response when co-incubated with human primary KCs. This was inhibited by SGE of *I. ricinus* (Marchal et al., 2009). We then tested whether the major surface antigen of *Borrelia* important for the transmission to the vertebrate host, OspC (Tilly et al., 2006; 2007) could be responsible for this inflammation. Since the lipidated Osp antigens we tested, were from another strain, *B. burgdorferi* ss B31, we first tested whether the two strains of bacteria, the N40 and the B31, behaved similarly in our in vitro assay. Both strains, isolated from ticks, induced the chemokine IL-8 and the AMP, hBD-2 with the same intensity whatever the bacterial concentration tested (Figure 1 a-b). We then tested whether *Borrelia* lipoproteins are responsible of KC inflammation induced by whole bacteria. When inoculated by the tick, *Borrelia* are mainly covered by OspC while OspA is repressed. Two time points were tested for this study since the pro-inflammatory genes studied are induced differently during inflammation. IL-8 has its peak of secretion at 24 hours while hBD-2 is more secreted at 6 hours (Figure 1 c-d). Lipidated OspC (L-Osp) induced a higher inflammatory response than lipidated OspA (L-OspA). Unlipidated OspC exhibited a weaker inflammatory response pointing out that the lipid moiety has an important role in inflammation. The lipid moiety alone, Pam3cys, also induced an inflammation. When co-incubated with lipidated OspC, tick SGE inhibited strongly the KC inflammation, reducing IL-8 and hBD-2 secretions at 24 hours (Figure 1 e-f).

Salp15 inhibits chemokine and AMP expression by human primary keratinocytes co-incubated with whole *Borrelia*

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

Salp15 is a protein of tick saliva which binds OspC to evade immune system (Ramamoorthi et al., 2005). To analyze its involvement in skin inflammation, we co-incubated Salp15 with whole Borrelia and we measured the inhibition of inflammatory gene expression. Salp15 inhibited the mRNA expression of two chemokines, IL-8 and MCP-1 (Figure 2 a-b), but also of the AMPs (hBD-2, hBD-3, psoriasin and RNase7) (Figure 2 c to f). The effect was measured at 6 hours, since AMPs have generally their peak of activity early during inflammation (Marchal et al., 2009). The inflammation induced by *B. burgdorferi* was strongly impaired by the presence of Salp15 whatever the inflammatory genes and at the two Borrelia concentrations tested, 100 Borrelia (100B) for one cell and 10 Borrelia (10B) for one cell. The two protein secretions, IL-8 and hBD-2, were similarly repressed by the presence of Salp15 (Figure 2 g-h).

### Salp15 inhibits chemokine and AMP expression by human primary keratinocytes co-incubated with OspC

The fact that lipidated OspC-induced inflammation is inhibited by crude SGE prompted us to check whether Salp15 in tick saliva could be responsible for the inhibition of KC inflammation induced with OspC. Chemokines (IL-8 and MCP-1) and AMPs (hBD-2, hBD-3, psoriasin and RNase7) were strongly repressed in the presence of Salp15 of *I. ricinus* at the mRNA level (Figure 3 a to f) and also at the protein level, for the two proteins tested, IL-8 and hBD-2 (Figure 3 g-h). The unlipidated OspC as well as the lipid moiety were affected by Salp15 pointing out that both part of OspC, the lipid and protein parts are important for the interaction with Salp15.

The interaction of keratinocytes with IL-1 $\beta$  is affected by both, salivary gland extract and Salp15

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

To measure the role of KCs in the cutaneous inflammation induced by *Borrelia*, we used regularly IL-1 $\beta$  as a positive control of KC activation. IL-1 $\beta$  interacts with a specific IL-1 receptor (O'Neill, 2008) while *Borrelia* and Osp antigens bind to TLR2 (Guerau-de-Arellano and Huber, 2005). Surprisingly, IL-1 $\beta$  activation was also inhibited by tick SGE and Salp15 (Figure 1 e-f, Figure 2, Figure 3). hBD2 was the less affected by this inhibitory effect compared to the other inflammatory genes measured. This suggests that tick saliva targets several major receptors on immune and epithelial cells to totally immunosuppressive the host immunity.

The interaction *Borrelia*-KCs only in the presence of vitamin D3 induces LL-37 that is inhibited in the presence of tick SGE or Salp15

We have previously shown that the interaction of KC with *B. burgdorferi* induces HBD-2, but we did not find the mRNA expression of LL-37. Its regulation seems to be more complex than the other AMPs (Schauber et al., 2007). We then tested whether the addition of vitamin D3 in our assays could allow the detection of LL-37. In the presence of vitamin D3, KCs co-incubated with *Borrelia* or its lipoproteins secreted LL-37 that was further inhibited by tick SGE or Salp15 (Figure 4). Vitamin D3 specifically affected LL-37 induction since the level of IL-8 is not modified in its presence (Figure 4a).

hBD-2 and cathelicidin have a transient effect on the motility of *B. burgdorferi* N40

AMPs have potent antimicrobial activity on a large panel of microorganisms (bacteria, fungi, virus and parasites). We tested the antiborrelial activity of the two AMPs most frequently found in various skin inflammations: the human cathelicidin, LL-37, and the human defensin, hBD-2 (Ganz, 2003; Braff and Gallo, 2006). We performed a kinetic study to measure the effect of AMPs. We observed cultures after 3 hours, 24 hours and 7 days under a dark field

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

1  
2  
3 microscope to investigate the motility, the number and the viability of the spirochetes when  
4  
5 cultured in the presence or absence of AMPs. The effect of the two AMPs was compared to  
6  
7 the antibiotic, amoxicillin. LL-37 alters severely spirochete motility inducing bacterial clumps  
8  
9 mainly after 3 hours of incubation, and at 24 hours (Table 2). Defensin had a very slight effect  
10  
11 at 24 hours. For both AMPs, the effect disappeared after 7 days, since Borrelia were totally  
12  
13 mobile whatever the concentration tested, while amoxicillin entirely killed Borrelia after 7  
14  
15 days up to a concentration of 1.56 µg/ml.  
16  
17  
18  
19  
20  
21

## Salp15 interacts specifically with OspC and inhibits TLR2 activation

22  
23  
24 OspC as a lipoprotein interacts with TLR2. To check the specificity of OspC-Salp15  
25  
26 interaction we used another TLR2 agonist, MALP2. MALP2 induced chemokine (MCP-1 and  
27  
28 IL-8) and AMP (hBD-2, hBD-3, psoriasin and RNase 7) mRNAs as well as IL-8 and hBD-2  
29  
30 proteins (Figure 5). SGE or Salp15 strongly inhibited KC inflammation induced by OspC but  
31  
32 did not inhibit chemokine or AMP production induced by MALP2-TLR2 interaction, further  
33  
34 suggesting that the observed inhibitory effects of KC inflammation are due to a specific  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000



## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

## DISCUSSION

KCs are the resident skin cells of the epidermis. They act as a physical barrier but also as an immune barrier by producing various AMPs, chemokines and cytokines and by detecting pathogens (Braff and Gallo, 2006). They express functional Toll-like receptors (TLRs), except TLR7 and TLR8, that recognize a broad spectrum of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), leading to the activation of the NF-Kappa B pathway. KCs are the main producers of cytokines and chemokines in the skin. Some of those are potent chemoattractants for monocytes, neutrophils, DCs, T cells and NK cells (Lebre, 2007). Their ability to discriminate different stimuli by generating different patterns of antimicrobial molecules makes KCs important immune cells of skin innate immunity (Sørensen et al., 2003). They interact with Langerhans cells that become activated by inflammatory cytokines derived from KCs: Langerhans cell function is then highly influenced by surrounding KCs (Asahina and Tamaki, 2006). We have previously shown that, the interaction of *B. burgdorferi* ss with human primary KCs induced a strong inflammatory response that is inhibited by crude SGE of *I. ricinus*. This pointed out the major role for KCs in an arthropod-borne disease like Lyme borreliosis.

The inhibition of KC inflammation by tick saliva was previously shown to affect IL-8 and hBD-2 secretions (Marchal et al., 2009). We extended the panel of inflammatory molecules studied since the skin expresses various chemokines and AMPs. Chemokines have been shown to play an important role in inflammation induced by Lyme disease (Guerau-de-Arellano and Huber, 2005). Different chemokine binding proteins have been identified in tick saliva (Déruaz et al., 2008; Oliveira et al., 2008). They are neutralized by tick saliva avoiding the recruitment of specific immune cells that would kill inoculated pathogens. In addition to chemokines, we demonstrate that the AMPs, hBD-2, hBD-3, cathelicidin, psoriasin and RNase7, are also affected by tick saliva. We selected RNase7 and psoriasin, because they are

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

1  
2  
3 produced by KCs and they have potent antimicrobial activity, especially on Gram positive  
4  
5 bacteria for RNase 7 and on *E. coli* for psoriasin (Schröder and Harder, 2006). hBD-2 and  
6  
7 hBD-3 are induced differently (Sørensen et al., 2005) and also have different antimicrobial  
8  
9 activity: hBD-2 acts more on Gram negative bacteria, while hBD-3 has a much larger  
10  
11 spectrum of antibacterial activity. Previously, we did not observe the secretion of LL-37 in  
12  
13 our model of interaction KC-Borrelia (Marchal et al., 2009) that was somehow surprising  
14  
15 since LL-37 is involved in numerous cutaneous inflammations (Braff and Gallo, 2006;  
16  
17 Schröder and Harder, 2006). Its induction by Borrelia was only observed when a  
18  
19 preincubation of KCs with vitamin D3 was performed (Schauber et al., 2007). We then  
20  
21 measured the effect of hBD2 and LL-37 on Borrelia to verify whether the bacteria were  
22  
23 affected by these two most described AMPs in skin inflammation. The in vitro assay on  
24  
25 Borrelia revealed no antimicrobial activity of hBD-2 and LL-37 on *B. burgdorferi* ss. Others  
26  
27 have tested the effects of hBD-2 on *Treponema denticola* and showed that hBD-2 had no  
28  
29 activity on this spirochete either (Brissette et al., 2007). LL-37, in our assay, affects  
30  
31 transiently Borrelia motility and numerous clumps of bacteria are observed in the first hours  
32  
33 of incubation but its effect does not last after a week of incubation. AMPs are multifunctional  
34  
35 molecules. They neutralize toxins released by bacteria, they have potent chemotactic activity,  
36  
37 they have angiogenesis properties (Braff and Gallo, 2006; Schröder and Harder, 2006). They  
38  
39 play a central role in several cutaneous inflammations. Their overexpression avoids infections  
40  
41 in psoriasis and their absence explains certain infections in atopic dermatitis (Ong et al.,  
42  
43 2002). Our data revealed a potent antiinflammatory effect of tick saliva on AMPs and  
44  
45 chemokines present in the skin. It is essential that the tick saliva inhibits AMPs. In the host,  
46  
47 their inhibition would avoid cellular infiltrate of immunocompetent cells that would otherwise  
48  
49 neutralize Borrelia. AMPs, also described as alarmins (Yang et al., 2002; Gallo, 2008),  
50  
51 cannot exert their chemotactic properties on immune cells in the presence of tick saliva.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

Another key element in the transmission of *Borrelia* to the vertebrate host is OspC, the major surface antigen of *Borrelia*. Studies with OspC mutant spirochetes showed that this lipoprotein is essential in evasion of the host innate immunity (Ohnishi et al., 2001; Grimm et al., 2004; Tilly et al., 2007). OspC prevents early elimination and promotes dissemination (Xu et al., 2008). We show in this study that OspC is the key element that induces KC inflammation and that its lipid moiety, Pam3Cys, is essential in this inflammation. OspC lipoprotein is a ligand for TLR2 (Singh et al., 2006). Its interaction with the tick saliva protein, Salp15, is specific since the co-incubation with another TLR2 agonist, MALP2 (Schauber et al., 2007), did not inhibit KC inflammation. This is the first demonstration of the recognition of OspC by TLR2 on host resident skin cells. Previous studies mainly used OspA to analyze the involvement of lipoproteins in Lyme cutaneous inflammation (Ebnet et al., 1997; Hirschfeld et al., 1999). As the tick has been shown to down regulate host immunity, facilitating transmission of *B. burgdorferi*, we tested whether crude SGE and Salp15 could inhibit the inflammatory response of KCs. SGE inhibited both inflammations: the one induced by whole *Borrelia* (Marchal et al., 2009) and the one induced by OspC. In tick saliva, Salp15 is a protein specifically induced by *Borrelia* when it enters the tick during the infective blood meal (Ramamoorthi et al., 2005). It is a pluripotent protein: it affects T cell proliferation by binding to the CD4 co-receptor, it inhibits dendritic cell activation by binding to the C-type lectin DC-SIGN, and Salp15 binds to OspC, protecting *Borrelia* from antibody-mediated killing (Anguita et al., 2002; Ramamoorthi et al., 2005; Hovius et al., 2008). We observed for the first time a potential new receptor for Salp15, the IL1-receptor. This receptor belongs to the superfamily of interleukin-1 receptor / Toll-like receptor (O'Neill, 2008). The activity of this receptor is regulated by different antagonists: an extracellular one that is secreted and three intracellular isoforms (Arend and Guthridge, 2000). Salp15 seems to play a similar role

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

than these IL-1 receptor antagonists by inhibiting this specific inflammatory pathway. This preliminary results deserve further investigations.

The tick blood meal lasts for several days. Tick first dilacerates the epidermis, producing an injury. This injury triggers an inflammatory response with an important secretion of chemokines and AMPs. The tick could shut down all the danger signals present in the skin by neutralizing the alarmins, before injecting *Borrelia*. Then, beginning at around day 3 (Hojgaard et al., 2008) the tick inoculates *Borrelia* into the host skin. The bacteria multiply locally before disseminating via the blood to the rest of the body (Figure 6). The effect of tick saliva on chemokines and AMPs would help to explain the absence of cellular infiltrate at the site of a tick bite (Xu et al., 2007; Beaufays et al., 2008). We show that tick saliva has a new property never described so far: it neutralizes AMPs. In Lyme borreliosis, danger signals represented by first the injury then by the bacterial inoculation are likely controlled by tick saliva. It makes the tick saliva a sophisticated regulator of *Borrelia* infection by acting as a powerful anti-alarmin and anti-chemokine effect in the skin (Oppenheim et al., 2007; Gallo, 2008). Tick saliva is therefore an essential actor of the pathogenesis of skin inflammation and this study further confirms that Salp15 is an interesting candidate for an anti-tick vaccine that could prevent *B. burgdorferi* transmission.

## MATERIALS AND METHODS

### Spirochetes

*Borrelia burgdorferi* strain N40 and B31 were cultured in BSK-H medium (Sigma) at 33°C, four days before the assay. Prior to in vitro infection of the cells, bacteria were washed twice by centrifugation for 30 minutes at 5,000 x g at 20°C. Bacteria were used at passage 8.

### *Borrelia* proteins and other inducers

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

The surface proteins, lipidated-OspA and OspC, were cloned and purified from *B. burgdorferi* sensu stricto strain B31 as previously described (Batsford et al., 2004). They were diluted in 20 mM Tris-Cl pH 7.5/0.3% Triton X100. These proteins were used at the concentration of 100 ng/ml. The truncated unlipidated OspA (aa 17-273) and unlipidated OspC (aa 19-210) from B31 strain of *B. burgdorferi* sensu stricto were used at 100 ng/ml. Other inducers included recombinant human IL-1 $\beta$  (R&D) or the lipopeptide Pam<sub>3</sub>Cys-SK $\beta$ KKK (EMC microcollections, Deutschland GmbH), used as positive controls at 20 ng/ml and 10  $\mu$ g/ml respectively. MALP2 (Macrophage-activating lipopeptide from *Mycoplasma fermentans*) was used as an agonist of TLR2 (Axxora, Deutschland GmbH) at the concentration of 200 ng/ml and used according to Schaubert et al. (2007).

## Tick salivary glands and Salp15

*I. ricinus* was originally from a tick colony of Neuchâtel (Switzerland) and was maintained in Strasbourg (France). For tick salivary gland extract (SGE) isolation, adult ticks were allowed to feed on mouse for three days. Collected ticks were first washed in ethanol then in PBS and SG finally dissected in PBS under a light microscope. The SGE was frozen and thawed three times, centrifuged for 10 minutes at 10,000 x g and the supernatant was kept frozen at -80°C until use. After protein determination (Biorad), an equivalent of one tick SG (around 20  $\mu$ g/ml) was used to study its effect on the modulation of inflammation.

Salp15 from *I. ricinus*, cloned and purified from cultured *Drosophila* S2 cells as described by Hovius et al. (2008), was diluted in 20mM NaPO<sub>4</sub>, 3.5 M guanidine pH 7.5. Salp15 was used alone or with lipidated OspC at the concentration of 30  $\mu$ g/ml. When it was used with lipidated OspC, it was pre-incubated for 30 minutes before added to the KCs.

All recombinant proteins were tested by the Limulus assay to check for the presence of endotoxin and were found to contain < 0.3 endotoxin units for each concentration of recombinant protein tested.

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

### Cell culture of keratinocytes and stimulation

Human epidermal KCs (Promocell, Germany) were maintained in KGM2 medium with a calcium concentration of 0.15 mM. To stimulate the cells, KCs were seeded at  $7.5 \times 10^4$  per well in a 24-well plate. At confluence, the calcium concentration was increased to 1.5 mM to induce KC differentiation. Cells were stimulated with different concentrations of *B. burgdorferi* (ratio of 100 or 10 per cell). Recombinant human IL-1 $\beta$  (R&D) was used as positive control of cell stimulation (Liu et al., 2002). KCs were used at passages 3 to 5. For the assay with tick SGE or with Salp15, *B. burgdorferi* were pre-incubated for 30 minutes with the tick compounds at room temperature, the preparation was then transferred on cells and further incubated for 6 and/or 24h. To measure the induction of LL-37, KCs were pre-incubated for 24 hours with 25 nM of vitamin D3 (Cayman chemical, MI, USA) prior to the addition of *B. burgdorferi* or the lipoproteins. Before collecting uninfected or infected cells in Trizol, viability of cells were checked under inverted microscope. No cell mortality was observed whatever the concentration of *Borrelia* tested.

### ELISA

To measure IL-8 and hBD-2 secreted by KCs, ELISA were performed on supernatants of non activated and activated cells. Protocols were based on sandwich techniques as described by the manufacturers: R&D (France) for IL-8 and Preprotech Ec (London, UK) for hBD-2.

### RNA extraction and quantitative real time RT-PCR

Supernatants were removed and KCs were directly suspended in TriZol (Invitrogen) for extraction of total RNA according to the manufacturer's protocol. After treatment with DNase (Ambion), 2  $\mu$ g of total RNA was reverse-transcribed with the Superscript II First strand synthesis system (Invitrogen). Quantitative RT-PCR was done on a LightCycler system 2.0 (Roche, Meylan, France). The primers used were as described in Table1. For

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

quantification of transcript abundance in cells, target gene expression was normalized to the  $\beta$ -actin gene and compared with untreated cells.

## Antimicrobial assay

hBD-2 (Innovagen, Sweden) and LL-37 were selected as the two most representative AMPs of the skin. LL-37 was synthesized by solid phase Fmoc chemistry. The assay was performed according to a modified technique described by Lusitani et al. (2002). Briefly, in vitro culture of *B. burgdorferi* ss, strain N40 was propagated in BSK medium to logarithmic phase and was washed by centrifugation with HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) for 10 minutes at 3,000 x g at 25°C. They were counted under dark field microscopy and resuspended at the concentration of  $5 \times 10^6$  Borrelia/ml. Bacteria were distributed in microtiter plate at the concentration of  $2.5 \times 10^5$ /well. AMPs were resuspended in sterile distilled water and 10  $\mu$ l of serial dilutions were distributed in each well (range 100  $\mu$ M to 0.2  $\mu$ M). The plate was incubated for 3 and 24 hours at 33°C in microtiter plate and Borrelia were then transferred in 3 ml-tubes for an additional week. For each time point of the kinetics, 10  $\mu$ l of bacterial suspension was observed under dark-field microscopy for appreciation of Borrelia motility and number. Amoxicillin (Sigma) was used as positive control with serial dilution from 25  $\mu$ g/ml to 0.05  $\mu$ g/ml.

**Statistics.** Each experiment of cell stimulation with bacteria was carried out at least three times in independent experiments. The results are presented as mean  $\pm$  SD, and are analyzed using the Student's t test. Differences in values are considered significant when  $P < 0.05$ .

For ELISA tests, the data are the mean  $\pm$  SD of triplicate values and are representative of three independent experiments. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*  $P < 0.05$ . For q RT-PCR the values are normalized to the negative control (medium alone) and are shown as fold increase. The mean  $\pm$  SD of three experiments values are compared between stimulated and non stimulated cells. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*  $P < 0.05$ .

1 Borrelia-Salp15 and skin innate immunity  
2

3 CONFLICT OF INTEREST  
4

5 The authors state no conflict of interest.  
6  
7

8  
9  
10 ACKNOWLEDGEMENTS.  
11

12 We thank Prof. B. Betschart and L. Gern, University of Neuchâtel, for their help to maintain  
13 the tick colony, Dr. MH Metz-Boutigue for LL-37 synthesis and the REID (Réseau des  
14 Interactions Durables) network on ticks for their stimulating discussions. Claire Marchal is  
15 supported by a grant #07/908/225 from the Conseil Regional d'Alsace.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

## REFERENCES

Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius JWR, Das S, et al. (2002) Salp15, an Ixodes scapularis salivary protein, inhibits CD4+ T Cell activation. *Immunity* 16:849-859.

Arend WP, Guthridge CJ (2000) Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms.

*Ann Rheum Dis* 59 Suppl 1:i60-4.

Asahina A, Tamaki K (2006) Role of Langerhans cells in cutaneous protective immunity: is the reappraisal necessary? *J Dermatol Sci* 44:1-9.

Batsford S, Dunn J, Mihatsch M (2004) Outer surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* vary in their ability to induce experimental joint injury. *Arthritis Rheum* 50:2360-2369.

Beaufays J, Adam B, Menten-Dedoyart C, et al. (2008) Ir-LBP, an Ixodes ricinus tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function. *PLoS ONE* 3:e3987.

Braff MH, Gallo RL (2006) Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Curr Top Microbiol Immunol* 306:91-110.

Brissette CA, Lukehart SA (2007) Mechanisms of decreased susceptibility to beta-defensins by *Treponema denticola*. *Infect Immun* 75:2307-2315.

Brossard M, Wikel SK (2004) Tick immunobiology. *Parasitology* 129 Suppl:S161-17.

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

Chong KT, Xiang L, Wang X, Jun EL, Xi LF, Schweinfurth JM (2006) High level expression of human epithelial beta-defensins (hBD-1, 2 and 3) in papillomavirus induced lesions. Virol J 3:75-80.

Déruaz M, Frauenschuh A, Alessandri AL, et al. (2008) Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. J Exp Med 205:2019-2031.

Ebnet K, Brown KD, Siebling UK, Simon MM, Shaw S (1997) Borrelia burgdorferi activates nuclear factor  $\kappa$ B and is a potent inducer of chemokine and adhesion molecule gene expression in endothelial cells and fibroblasts. J Immunol 158:3285-3292.

Fikrig E, Narasimhan S (2006) Borrelia burgdorferi- travelling incognito? Microbes and infection 8:1390-1399.

Frischknecht F (2007) The skin as interface in the transmission of arthropod-borne pathogens. Cell Microbiol 9:1630-1640.

Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stahle-Backdahl M, Liden S, Wigzell H, et al (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. J Biol Chem 272: 15258-15263.

Gallo RL (2008) Sounding the alarm: multiple functions of host defense peptides. J Invest Dermatol 128:5-6.

1 Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

2  
3 Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Rev Immunol  
4  
5 3:710-720.  
6

7  
8  
9  
10 Garg R, Juncadella IJ, Ramamoorthi N, et al. (2006) Cutting edge: CD4 is the receptor for the  
11  
12 tick saliva immunosuppressor, Salp15. J Immunol 177:6579-6583.  
13  
14

15  
16  
17 Gläser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (2005) Antimicrobial  
18  
19 psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection. Nat Immunol 6:57-  
20  
21 64.  
22  
23

24  
25  
26  
27 Grimm D, Tilly K, Stewart PE, et al. (2004) Outer-surface protein C of the Lyme disease  
28  
29 spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. Proc Natl Acad Sci USA  
30  
31 101:3142-3147.  
32  
33

34  
35  
36 Guerau-de-Arellano M, Huber BT (2005) Chemokines and Toll-like receptors in Lyme  
37  
38 disease pathogenesis. Trends Mol Med 11:114-120.  
39  
40

41  
42  
43 Harder J, Schroder JM (2002) RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein  
44  
45 of healthy human skin. J Biol Chem 277:46779-46784.  
46  
47

48  
49  
50 Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, Wesche H, Weis JH, Wooten RM, Weis JJ  
51  
52 (1999) Cutting edge: inflammatory signaling by Borrelia burgdorferi lipoproteins is mediated  
53  
54 by toll-like receptor 2. J Immunol 163:2382-2386.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

Hojgaard A, Eisen RJ, Piesman J (2008) Transmission dynamics of *Borrelia burgdorferi* s.s. during the key third day of feeding by nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 45:732-736.

Hovius JW, Ramamoorthi N, Van't Veer C, et al. (2007) Identification of Salp15 homologues in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis*; 7:296-303.

Hovius JW, de Jong MA, den Dunnen J, et al. (2008)a Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog* 4:e31.

Hovius JW, Schuijt TJ, de Groot KA et al. (2008b) Preferential protection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by a Salp15 homologue in *Ixodes ricinus* saliva. *J Infect Dis* 198:1189-1197.

Lebre MC, van der Aar AM, van Baarsen L, van Capel TM, Schuitemaker JH, Kapsenberg ML et al. (2007). Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* 127:331-341.

Liu AY, Destoumieux D, Wong AV, Park CH, Valore EV, Liu L, Ganz T (2002) Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol* 118: 275-281.

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

1  
2  
3 Lusitani D, Malawista SE, Montgomery RR (2002) *Borrelia burgdorferi* are susceptible to  
4 killing by a variety of human polymorphonuclear leukocyte components. *J Infect Dis*  
5  
6 185:797-804.  
7  
8

9  
10  
11  
12 Marchal C, Luft B, Yang X, Sibilica J, Jaulhac B, Boulanger N (2009) Defensin is suppressed  
13 by tick salivary gland extract during the in vitro interaction of resident skin cells with *Borrelia*  
14  
15 *burgdorferi*. *J Invest Derm*; in press.  
16  
17

18  
19  
20  
21  
22  
23  
24 O'Neill LA (2008) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of  
25  
26 progress. *Immunol Rev* 226:10-18.  
27  
28

29  
30  
31  
32  
33 Ohnishi J, Piesman J, de Silva A (2001) Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia*  
34  
35 *burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:670-675.  
36  
37

38  
39  
40 Oliveira CJ, Cavassani KA, Moré DD, Garlet GP, Aliberti JC, Silva JS et al. (2008) Tick  
41 saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1alpha and selectively impairs chemotaxis of  
42  
43 immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. *Int J Parasitol* 38:705-716.  
44  
45

46  
47  
48  
49 Ong PY, Ohtake T, Brandt C, et al. (2002) Endogenous antimicrobial peptides and skin  
50  
51 infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 347:1151-1160.  
52  
53

54  
55  
56 Oppenheim JJ, Tewary P, de la Rosa G, Yang D (2007) Alarmins initiate host defense. *Adv*  
57  
58 *Exp Med Biol* 601:185-194.  
59  
60

1 Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

2  
3 Pal U, Li X, Wang T, et al. (2004) TROSPA, an Ixodes scapularis receptor for Borrelia  
4 burgdorferi. Cell 119:457-468.  
5  
6

7  
8  
9  
10 Ramamoorthi N, Narasihan S, Pal U, et al. (2005) The Lyme disease agent exploits a tick  
11 protein to infect the mammalian host. Nature 436:573-577.  
12  
13

14  
15  
16  
17 Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, et al. (2007) Injury enhances TLR2 function and  
18 antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. J Clin Invest  
19 117:803-811.  
20  
21  
22  
23

24  
25  
26  
27 Schröder JM, Harder J (2006) Antimicrobial skin peptides and proteins. Cell Mol Life Sci  
28 63:469-486.  
29  
30

31  
32  
33  
34 Seo SJ, Ahn SW, Hong CK, Ro BI (2001) Expression of Beta defensins in human  
35 keratinocyte cell lines. J Dermatol Sc 27:183-191.  
36  
37

38  
39  
40  
41 Singh SK, Girschick HJ (2006) Toll-like receptors in Borrelia burgdorferi-induced  
42 inflammation. Clin Microbiol Infect 12:705-717.  
43  
44  
45

46  
47  
48 Sørensen OE, Cowland JB, Theilgaard-Mönch K, Liu L, Ganz T, Borregaard N (2003)  
49 Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human  
50 keratinocytes, a consequence of common growth factors. J Immunol 170:5583-5589.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

1  
2  
3 Sørensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T (2005) Differential  
4 regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol*  
5  
6 174:4870-4879.  
7  
8

9  
10  
11  
12 Steere AC, Coburn J, Glickstein L (2004) The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest*  
13  
14 113:1093-1101.  
15  
16

17  
18  
19 Tilly K, Krum JG, Bestor A, et al. (2006) *Borrelia burgdorferi* OspC protein required  
20  
21 exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. *Infect Immun* 74: 3554-3564.  
22  
23  
24

25  
26  
27 Tilly K, Bestor A, Jewett MW, Rosa P (2007) Rapid clearance of Lyme disease spirochetes  
28  
29 lacking OspC from skin. *Infect Immun* 75:1517-1519.  
30  
31

32  
33  
34 Titus RG, Bishop JV, Mejia JS (2006) The immunomodulatory factors of arthropod saliva  
35  
36 and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission.  
37  
38 *Parasite Immunol* 28:131-141.  
39  
40

41  
42  
43 Wikel SK (1999) Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen  
44  
45 transmission. *Int J Parasitol* 29:851-859.  
46  
47  
48

49  
50  
51 Xu Q, Seemanapalli SV, Reif KE, Brown CR, Liang FT (2007) Increasing the recruitment of  
52  
53 neutrophils to the site of infection dramatically attenuates *Borrelia burgdorferi* infectivity. *J*  
54  
55 *Immunol* 178:5109-5115.  
56  
57  
58  
59  
60

1 Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

2  
3 Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ (2002) Mammalian defensins in immunity:  
4  
5 more than just microbicidal. Trends Immunol 23:291-296.  
6  
7

8  
9  
10  
11 Zhao Z, McCloud B, Fleming R, Klempner MS (2007) Borrelia burgdorferi-induced  
12  
13 monocyte chemoattractant protein-1 production in vivo and in vitro. Biochem Biophys Res  
14  
15 Commun 358:528-5233.  
16  
17

18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Review Only



## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

Actin	F 5' CGT CAC CAA CTG GGA CGA CA 3' R 5' GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA 3'	
Cathelicidin B	F 5' CTA GAG GGA GGC AGA CA 3' R 5' GCG GTA GAG GTT AGC AT 3'	Frohnm et al., 1997
hBD-2	F 5' ATC TCC TCT TCT CGT TCC TC 3' R 5' ACC TTC TAG GGC AAA AGA CT3'	Seo et al., 2001
hBD-3	F 5' CTT CTG TTT GCT TTG CTC TTC C 3' R 5' CCT CTG ACT CTG CAA TAA TA 3'	Chong et al., 2006
Psoriasin	R 5' AGA CGT GAT GAC AAG ATT GAC-3' F 5' TGT CCT TTT TCT CAA AGA CGT C-3'	Glaeser et al., 2005
RNase 7	R 5' GGA GTC ACA GCA CGA AGA CCA-3' F 5' CAT GGC TGA GTT GCA TGC TTG-3'	Harder and Schroeder, 2002
IL-8	F 5' TCT GCA GCT CTG TGT GAA GGT GCA GTT 3' R 5' AAC CCT CTG CAC CCA GTT TTC CTT 3'	
MCP-1	F 5' CGC CTC CAG CAT GAA AGT CT 3' R 5' GGA ATG AAG GTG GCT GCT ATG 3'	Zhao et al., 2007

Table 1

Review Only

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

Antibiotic conc µg/ml	Amoxicillin			AMP conc µM	Defensin : hBD-2			Cathelicidin : LL 37		
	3h	24h	7d		3h	24h	7d	3h	24h	7d
25	100%	75%	0	100	100%	80%	100%	10%	10%	100%
12.5	100%	75%	0	50	100%	90%	100%	10%	10%	100%
6.25	100%	75%	0	25	100%	100%	100%	25%	10%	100%
3.13	100%	75%	0	12.5	100%	100%	100%	25%	50%	100%
1.56	100%	100%	0	6.25	100%	100%	100%	25%	80%	100%
0.78	100%	100%	100%	3.13	100%	100%	100%	25%	100%	100%
0.4	100%	100%	100%	1.56	100%	100%	100%	50%	100%	100%
0.2	100%	100%	100%	0.78	100%	100%	100%	80%	100%	100%
0.1	100%	100%	100%	0.4	100%	100%	100%	90%	100%	100%
0.05	100%	100%	100%	0.2	100%	100%	100%	90%	100%	100%

Table 2

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

Table1: List of the primers used for the quantitative RT-PCR

Table2: Antimicrobial assay.

Measure of the antimicrobial activity of hBD-2 (defensin) and LL-37 (human cathelicidin) on the motility of *B. burgdorferi*, strain N40. The antibiotic, amoxicillin, was used as positive control. For 3 and 24 hours, *Borrelia* were cultured with the molecule in microtiter plate, then transferred in 3 ml-tubes for an additional 7 days. Motility and number of bacteria were appreciated by observation of *Borrelia* under dark field microscopy.

Figure 1: Interaction of *Borrelia* with human primary keratinocytes. The secretion of proteins, the chemokine, IL-8 and the AMP, hBD-2 was measured by ELISA.

(a and b): Comparison of the inflammatory response of KCs induced by whole bacteria *B. burgdorferi*, strain N 40 and B31, for 24 hours. Titration of *Borrelia*: 100B: 100 *Borrelia* for one cell, 10B: 10 *Borrelia* for one cell and 1B: 1 *Borrelia* for one cell. (c and d): Inflammatory response of KCs stimulated with lipidated (L) OspC and OspA, unlipidated (U) OspC and OspA for 6 and 24 hours at the concentration of 100 ng/ml. (e and f): Inhibition of the inflammation induced by the lipoproteins by crude salivary gland extract (SG) of *I. ricinus* (20 µg/ml) and measured at 24 hours. #: indicates a complete inhibition. IL-1β is the positive control for KC inflammation. ∅ : unstimulated cells.

Figure 2: Inhibition of KC inflammation induced by *B. burgdorferi* ss, strain N40 by Salp15 of *I. ricinus* at 6 hours. Measure by quantitative RT-PCR of the inhibition of mRNA of selected chemokines, MCP-1 (a) and IL-8 (b) and AMPs, hBD-2 (c), hBD-3 (d), RNase7 (e) and psoriasin (f) by Salp15 (30 µg/ml). Measure of the secretion of two selected inflammatory molecules by ELISA, IL-8 (g) and hBD-2 (h). 100B: 100 *Borrelia* for one cell,

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

10B: 10 Borrelia. #: indicates a complete inhibition. IL-1 $\beta$  is the positive control for KC inflammation.  $\emptyset$  : unstimulated cells.

Figure 3: Inhibition of KC inflammation induced by Borrelia lipoproteins at 6 hours by Salp15 of *I. ricinus*. Measure by quantitative RT-PCR of the inhibition of mRNAs of selected chemokines, MCP-1 (a) and IL-8 (b) and AMPs, hBD-2 (c), hBD-3 (d), RNase7 (e) and psoriasin (f). Measure of the secretion of two selected inflammatory molecules by ELISA, IL-8 (g) and hBD-2 (h). Lipidated (L) and unlipidated (U) OspC proteins were tested at 100 ng/ml, Pam3Cys at 10  $\mu$ g/ml and Salp15 at 30  $\mu$ g/ml. #: indicates a complete inhibition. IL-1 $\beta$  is the positive control for KC inflammation.  $\emptyset$  : unstimulated cells.

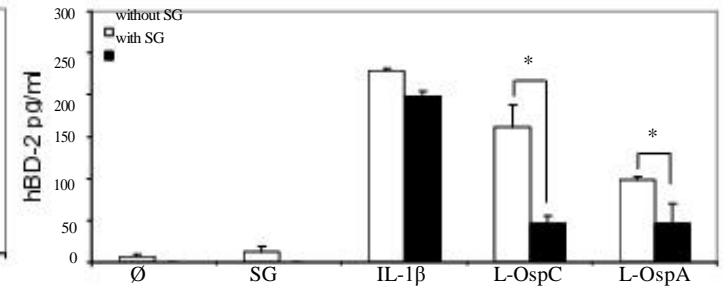
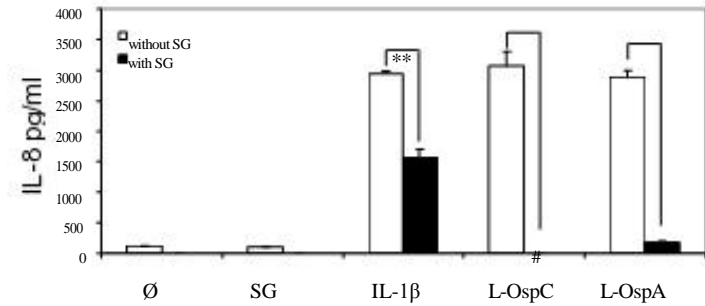
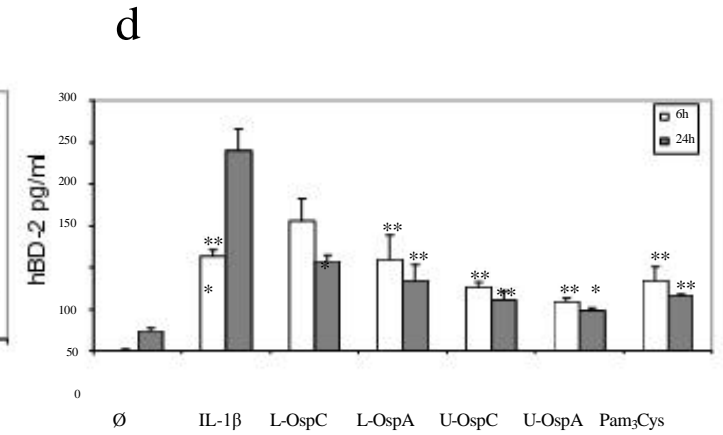
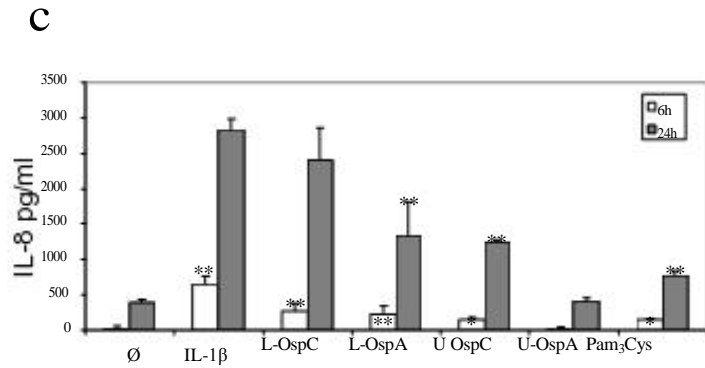
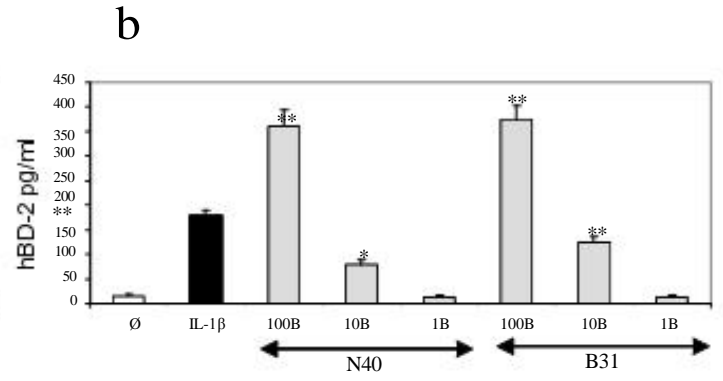
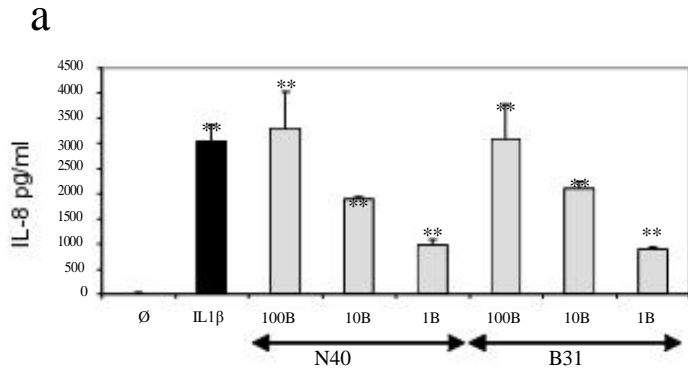
Figure 4: Effect of vitamin D3 on the induction LL-37 secreted by KCs. Human primary KCs were pre-incubated with Vitamin D3 for 24 hours. Cells were then stimulated with Borrelia at two concentrations: 100 Borrelia for one cell (100B) and 10 Borrelia for one cell (10B). IL-8 was measured by ELISA to check for appropriate activation of cells (a) and the induction of LL-37 was measured by Q-RT-PCR (b). The inhibition of IL-8 secretion and LL-37 induction by KCs with crude extract salivary gland (SG) or with Salp15 was then measured (c-d).

Figure 5: Measure of the specificity of the interaction OspC-Salp15. Human primary KCs were incubated for 6 hours with Borrelia and two TLR-2 agonists, OspC and MALP2: whole Borrelia (100B: 100 Borrelia for one cell), lipidated OspC (L-OspC: 100 ng/ml) and MALP2 (200 ng/ml). The inflammation was then inhibited by salivary gland extract (SG: 20  $\mu$ g/ml) or Salp15 (30  $\mu$ g/ml).  $\emptyset$  : unstimulated cells. \*: means statistically significant versus 100B and § : means statistically significant versus L-OspC

## Borrelia-Salp15 and skin innate immunity

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

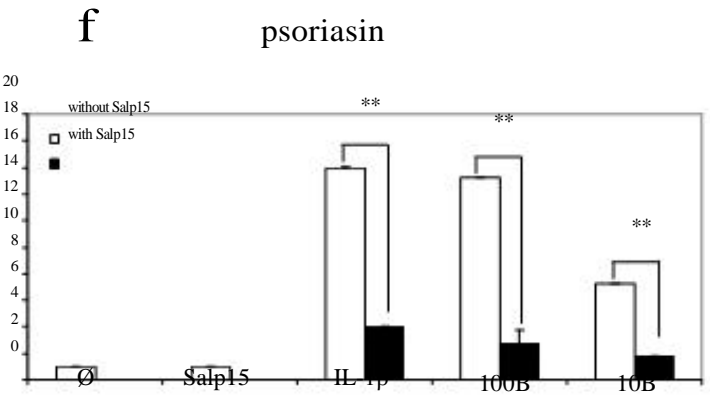
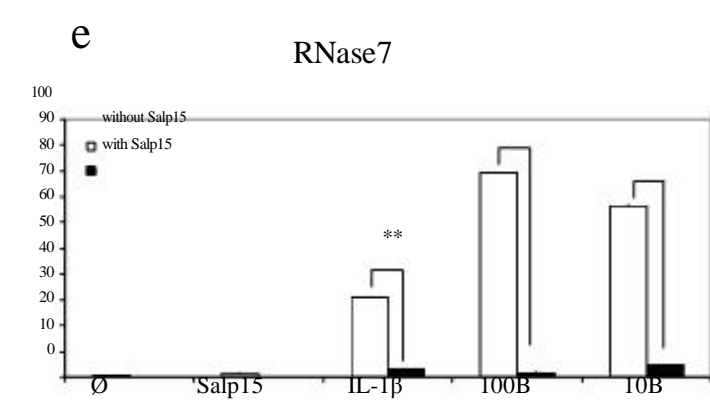
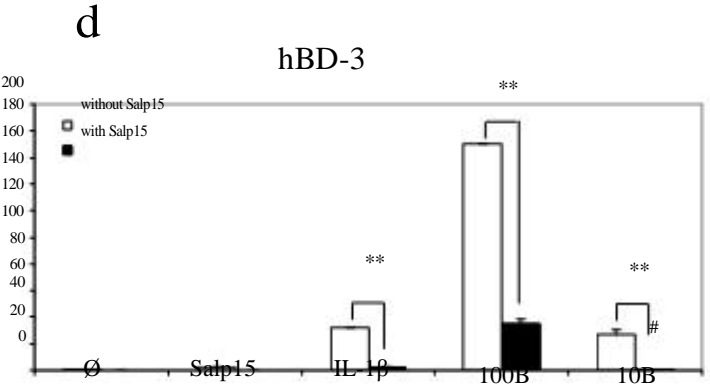
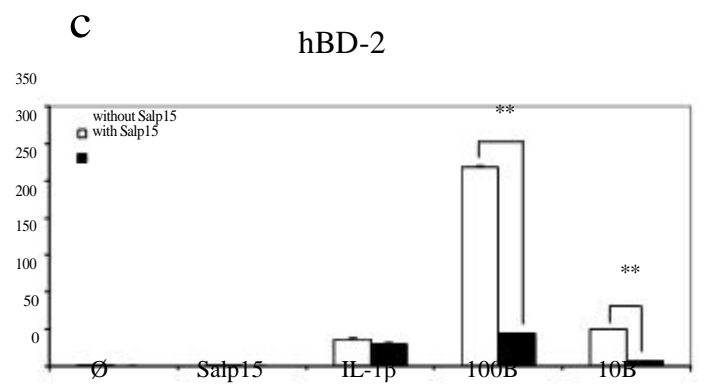
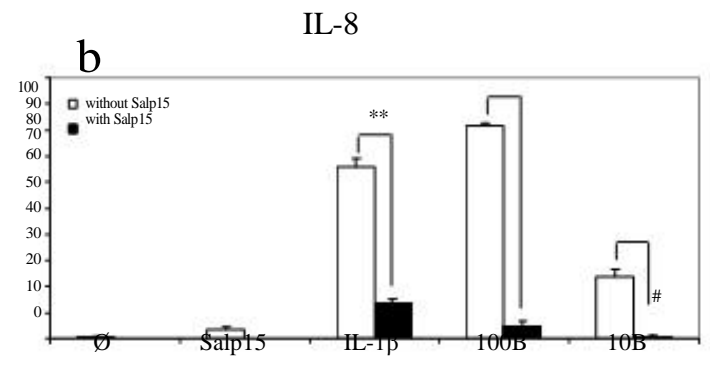
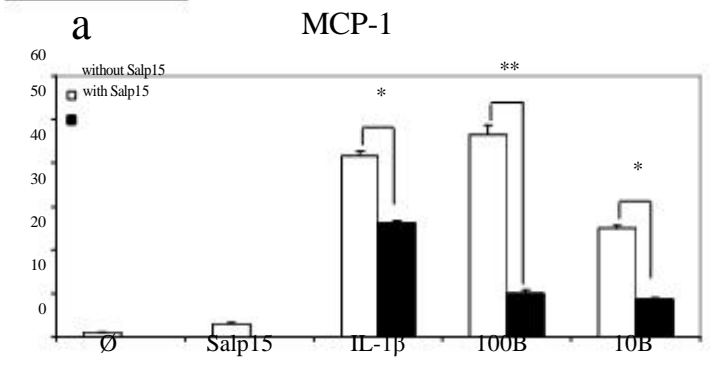
Figure 6: Role of KCs in the transmission of Lyme disease. 1- A skin injury is induced by the tick that damages KC epithelial layer the two first days of the infectious tick bite. Consequently, KCs express various proinflammatory molecules (IL-8, MCP-1, defensins, LL-37, psoriasin, RNase 7...). These Danger associated molecular patterns (DAMPs) would chemoattract immune cells on the site of inflammation by CCR6, FPRL-1 and other receptors. The tick saliva neutralizes these DAMPs. 2. Injection of Borrelia: this inhibition of the skin inflammatory response allows in a second step, corresponding to the second phase of the infective blood meal, the injection of Borrelia. They can then multiply locally before disseminating by the blood to various organs: joint, heart, nervous system.



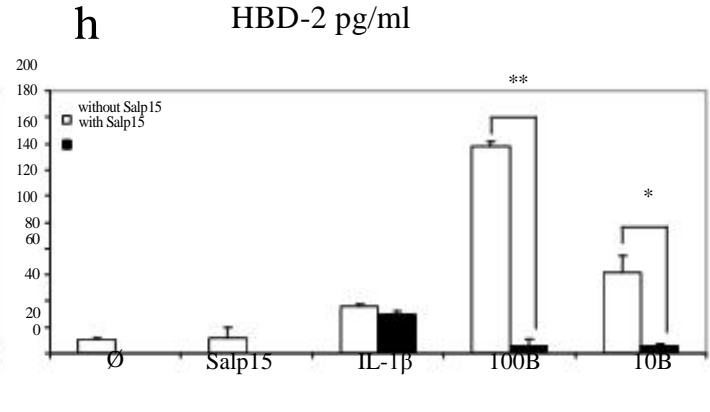
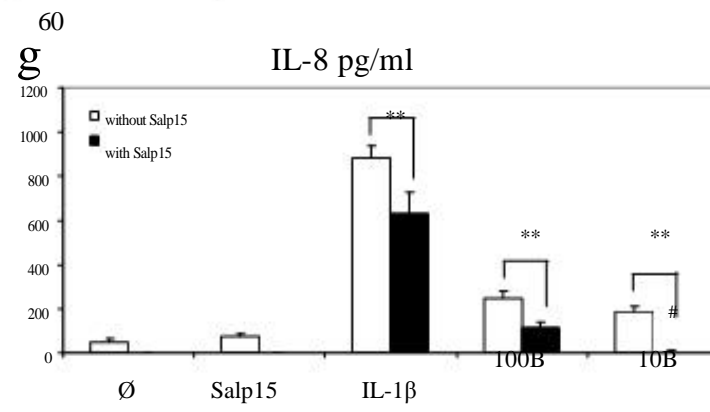
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59

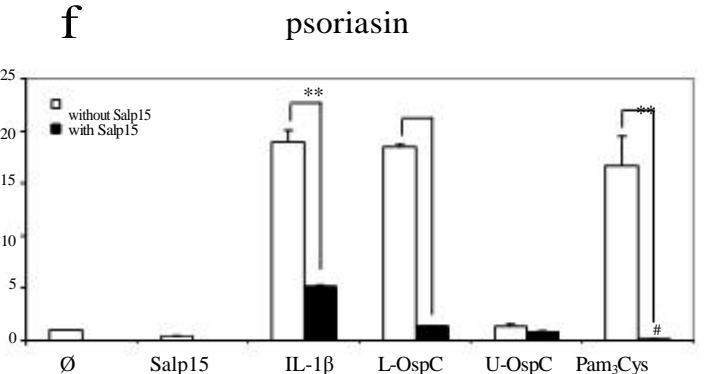
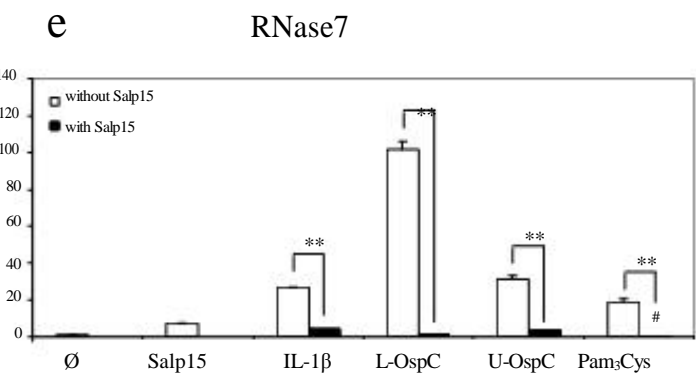
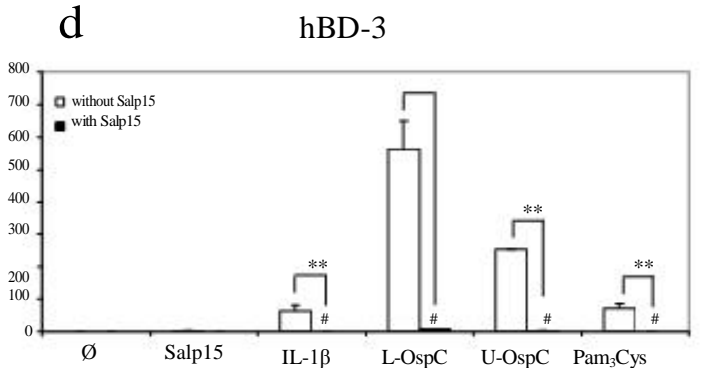
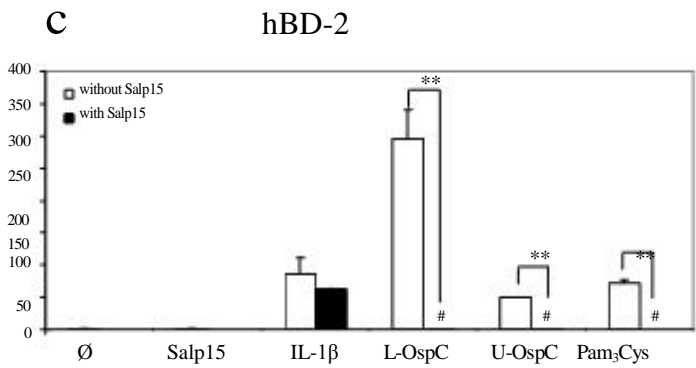
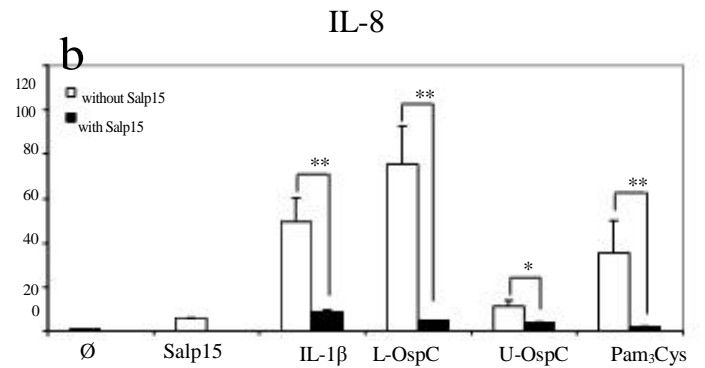
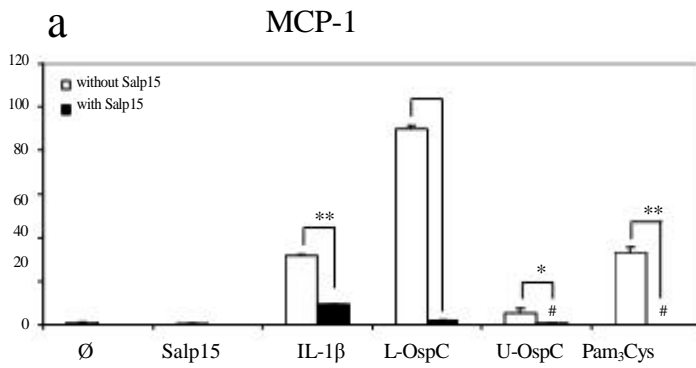
mRNA



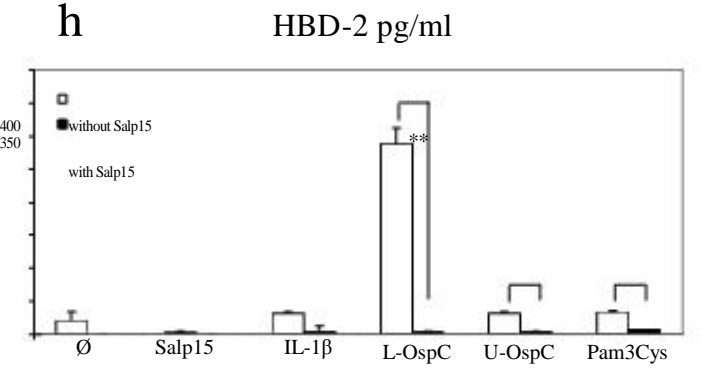
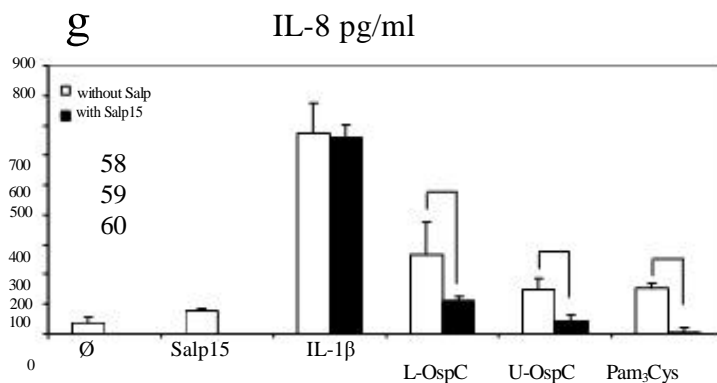
proteins



mRNA



proteins





1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58

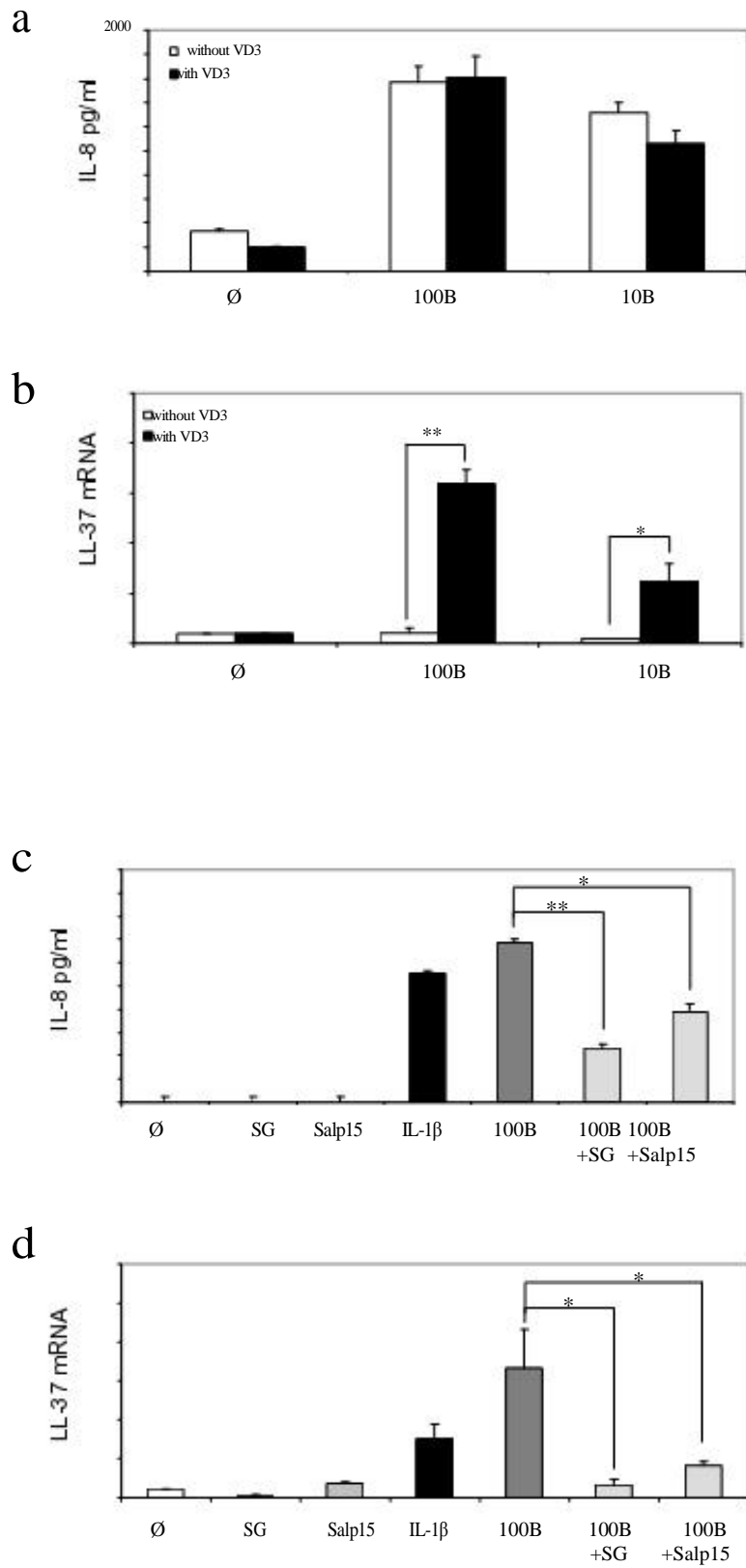
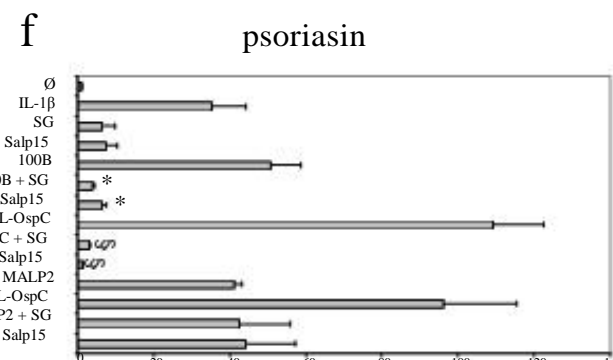
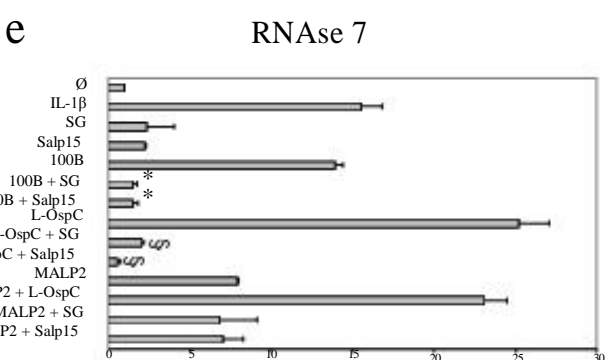
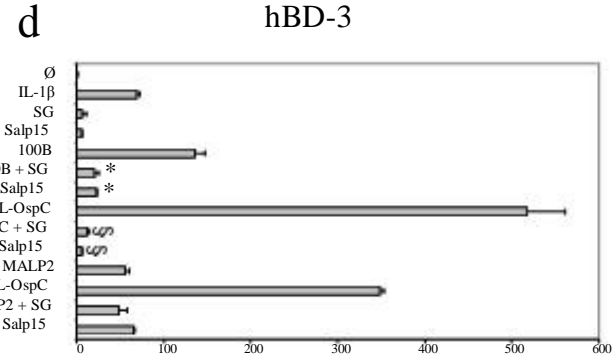
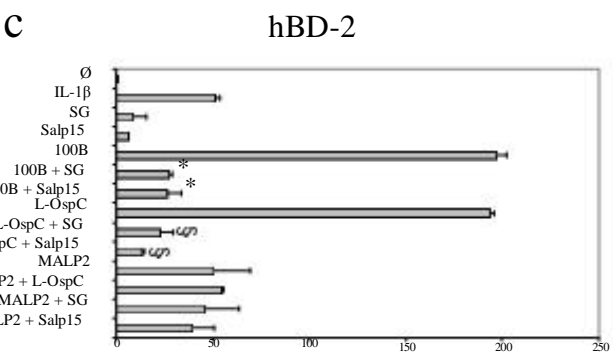
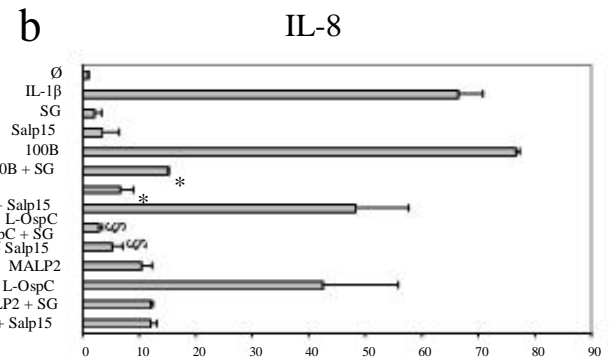
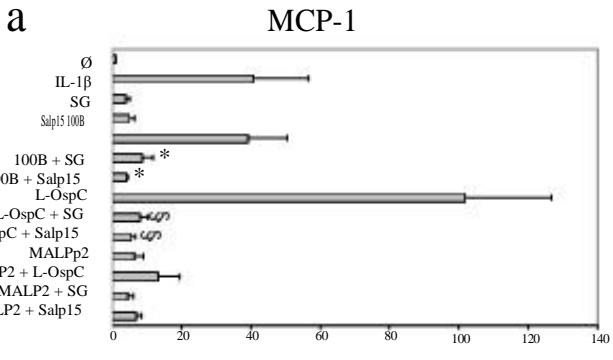
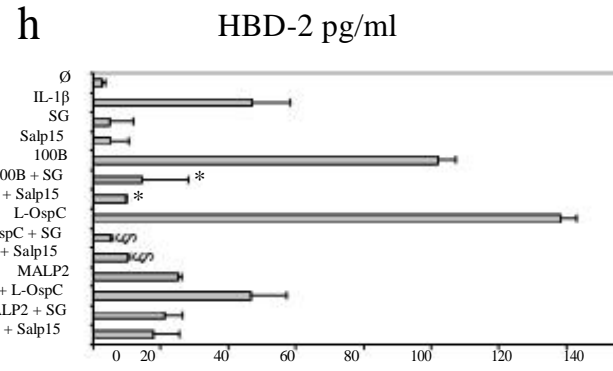
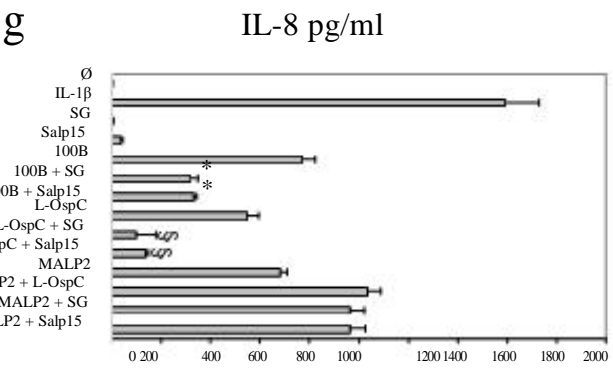


Figure 4

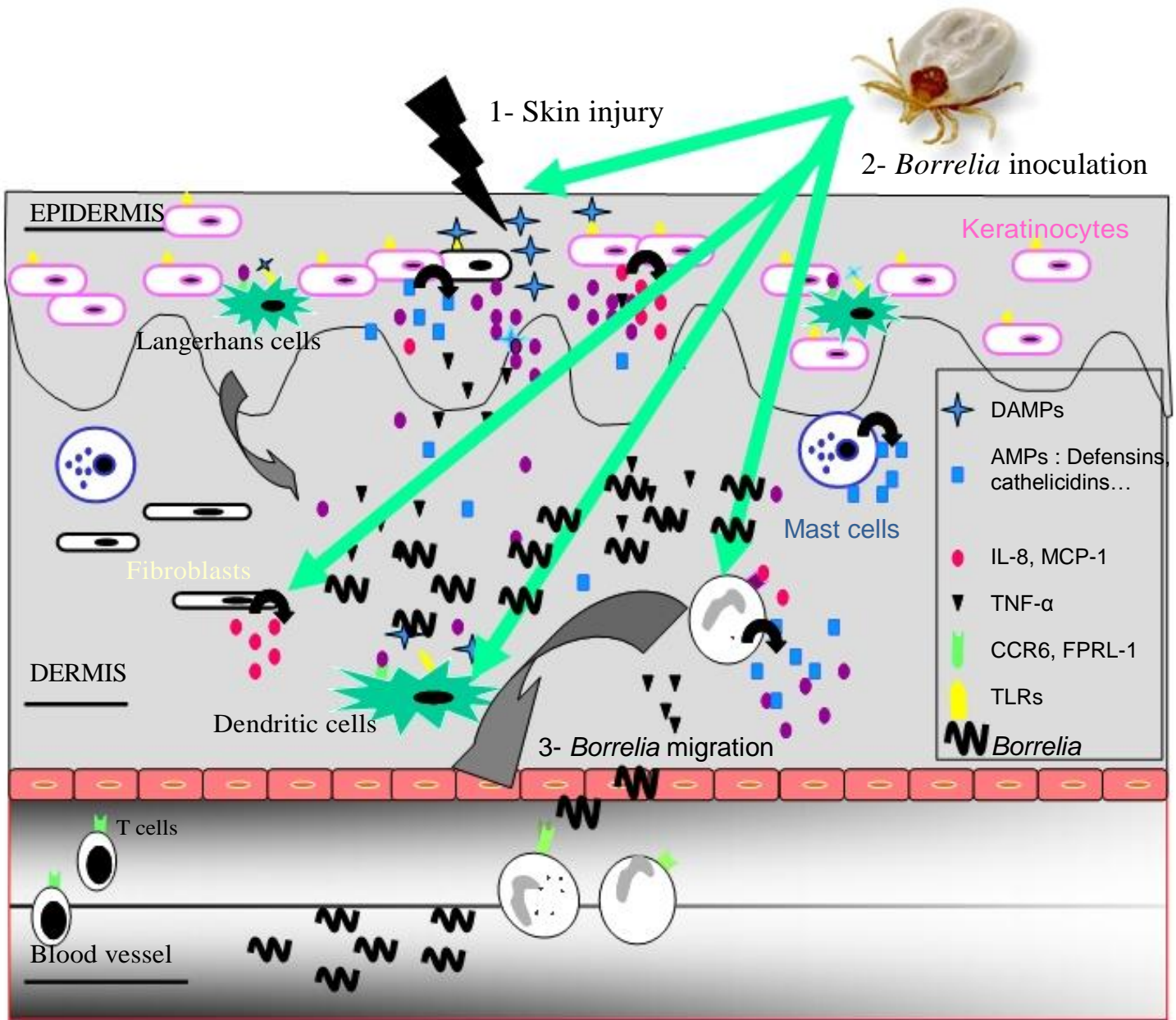
mRNA



proteins



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59



# Publication n°3

**Etude du rôle des interactions KCs/ FBs  
dans l'inflammation cutanée induite par  
*B. burgdorferi* ss N40**

En préparation

### **III. Etude du rôle des interactions KCS/ FBs dans l'inflammation cutanée induite par *B. burgdorferi* ss N40**

En préparation

Dans la première publication, nous avons présenté les premiers résultats montrant la réactivité des FBS vis-à-vis de *Borrelia*. Les FBs se trouvent dans une couche plus profonde de la peau, le derme. Il est établi que les KCs et les FBs coopèrent dans l'inflammation cutanée (Werner et coll., 2007) et modifient l'expression d'un certain nombre de molécules nécessaires dans le remodelage de la peau. Nous avons donc approfondi l'étude du rôle éventuel des FBs dans la phase primaire de la borréliose de Lyme, d'autant plus que peu d'études existent dans la littérature sur l'interaction FBs-*Borrelia* (Jones et coll., 1994 ; Ebnet et coll., 1997 ; Zhao et coll., 2003 ; Zhao et coll., 2007). Nous avons montré que les FBs induisent l'expression de certaines MMPs comme MMP-3, -9, -14 et -19 lorsque ceux-ci sont stimulés par *Borrelia*. Lors d'une étude par transfert de surnageants, nous avons étudié la coopération cellulaire entre les KCs et les FBs. Ainsi le transfert de surnageants de KCs activés par *B. burgdorferi* ss N40 sur des FBs induit une augmentation de l'expression des MMPs ainsi que de MCP-1 et une diminution de l'expression du collagène. Le PAM LL-37, par contre, ne subit pas de modification lors du transfert de surnageants.

Ainsi nous avons montré dans cette étude qu'il y a une coopération entre KCs et FBs lors de la borréliose de Lyme. Cette coopération permet l'expression notamment de MMPs nécessaires à *Borrelia* et sa dissémination.

## 1. Introduction

*B. burgdorferi*, l'agent de la maladie de Lyme, induit chez l'homme non seulement des lésions au niveau de la peau (érythème migrant) mais aussi des méningites, des atteintes cardiaques et des arthrites (Burgdorfer et coll., 1982 ; Steere et coll., 1989 ; Brehmer-Andersson et coll., 1998). Pour établir ces manifestations disséminées de l'infection, les spirochètes se propagent dans la peau, puis passent dans la circulation sanguine pour coloniser ensuite différents organes. La dissémination de *Borrelia* nécessite la rupture des barrières cellulaires et la digestion de la matrice extracellulaire (MEC). Cependant le génome de *B. burgdorferi* ne code pas de protéases pour permettre la dégradation de la matrice extracellulaire. Une classe de molécules de l'hôte pourrait faciliter la dissémination des spirochètes au cours de l'infection : ce sont les métalloprotéases (MMPs). Les MMPs sont une large famille de protéases à zinc. Elles ont un rôle dans la morphogenèse, la croissance, la reproduction, la cicatrisation et l'angiogénèse (Sternlicht et Werb, 2001). Parmi les MMPs induites par *Borrelia*, MMP-9 est celle qui a été la plus étudiée. Il a en effet été montré *in vitro* que *B. burgdorferi* est un inducteur de MMP-9 par des cellules humaines primaires incluant les monocytes, les neutrophiles et les KCs (Gebbia et coll., 2001). MMP-9 a aussi été détectée à des taux élevés dans le liquide synovial chez des patients atteints de la maladie de Lyme (Hu et coll., 2001 ; Li et coll., 2001). Cependant, d'autres MMPs telles que MMP-1, -3, -10, -13 et -19 sont induites par *B. burgdorferi* (Behera et coll., 2005).

La réparation tissulaire est un processus complexe impliquant différents mécanismes comme l'inflammation, la ré-épithélialisation, la formation et le remodelage de la MEC. Lorsque la peau subit un dommage, la barrière épidermique est rompue, les KCs et les cellules de Langerhans libèrent entre autre de l'IL-1. L'IL-1 est le premier signal qui alerte les cellules environnant la lésion. Lorsque la tique pique son hôte, elle induit un dommage tissulaire initial par ses pièces piqueuses sophistiquées que sont l'hypostome et les chélicères. De nombreux facteurs de croissance sont alors libérés comme l'EGF (epidermal growth factor), le PDGF (platelet-derived growth factor) et le TGF- $\beta$  (transforming growth factor). Ces facteurs permettent le recrutement notamment des neutrophiles et des monocytes. Ils augmentent la réponse inflammatoire en libérant des cytokines pro-inflammatoires (Barrientos et coll., 2008). Les cellules résidentes de la peau, les KCs et les FBs interviennent également et sécrètent des molécules inflammatoires entraînant la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire (Singer et Clark, 1999 ; Aarabi et coll., 2007).

Ces changements se font notamment par une coopération étroite entre les FBs et les KCs, qui induit une meilleure réponse à la blessure et au processus de cicatrisation (Werner et coll., 2007). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'implication des FBs et à la coopération cellulaire entre FBs et KCs lors d'une infection par *Borrelia burgdorferi* ainsi qu'au rôle des MMPs dans la réponse inflammatoire.

## 2. Matériels et méthodes

**Bactéries.** La souche de *B. burgdorferi* ss N40 est cultivée dans le milieu BSK-H (Sigma) à 33°C quatre jours avant la stimulation. Avant activation des cellules, les bactéries sont lavées deux fois par centrifugation pendant 30 minutes à 5,000 xg à 20°C. Les bactéries sont utilisées au passage 8.

**Culture cellulaire et activation.** Les KCs humains primaires et les FBs humains primaires (Promocell, Allemagne) sont respectivement maintenus dans du milieu KGM2 avec 0,15 mM de calcium et dans du FGM2 dans des flacons de culture 75cm<sup>2</sup>. Une fois à confluence, les cellules sont mises en plaques 24 puits pour les KCs et 12 puits pour les FBs à la concentration de 7,5 x 10<sup>4</sup> cellules par puit. On induit une différenciation des KCs en augmentant la concentration en calcium (1,5 mM). Vingt quatre heures avant l'activation le milieu des FBs est changé et remplacé par un milieu sans sérum. Les cellules sont ensuite activées avec différentes concentrations de *Borrelia* (100 ; 50 ; 10 ; 5 et 1 *Borrelia* par cellule) ainsi qu'avec l'IL-1β qui sert de témoin positif (Liu et coll., 2002). Vingt quatre heures après activation, le surnageant des KCs et des FBs est prélevé. Pour l'analyse de la coopération cellulaire, ce surnageant est filtré, transféré sur des FBs et des Kcs respectivement et incubé pendant à nouveau vingt quatre heures. A la fin de l'activation, les cellules ainsi que les surnageants sont récupérés. Avant de mettre les cellules dans le TriZol (Invitrogen), la viabilité de ces cellules est vérifiée sous microscope inversé ; aucune mortalité cellulaire n'est observée et ce, quelle que soit la concentration de *Borrelia* utilisée.

**ELISA.** Les quantités d'IL-8 (R&D, France) et d'hBD-2 (Peprotech, London, UK) sécrétées dans le surnageant sont mesurées par un ELISA sandwich selon les protocoles de chaque fournisseur.

**Extraction ARN et RT-PCR quantitative.** Après activation, les cellules sont directement remises en suspension dans du TriZol avant extraction d'ARN selon le protocole du fournisseur (Invitrogen). Après extraction, 2µg d'ARN total sont traités avec la DNase (Ambion) puis rétro-transcrits avec le système Superscript II (Invitrogen). Les PCR quantitatives sont effectuées sur le système LightCycler (Roche, Meylan, France). Les amorces utilisées sont décrites dans le tableau suivant :

Gène	Séquence des amorces	références
Actine	F 5' - CGT CAC CAA CTG GGA CGA CA -3' R 5' - GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA -3'	
MCP-1	F : 5'- CGC CTC CAG CAT GAA AGT CT -3' R : 5'- GGA ATG AAG GTG GCT GCT ATG- 3'	Zhao et coll., 2007b
LL-37	F : 5'-GAA GAC CCA AAG GGA TGG CC-3' R : 5'-TCA GAG CCC AGA AGC CTG AG-3'	Frohm et coll., 1997
MMP-9	F : 5'-GAT CCA AAA CTA CTC GGA AGA CTT G-3' R : 5'-GAA GGC GCG GGC AAA-3'	
MMP-14	R: 5'-TTG GAC TGT CAG GAA TGA GG-3' F: 5'-GCA GCA CAA AAT TCT CCG TG-3'	Egawa et coll., 2006
MMP-19	R: 5'-GCT TCC TAC TCC CCA TGA CAG T-3' F : 5'-GGC TTC TGT AGG TAC CCA TAT TGT-3'	
MMP-3	F: 5'-GCA GTT TGC TCA GCC TAT CC-3' R: 5'-GAG TGT CGG AGT CCA GCT TC-3'	Sirum et Brinckerhoff, 1989
Collagène	F : 5'-CCA GAA GAA CTG GTA CAT CAG CA-3' R : 5'-CGC CAT ACT CGA ACT GGA AT-3'	

Pour la quantification des gènes étudiés, l'expression des gènes est normalisée par rapport à celle du gène actine et comparée avec les cellules non traitées, incubées par du milieu seul. L'expérience a été répétée deux fois.



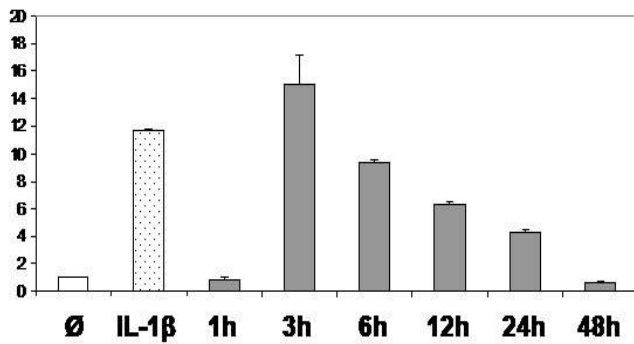
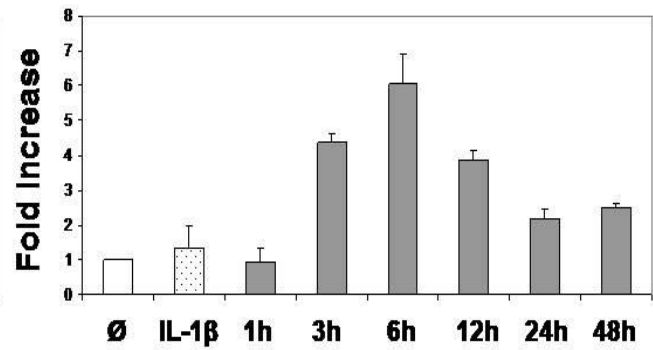
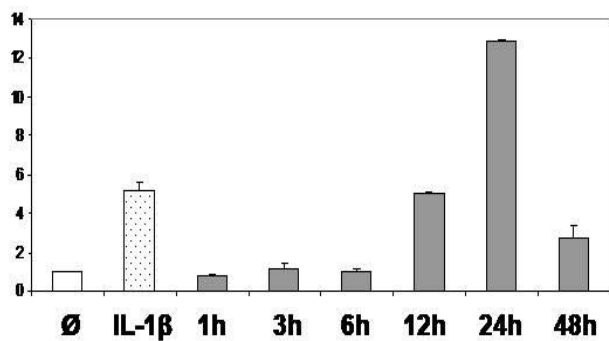
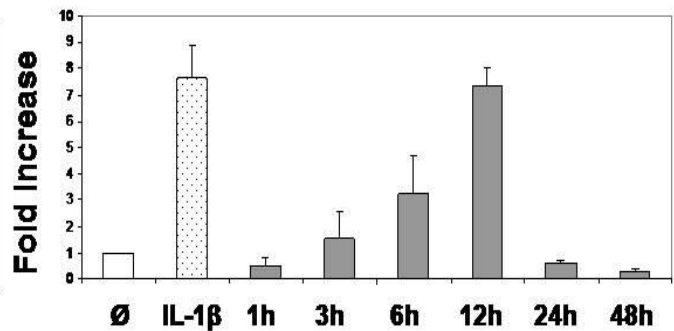
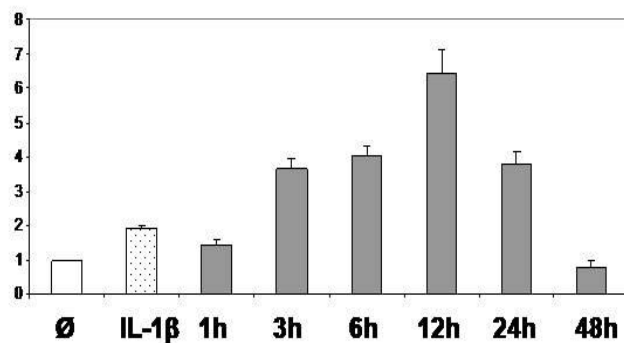
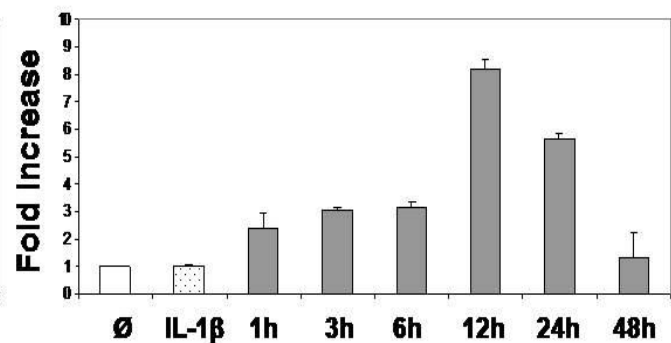
### 3. Résultats

#### **Etude de l'expression des MMPs par les FBs**

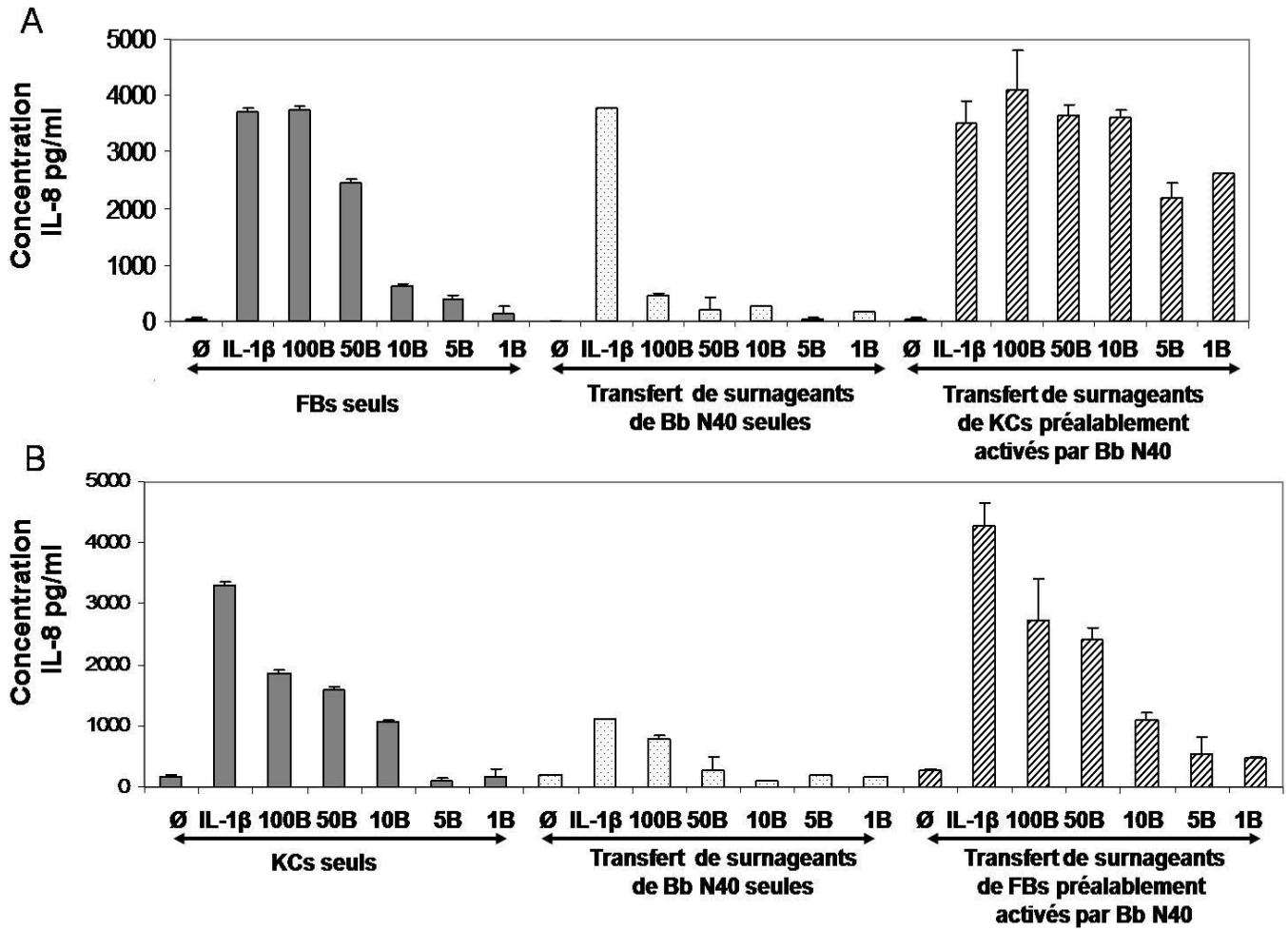
Les FBs sont les cellules du derme qui produisent principalement des molécules nécessaires à la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire. Parmi ces enzymes on retrouve les MMPs. Parmi les MMPs, nous nous sommes focalisés sur 4 d'entre elles : MMP-3, MMP-9, MMP-14 et MMP-19. Nous avons choisi MMP-3, -9 et -19 car nous savons qu'elles sont induites par *Borrelia* (Behera et coll., 2005) et MMP-14 à cause de son rôle de collagénase et d'activatrice d'autres MMPs. Le collagène et MCP-1 ont aussi été étudiés. MMP-3, -9, -14 et -19 sont induites par les FBs lorsqu'ils sont stimulés par *B. burgdorferi* ss N40. MMP-9, MMP-14 et MMP-19 sont plus fortement induites à douze heures tandis que MMP-3 est induite plus tardivement avec un pic à vingt quatre heures. Par contre, le collagène et MCP-1 sont induits plus précocement, à six heures et trois heures respectivement (Figure 45).

#### **Etude de l'expression d'IL-8 et des MMPs par les FBs lors d'un transfert de surnageants.**

Lors d'une inflammation cutanée, les FBs coopèrent avec les KCs afin de mieux répondre à une inflammation. Pour étudier l'interaction entre les deux types cellulaires, nous avons procédé à des tests de stimulation avec transfert de surnageants. Nous avons testé si des molécules sécrétées par les KCs activés par *B. burgdorferi* permettent une meilleure réponse inflammatoire des FBs et vice versa. Les KCs et les FBs sont activés par *B. burgdorferi* ss N40, puis le surnageant de chaque type cellulaire est prélevé. Le surnageant de KCs activés est incubé avec des FBs naïfs et le surnageant de FBs activés est incubé avec des KCs naïfs. Nous avons observé que le transfert de surnageants de KCs activés sur des FBs induit fortement l'expression d'IL-8, et ce quelle que soit la concentration de bactéries utilisée pour stimuler les KCs. L'effet est nettement visible pour de faibles concentrations de *Borrelia* (10, 5 et 1 *Borrelia*). Un effet plateau est observé pour une valeur d'IL-8 d'environ 4000 pg/ml (Figure 46A). Par contre, le transfert de surnageant de FBs activés sur des KCs, induit une augmentation de l'expression d'IL-8 nettement moins marquée (Figure 46B). Afin de vérifier que ce sont bien des facteurs sécrétés par les cellules activées qui sont responsables de l'induction de l'IL-8, des *Borrelia* ont été incubées en plaque en absence de cellules et leur surnageant filtré et incubé sur les FBs et KCs. Les surnageants de culture de *Borrelia* seuls n'ont pas d'effet sur la réponse des cellules étudiées.

**mRNA MCP-1****mRNA Collagène****mRNA MMP-3****mRNA MMP-9****mRNA MMP-14****mRNA MMP-19**

**Figure 45 : Mesure par RT-PCR quantitative de la cinétique d'induction de MCP-1, du collagène et des MMPs, par les fibroblastes humains primaires stimulés par *B. burgdorferi* ss N40 .**



**Figure 46 : Étude par ELISA de la coopération cellulaire entre kératinocytes et fibroblastes activés avec *B. burgdorferi* ss N40.**

A : mesure de la sécrétion d'IL-8 par les fibroblastes humains primaires stimulés par *Borrelia* avec ou sans transfert préalable de surnageants de KCs activés  
 B : mesure de la sécrétion d'IL-8 par les kératinocytes humains primaires stimulés par *Borrelia* avec ou sans transfert préalable de surnageants de FBs activés

Nous avons ensuite voulu savoir s'il existait une coopération cellulaire *Borrelia* pour la production de MMPs entre KCs et FBs dans la réponse à la stimulation par. Après transfert de surnageants de KCs activés, les FBs induisent plus fortement l'expression de MCP-1, MMP-3, MMP-14 et MMP-19. L'expression de MMP-14 est seulement visible à la concentration de 50 *Borrelia* pour une cellule. Pour MCP-1 et MMP-3, on a une forte augmentation de leur expression à la concentration de 50 *Borrelia* pour 1 cellule et une plus faible pour 10 et 5 *Borrelia* pour une cellule. Par contre, la sécrétion du PAM, LL-37 n'est pas modifiée par le transfert de surnageant (Figure 47).

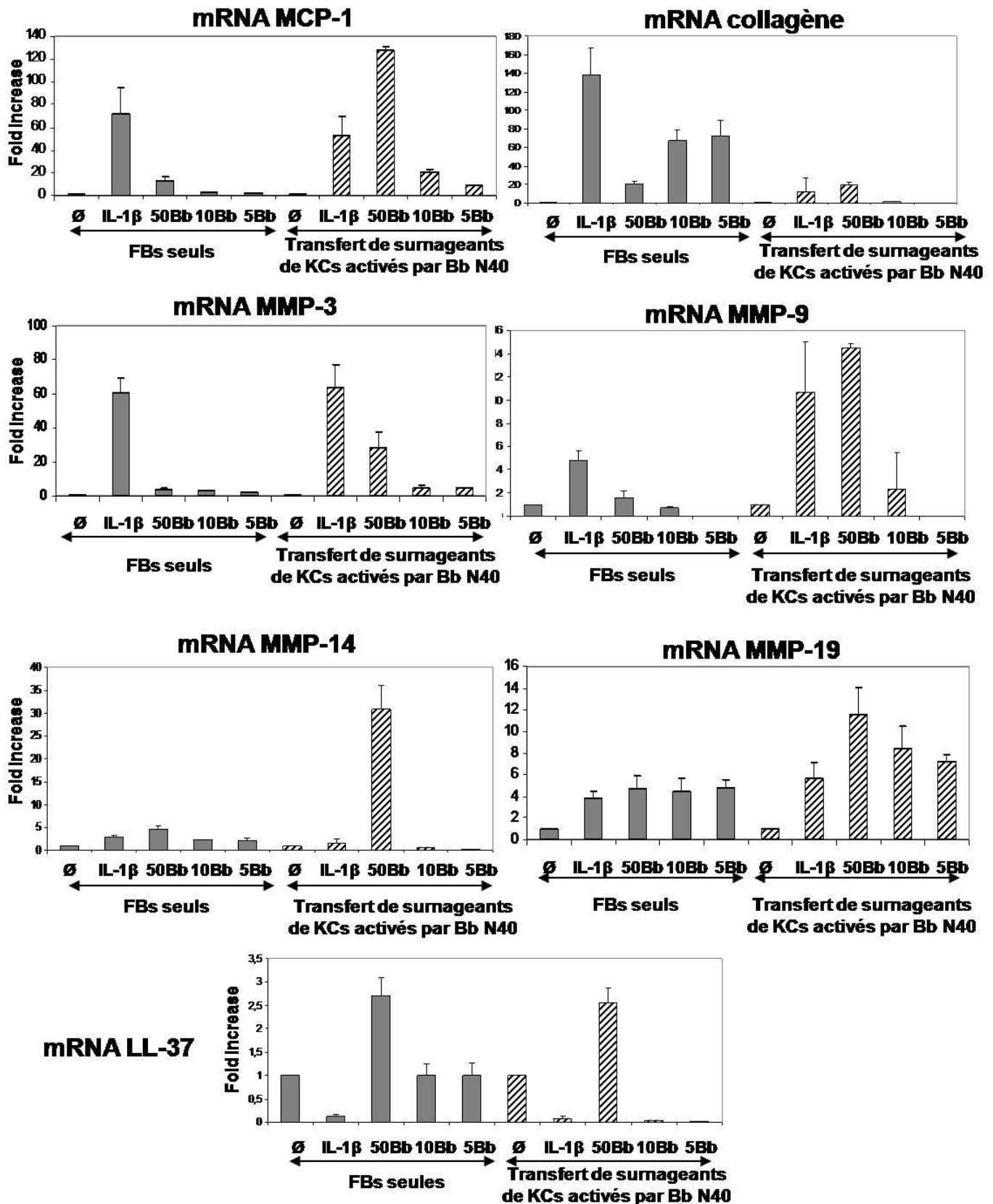
#### 4. Discussion

Lors d'une blessure, comme par exemple lors d'une piqûre de tique, l'inflammation conduit à l'induction de différentes voies d'activation pour restaurer l'intégrité tissulaire et l'hémostase. Les composants cellulaires du système immunitaire, la cascade de la coagulation et les voies de l'inflammation sont activés. De nombreux types cellulaires, incluant les cellules immunitaires (neutrophiles, monocytes, lymphocytes et cellules dendritiques), les cellules endothéliales, les KCs et les FBs sont activés entraînant la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire (Singer et Clark, 1999 ; Aarabi et coll., 2007).

Le processus de cicatrisation s'effectue en plusieurs étapes : inflammation, formation du nouveau tissu et remodelage de ce tissu. Au cours de ces différentes étapes, de nombreuses molécules sont surexprimées comme par exemple les régulateurs de l'angiogénèse que sont les VEGF (vascular endothelial growth factor) et le FGF (fibroblast growth factor) (Werner et Grose, 2003) et les facteurs de croissances comme le HGF (hépatocyte growth factor) et le KGF (keratinocyte growth factor) (Werner et coll., 1994 ; Chmielowiec et coll., 2007) nécessaire à la ré-épithélialisation ou le TGF- $\beta$ , qui lui, régule négativement le processus de ré-épithélialisation (Werner et Alzheimer, 2006).

D'autres protéines comme les MMPs jouent aussi un rôle dans le processus de cicatrisation. Les MMPs sont une large famille de protéases à zinc comprenant chez l'homme des collagénases, des gélatinases, des stromélysines, et des MMPs membranaires (Sternlich et Werb, 2001). Les MMPs ont un rôle dans la morphogénèse, la croissance, la reproduction, la cicatrisation, le renouvellement de la MEC et l'angiogénèse (Nagase et coll., 1999 ; Sternlicht et Werb, 2001).

*B. burgdorferi*, l'agent causal de la maladie de Lyme, induit un grand nombre de manifestations cliniques chez l'homme incluant non seulement des lésions de la peau que sont



**Figure 47 : Analyse par RT-PCR quantitative de l'induction de MCP-1, du collagène des MMPs et de LL-37 par les fibroblastes après transfert de surnageants de KCs humains primaires activés par *B. burgdorferi* ss N40.**

les érythèmes migrants mais aussi des atteintes neurologiques, cardiaques et articulaires (Burgdorfer et coll., 1982, Asbrink et coll., 1984 ; Steere et coll., 1989). Lors de l'infection, les spirochètes, se propagent dans la peau à partir du site initial d'inoculation, puis entrent dans le système circulatoire afin de coloniser différents organes. Tandis que la dissémination requiert la rupture des barrières cellulaires et la digestion de la MEC, le génome de *B. burgdorferi* ne code pas des protéases qui dégraderaient la matrice extracellulaire. Les MMPs sont des molécules de l'hôte qui pourraient aider le spirochète à disséminer durant l'infection. Les MMPs ont de multiples effets dans l'inflammation en activant ou réprimant les chimiokines, des cytokines et de leurs récepteurs respectifs (Fini et coll., 1998 ; Tonn et coll., 1999 ; Van Lint et coll., 2007).

**MMP-9** est une enzyme hydrolysant le collagène, l'élastine et la gélatine (Collier et coll., 1988 ; Mackay et coll., 1990 ; Senior et coll., 1991). MMP-9 activée semble jouer un rôle dans la modulation de l'inflammation par son action sur les médiateurs inflammatoires. *B. burgdorferi* induit MMP-9 dans les cellules humaines primaires, dont les monocytes, les neutrophiles, les KCs et les astrocytes *in vitro* (Gebbia et coll., 2001). MMP-9 a aussi été retrouvée à des taux élevés dans les liquides céphalo-rachidiens et synoviaux et dans des lésions d'érythème migrant de patients atteints de la maladie de Lyme (Hu et coll., 2001 ; Li et coll., 2001 ; Zhao et coll., 2003). De plus, *B. burgdorferi* et ses lipoprotéines utilisent les récepteurs CD14 (Wright et coll., 1990 ; Sellati et coll., 1998) et TLR-2 pour induire la production de molécules pro-inflammatoires et notamment MMP-9 (Lien et coll., 1999 ; Giambartolomei et coll., 1999 ; Hirschfeld et coll., 1999). Dans certaines études, MMP-9 semble initier la dissémination des spirochètes. Ainsi, MMP-9 libérée par les monocytes et les neutrophiles humains initie la translocation de *B. burgdorferi* à travers les matrices de collagène de type I et IV et de laminine (Gebbia et coll., 2001). Cependant, l'étude de Heilpern et coll., (2009) a montré que MMP-9 ne serait pas requise dans la dissémination de *Borrelia* chez la souris.

En plus de leurs rôles dans la dissémination de *B. burgdorferi*, les MMPs joueraient un rôle dans le développement de certains symptômes de la maladie de Lyme, incluant l'arthrite et les atteintes cardiaques. Les MMPs peuvent être responsables de la dégradation de l'os et du cartilage. De fortes quantités de MMP-9 ont aussi été trouvées dans le liquide synovial chez certains patients atteints d'arthrite de Lyme ; cependant *in vitro* aucune expression de MMP-9 n'est observée dans les chondrocytes après infection par *Borrelia*, suggérant que la source de MMP-9 proviendrait d'autres cellules (Hu et coll., 2001 ; Behera et coll., 2005).

En ce qui concerne **MMP-3**, d'autres études ont montré que *B. burgdorferi* induit cette MMP, l'activateur de MMP-9, dans le tissu articulaire de souris infectées (Behera et coll., 2005 ; Crandall et coll., 2006) mais aussi d'autres MMPs comme MMP-1, -13 et -19 dans les chondrocytes humains (Behera et coll., 2005). L'induction de MMP-3 et par conséquent de MMP-9 par les FBs permettrait aux *Borrelia* de disséminer à travers la MEC.

**MMP-14** est une collagénase ancrée à la membrane plasmique et capable de dégrader de nombreux composants de la MEC et d'activer d'autres MMPs (Itoh et coll., 2006). Elle régule notamment MMP-13 et dégrade le collagène (Seiki et coll., 2002). Elle possède aussi un rôle important dans la migration cellulaire (Takino et coll., 2004). **MMP-19** possède un rôle dans le contrôle des tumeurs (Velinov et coll., 2007), elle est aussi trouvée dans les FBs activés par le TNF- $\alpha$  et lors d'une blessure dermique (Hieta et coll., 2003).

Nous avons montré dans notre étude que *B. burgdorferi* ss induit l'expression de différentes MMPs comme MMP-3, -9, -14 et -19 dans les FBs. MMP-14 et d'autres MMPs comme MMP-8 et MMP-12 sont des protéines qui clivent la MEC pour libérer des peptides ayant des propriétés chimioattractantes et / ou inflammatoires (Houghton et coll., 2006 ; Gaggar et coll., 2008 ; Mydel et coll., 2008). MMP-14 pourrait ainsi jouer un rôle dans le clivage de la MEC et pourrait permettre ainsi la migration de *Borrelia* à travers la MEC.

Le transfert sur les FBs de surnageants de KCs activés au préalable par *Borrelia*, induit plus fortement l'expression des MMPs. Cette augmentation suggère que les KCs situés au niveau épidermique coopèrent avec les FBs situés dans le derme afin de faciliter la dissémination de *Borrelia*. Une étude menée par Werner a décrit des molécules sur-exprimées par les FBs en coculture avec des KCs (Werner et coll., 2007). Parmi celles-ci on trouve la chimiokine MCP-1, qui comme nous l'avons montré précédemment, joue un rôle de chimio-attractant. Les FBs la produisent aussi en réponse à *Borrelia*, avec une nette augmentation lors du transfert de surnageant de KCs activés.

D'autres études sont encore à réaliser notamment sur le rôle de la salive de tique dans l'expression des MMPs et de MCP-1, pour déterminer si la salive de tique modifie l'expression des MMPs en faveur de *Borrelia* et de sa dissémination. De plus il sera intéressant de se pencher sur d'autres molécules comme le TGF- $\beta$  qui interagit avec les FBs et les KCs mais aussi sur la décorine, peptidoglycane de la MEC, car des études ont montré la fixation de *Borrelia* à la décorine (Shi et coll., 2008). Le TGF- $\beta$  est un facteur de croissance fibrogénique produit par de nombreuses cellules incluant les FBs de la peau. Il

joue un rôle significatif dans la formation de la MEC et le processus de cicatrisation (Martin et coll., 1997 ; Leask et coll., 2002). Le TGF-  $\beta$  est aussi important dans l'angiogénèse, la ré-épithélialisation et la régénération de la connexion des tissus (Kane et coll., 1991 ; Barrientos et coll., 2008).

### Bibliographie

- Aarabi, S., M. T. Longaker, et coll. (2007). "Hypertrophic scar formation following burns and trauma: new approaches to treatment." PLoS Med **4**: e234.
- Asbrink, E., B. Hederstedt, et coll. (1984). "The spirochetal etiology of erythema chronicum migrans Afzelius." Acta Derm Venereol **64**: 291-5.
- Barrientos, S., O. Stojadinovic, et coll. (2008). "Growth factors and cytokines in wound healing." Wound Repair Regen **16**: 585-601.
- Behera, A. K., E. Hildebrand, et coll. (2005). "Induction of host matrix metalloproteinases by *Borrelia burgdorferi* differs in human and murine lyme arthritis." Infect Immun **73**: 126-34.
- Brehmer-Andersson, E., A. Hovmark, et coll. (1998). "Acrodermatitis chronica atrophicans: histopathologic findings and clinical correlations in 111 cases." Acta Derm Venereol **78**: 207-13.
- Burgdorfer, W., A. G. Barbour, et coll. (1982). "Lyme disease-a tick-borne spirochetosis?" Science **216**: 1317-9.
- Chmielowiec, J., M. Borowiak, et coll. (2007). "c-Met is essential for wound healing in the skin." J Cell Biol **177**(1): 151-62.
- Collier, I. E., S. M. Wilhelm, et coll. (1988). "H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen." J Biol Chem **263**: 6579-87.
- Crandall, H., D. M. Dunn, et coll. (2006). "Gene expression profiling reveals unique pathways associated with differential severity of lyme arthritis." J Immunol **177**: 7930-42.
- Ebnet, K., K. D. Brown, et coll. (1997). "*Borrelia burgdorferi* activates nuclear factor-kappa B and is a potent inducer of chemokine and adhesion molecule gene expression in endothelial cells and fibroblasts." J Immunol **158**: 3285-92.



- Fini, M. E., J. R. Cook, et coll. (1998). "Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair." Arch Dermatol Res **290 Suppl**: S12-23.
- Frohm, M., B. Agerberth, et coll. (1997). "The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders." J Biol Chem **272**: 15258-63.
- Gaggar, A., P. L. Jackson, et coll. (2008). "A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation." J Immunol **180**: 5662-9.
- Gebbia, J. A., J. L. Coleman, et coll. (2001). "*Borrelia* spirochetes upregulate release and activation of matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) and collagenase 1 (MMP-1) in human cells." Infect Immun **69**: 456-62.
- Giambartolomei, G. H., V. A. Dennis, et coll. (1999). "Induction of pro- and anti-inflammatory cytokines by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins in monocytes is mediated by CD14." Infect Immun **67**: 140-7.
- Heilpern, A. J., W. Wertheim, et coll. (2009). "Matrix metalloproteinase 9 plays a key role in lyme arthritis but not in dissemination of *Borrelia burgdorferi*." Infect Immun **77**: 2643-9.
- Hieta, N., U. Impola, et coll. (2003). "Matrix metalloproteinase-19 expression in dermal wounds and by fibroblasts in culture." J Invest Dermatol **121**: 997-1004.
- Hirschfeld, M., C. J. Kirschning, et coll. (1999). "Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2." J Immunol **163**: 2382-6.
- Houghton, A. M., P. A. Quintero, et coll. (2006). "Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema." J Clin Invest **116**: 753-9.
- Hu, L. T., M. A. Eskildsen, et coll. (2001). "Host metalloproteinases in Lyme arthritis." Arthritis Rheum **44**: 1401-10.
- Itoh, Y. (2006). "MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue." IUBMB Life **58**: 589-96.
- Jones, N. C., A. Germain, et coll. (1994). "*Borrelia burgdorferi* decreases hyaluronan synthesis but increases IL-6 production by fibroblasts." Microb Pathog **16**: 261-7.
- Kane, C. J., P. A. Hebda, et coll. (1991). "Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta 1 expression during cutaneous wound healing." J Cell Physiol **148**: 157-73.

- Leask, A., A. Holmes, et coll. (2002). "Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis." Curr Rheumatol Rep **4**: 136-42.
- Li, D. Q., B. L. Lokeshwar, et coll. (2001). "Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells." Exp Eye Res **73**: 449-59.
- Lien, E., T. J. Sellati, et coll. (1999). "Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products." J Biol Chem **274**: 33419-25.
- Liu, A. Y., D. Destoumieux, et coll. (2002). "Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation." J Invest Dermatol **118**: 275-81.
- Mackay, A. R., J. L. Hartzler, et coll. (1990). "Studies on the ability of 65-kDa and 92-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen." J Biol Chem **265**: 21929-34.
- Martin, P. (1997). "Wound healing--aiming for perfect skin regeneration." Science **276**: 75-81.
- Mydel, P., J. M. Shipley, et coll. (2008). "Neutrophil elastase cleaves laminin-332 (laminin-5) generating peptides that are chemotactic for neutrophils." J Biol Chem **283**: 9513-22.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem **274**: 21491-4.
- Seiki, M. (2002). "The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration." Curr Opin Cell Biol **14**: 624-32.
- Sellati, T. J., D. A. Bouis, et coll. (1998). "*Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytic cells via a CD14-dependent pathway distinct from that used by lipopolysaccharide." J Immunol **160**: 5455-64.
- Senior, R. M., G. L. Griffin, et coll. (1991). "Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases." J Biol Chem **266**: 7870-5.
- Shi, Y., Q. Xu, et coll. (2008). "Both decorin-binding proteins A and B are critical for the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*." Infect Immun **76**: 1239-46.
- Singer, A. J. and R. A. Clark (1999). "Cutaneous wound healing." N Engl J Med **341**: 738-46.
- Steere, A. C. (1989). "Lyme disease." N Engl J Med **321**: 586-96.

- Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463-516.
- Takino, T., H. Miyamori, et coll. (2004). "Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration." Cancer Res **64**: 1044-9.
- Tonn, J. C., S. Kerkau, et coll. (1999). "Effect of synthetic matrix-metalloproteinase inhibitors on invasive capacity and proliferation of human malignant gliomas *in vitro*." Int J Cancer **80**: 764-72.
- Van Lint, P. and C. Libert (2007). "Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation." J Leukoc Biol **82**: 1375-81.
- Velinov, N., D. Aebersold, et coll. (2007). "Matrix metalloproteinase-19 is a predictive marker for tumor invasiveness in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma." Int J Biol Markers **22**: 265-73.
- Werner, S., H. Smola, et coll. (1994). "The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds." Science **266**: 819-22.
- Werner, S. and R. Grose (2003). "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines." Physiol Rev **83**: 835-70.
- Werner, S. and C. Alzheimer (2006). "Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease." Cytokine Growth Factor Rev **17**: 157-71.
- Werner, S., T. Krieg, et coll. (2007). "Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing." J Invest Dermatol **127**: 998-1008.
- Wright, S. D., R. A. Ramos, et coll. (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." Science **249**: 1431-3.
- Zhao, Z., H. Chang, et coll. (2003). "Selective up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression in human erythema migrans skin lesions of acute lyme disease." J Infect Dis **188**: 1098-104.
- Zhao, Z., R. Fleming, et coll. (2007). "CD14 mediates cross talk between mononuclear cells and fibroblasts for upregulation of matrix metalloproteinase 9 by *Borrelia burgdorferi*." Infect Immun **75**: 3062-9.
- Zhao, Z., B. McCloud, et coll. (2007). "*Borrelia burgdorferi*-induced monocyte chemoattractant protein-1 production *in vivo* and *in vitro*." Biochem Biophys Res Commun **358**: 528-33.

# Publication n°4

**Etude de l'interaction de différentes espèces  
et de différentes souches de *Borrelia* avec les  
KCs**

En préparation

#### IV. Comparaison de différentes espèces et de différentes souches de *Borrelia* avec des kératinocytes humains

En préparation

La borréliose de Lyme en Europe est due à au moins trois espèces principales de *Borrelia* : *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* et *B. garinii* responsables, de façon simplifiée, de manifestations disséminées, rhumatologiques, cutanées et neurologiques respectivement (Gern, 2009). Cependant, différentes souches d'une même espèce peuvent être responsables de différentes manifestations cliniques qui ont été définies comme différents pathotypes en fonction de la clinique décrite chez l'homme lors de leur isolement. Nous avons commencé un travail préliminaire étudiant l'interaction des KCs avec différentes souches de *Borrelia* responsables de différents pathotypes chez l'homme. L'idée étant de définir si la peau présente une réaction inflammatoire différente en réponse à chaque pathotype, pouvant expliquer, en partie au moins, l'organotropisme de *Borrelia* lors de manifestations cliniques initiales et disséminées.

## 1. Introduction

La borréliose de Lyme, infection transmise par les tiques du genre *Ixodes* est la maladie la plus fréquente dans l'hémisphère Nord. Cette maladie est causée par un spirochète du groupe *B. burgdorferi* (Baranton et coll., 1992 ; Fukunaga et coll., 1996 ; Le Fleche et coll., 1997 ; Richter *et coll.*, 2004). L'infection humaine peut être asymptomatique ou accompagnée de manifestations cliniques avec des degrés de sévérité variables. Elle dépend du stade de l'infection et des tissus touchés. La manifestation primaire de la borréliose de Lyme est l'érythème migrant (EM), une lésion cutanée se développant sur le site de piqûre de la tique chez environ la moitié des patients infectés (Steere, 1989 ; Stanek et Strle, 2003). Les spirochètes se multiplient dans la peau, générant des manifestations cutanées à distance, comme un EM multiple ou un lymphocytome borrélien (Stanek et coll., 1985), ou tardivement une acrodermatite chronique atrophiante (ACA) (Asbrink et coll., 1984). Les spirochètes peuvent aussi disséminer dans le sang vers des organes distants, incluant le système nerveux central (Pachner, 1989), les articulations (Hardin et coll., 1984) et plus occasionnellement dans le cœur (Steere et coll., 1980).

Trois espèces du groupe de *B. burgdorferi* sensu lato sont le plus fréquemment identifiées comme pathogènes chez l'homme : *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* et *B. afzelii* (Baranton et De Martino, 2009). Dans l'Amérique du Nord, où *B. burgdorferi* ss est la seule espèce isolée chez les patients, l'arthrite de Lyme est la manifestation tardive la plus fréquente (Steere et coll., 1986 ; Steere et coll., 1991). En Europe, où *B. garinii* et *B. afzelii* sont les espèces les plus fréquemment isolées chez l'homme, la fréquence des manifestations cliniques disséminées est différente. Les patients souffrent plus souvent de neuroborréliose que d'arthrite (Stanek et Strle, 2003). L'acrodermatite et le lymphocytome borrélien sont exceptionnels en Amérique du Nord, mais sont rapportés en Europe (Asbrink et coll., 1986). Basée sur des observations épidémiologiques, chacune de ces trois espèces de *Borrelia* a été décrite comme ayant un organotropisme préférentiel (Assous et coll., 1993 ; Strle et coll., 2006). L'acrodermatite a ainsi été associée à *B. afzelii* (Bush et coll., 1996), les neuroborrélioses à *B. garinii* (Wilske et coll., 1994) et les arthrites de Lyme à *B. burgdorferi* ss (Jaulhac et coll., 2000). Cependant, cette association préférentielle de l'arthrite de Lyme avec *B. burgdorferi* ss n'est pas stricte en Europe. En effet, les différentes manifestations cliniques associées aux autres espèces ont aussi été liées à *B. burgdorferi* ss.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la réponse immunitaire innée induite par différentes souches de *B. burgdorferi* si isolées de différentes manifestations cliniques humaines. Nous souhaitons analyser si la réponse immunitaire innée cutanée varie suivant le pathotype de la souche infectante.

## 2. Matériels et méthodes

**Bactéries.** Les différentes souches de *B. burgdorferi* si (tableau ci-dessous) sont cultivées dans le milieu BSK-H (Sigma) à 33°C pendant quatre jours avant la stimulation des KCs. Avant activation, les bactéries sont lavées deux fois par centrifugation pendant 30 minutes à 5 000 xg à 20°C.

Les souches de *B. burgdorferi* ss 297 KO pour le gène *ospC* et 297 complémentées pour le gène *ospC* sont cultivées dans du milieu BSK-H à 33°C pendant quatre jours avant la stimulation en présence d'un antibiotique qui permet la sélection des bactéries possédant la mutation et/ ou complémentée. La souche 297 *OspC*<sup>-/-</sup> est mise en culture avec 50 µg/ml de streptomycine (Sigma) et la souche 297 complémentée pour *OspC* est mise en culture avec 50 µg/ml de streptomycine et 200 µg/ml de kanamycine (Sigma).

Nom	Espèce de <i>Borrelia</i>	Origine	Manifestation clinique
N40	<i>B. burgdorferi</i> ss	Tique	Non définie
Pbi	<i>B. garinii</i>	Humaine	Neuroborréliose
1895	<i>B. afzelii</i>	Humaine	Neuroborréliose
c297/4	<i>B. burgdorferi</i> ss	Humaine	Neuroborréliose
MR726	<i>B. burgdorferi</i> ss	Humaine	Erythème migrant multiple
cPBre/4	<i>B. burgdorferi</i> ss	Humaine	Erythème migrant unique
297	<i>B. burgdorferi</i> ss	Humaine	Neuroborréliose
B31	<i>B. burgdorferi</i> ss	Tique	Non définie
Bre13	<i>B. burgdorferi</i> ss	Humaine	Neuroborréliose

**Culture cellulaire et activation.** Les KCs humains primaires (Promocell, Allemagne) sont maintenus dans du milieu KGM2 à 0,15 mM de calcium. Une fois à confluence, les cellules sont mises en plaques 24 puits à la concentration de  $7,5 \times 10^4$  cellules par puit. Une fois à confluence, les KCs sont différenciés par l'augmentation de la concentration en calcium (1,5 mM). Les cellules sont ensuite activées avec différentes concentrations de *Borrelia* (100 ; 10 et 1 *Borrelia* par cellule) ainsi que par l'IL-1 $\beta$  qui sert de témoin positif à l'expérience (Liu et coll., 2002). A la fin de l'activation, les cellules ainsi que les surnageants sont récupérés. Avant de mettre les cellules dans le TriZol (Invitrogen), la viabilité de ces cellules est vérifiée sous microscope inversé. Aucune mortalité cellulaire n'est observée et ce quelle que soit la concentration de *Borrelia* utilisée.

**ELISA.** Pour mesurer la quantité d'IL-8 (R&D, France) et d'HBD-2 (Peprotech, London, UK) sécrétées dans le surnageant, des ELISA sandwich sont réalisés selon la protocole du fournisseur.

**Immunohistochimie.** L'immunomarquage des coupes tissulaires cutanées par les anticorps anti-HBD-2 (Ganz, University UCLA, USA) et anti-LL-37 (Gallo, University San Diego, USA) se fait suivant le protocole du kit LSAB-2 peroxydase (Dako K0675). Brièvement, les coupes histologiques sont déparaffinées par des lavages au toluène puis à l'alcool et enfin à l'eau courante et déminéralisée. Les sites antigéniques sont démasqués par un pré-traitement des coupes par chauffage dans un tampon EDTA pH 8,00 au four à micro-ondes pendant 30 minutes puis les coupes sont refroidies jusqu'à atteindre la température ambiante pendant 20 minutes environ. Les coupes sont ensuite traitées à l'eau oxygénée à 3% pendant 5 à 10 minutes afin d'éliminer les peroxydases endogènes et ensuite lavées à l'eau distillée puis dans un tampon TBS pH 7,6. Les coupes sont incubées en chambre humide avec l'anticorps primaire pendant 24h à 4°C. Les dilutions pour les anticorps HBD-2 et LL-37 sont de 1/12 000 et 1/400 respectivement. Les coupes sont ensuite lavées et incubées pendant 20 minutes avec un sérum biotinylé anti lapin et anti souris prédilué (kit LSAB-2). Après lavage, les coupes sont incubées pendant 20 minutes avec le complexe streptavidine- peroxydase puis la peroxydase est révélée avec le substrat chromogène pendant 20 minutes. La coupe est recouverte d'une lamelle avec un milieu de montage aqueux (glycergel Dako C0563) et observée sous microscope.



### 3. Résultats

#### **Etude de la sécrétion d'IL-8 et d'hBD-2 par les KCs stimulés par différentes espèces de *B. burgdorferi* sl.**

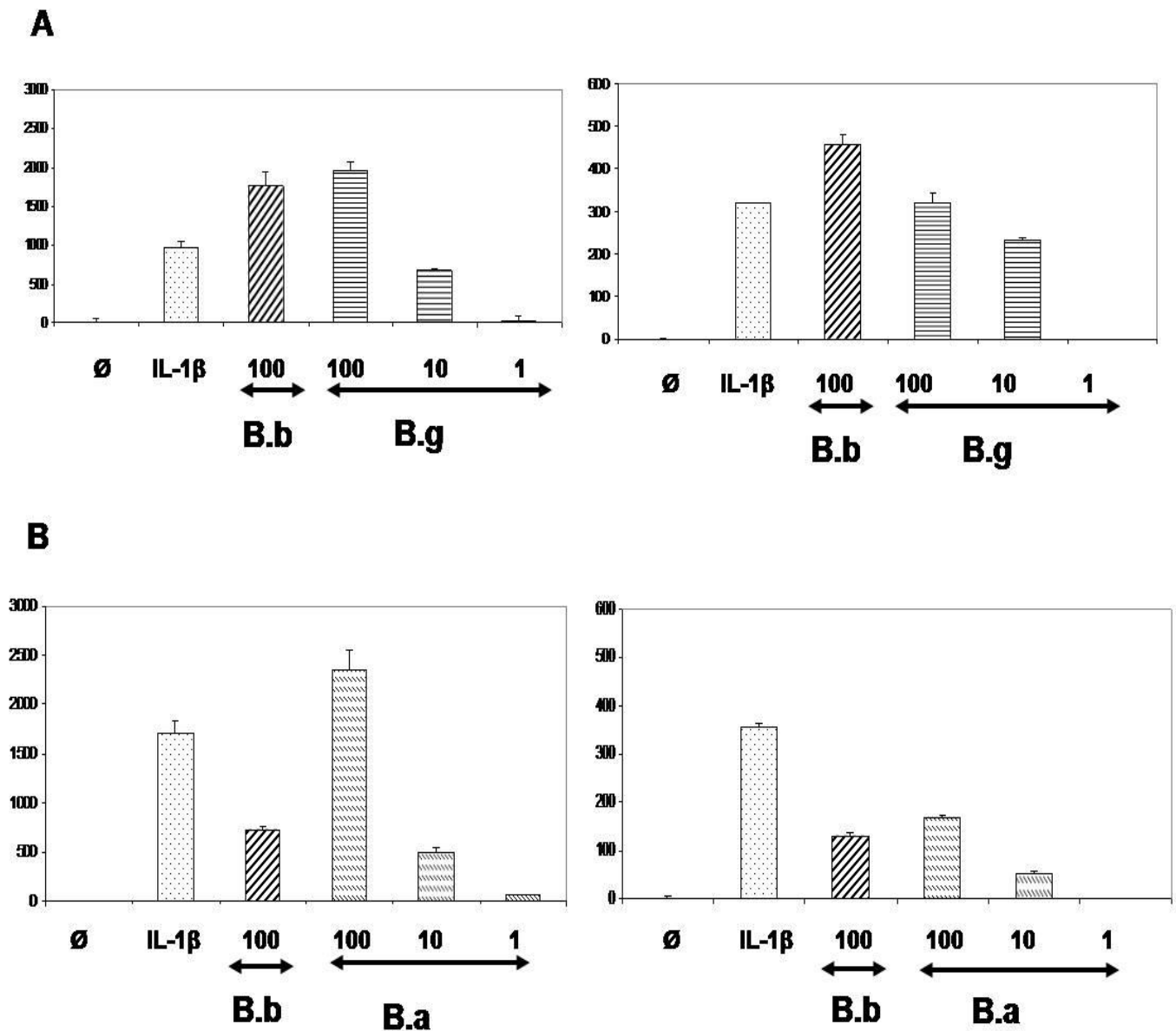
Dans un premier temps, nous avons comparé trois espèces de *Borrelia* : *B. burgdorferi* ss (N40) et *B. garinii* (Pbi) et *B. afzelii* (1895). Les deux premières espèces expriment de la même manière la chimiokine IL-8. En effet, on observe que l'induction d'IL-8 pour la concentration de 100 *Borrelia* pour une cellule est quasiment identique avec *B. burgdorferi* ou avec *B. garinii* (Figure 48A). Par contre, *B. afzelii* souche 1895 induit plus fortement l'expression d'IL-8 (Figure 48B). L'expression d'hBD-2 est identique et ce quelle que soit la souche étudiée (Figure 48A et B).

#### **Etude de la sécrétion d'IL-8 et d'BD-2 induite par les KCs activés par différentes souches de *B. burgdorferi* ss.**

Dans un second temps, nous avons comparé différentes souches de la même espèce, *B. burgdorferi* ss. Ces souches ont été isolées de patients qui ont développé des manifestations cliniques différentes mais appartenant toutes à l'espèce *B. burgdorferi* ss. La figure 49 montre que pour toutes les souches étudiées (B31, MR726, c297/4, cPBr/4, Br13), la réponse immunitaire induit une production d'IL-8 et d'hBD-2. Pas de différence significative n'est observée en fonction des pathotypes pour les souches étudiées.

Dans ce travail, nous avons étudié une souche native de *B. burgdorferi* ss : la souche 297. Nous disposons aussi pour cette souche 297, de la souche 297 *ospC*<sup>-/-</sup> déficiente en *ospC* et de la souche 297 *ospC*<sup>-/-</sup> complétée avec un plasmide qui traduit la protéine OspC. La mesure de la sécrétion d'IL-8 par les KCs a montré que *B. burgdorferi* ss 297 *ospC*<sup>-/-</sup> induit plus faiblement la sécrétion d'IL-8 que la souche native, que ce soit à six heures ou à vingt-quatre heures. La sécrétion d'IL-8 est rétablie lorsque les KCs sont stimulés par *B. burgdorferi* ss 297 complétée (Figure 50).

Nous avons ensuite étudié par immuno-histochimie, l'expression des PAMs dans des biopsies de patients atteints soit d'un psoriasis, soit d'une forme cutanée de la borréliose de Lyme (érythème migrant). Le patient atteint d'un psoriasis exprime fortement le PAM hBD-2 tandis,

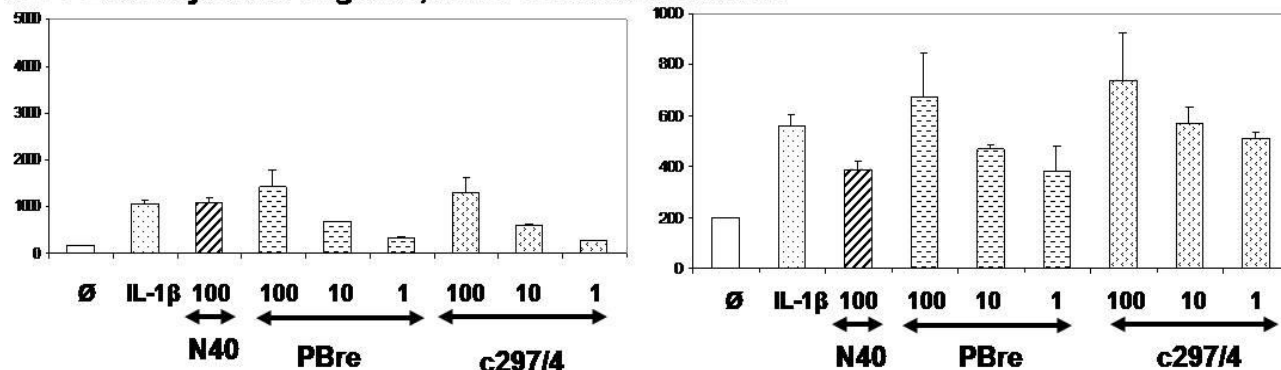


**Figure 48 : Étude par ELISA de l'expression de l'IL-8 et d'HBD-2 par les KCs humains primaires stimulés par différentes espèces de *Borrelia*.**

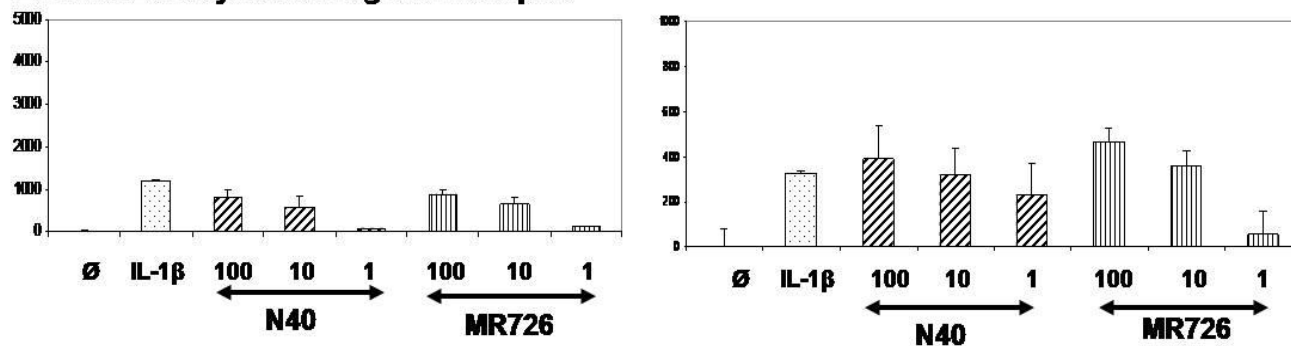
A : Titration de la sécrétion d'IL-8 et d'HBD-2 par les KCs stimulés par *B. burgdorferi* ss N40, et *B. garinii* Pbi  
 B : Titration de la sécrétion d'IL-8 et d'HBD-2 par les KCs stimulés par *B. burgdorferi* ss N40 et *B. afzelii* 1895  
 B.b : *B. burgdorferi*; B.g : *B. garinii*; B.a : *B. afzelii*.

## IL-8 pg/ml

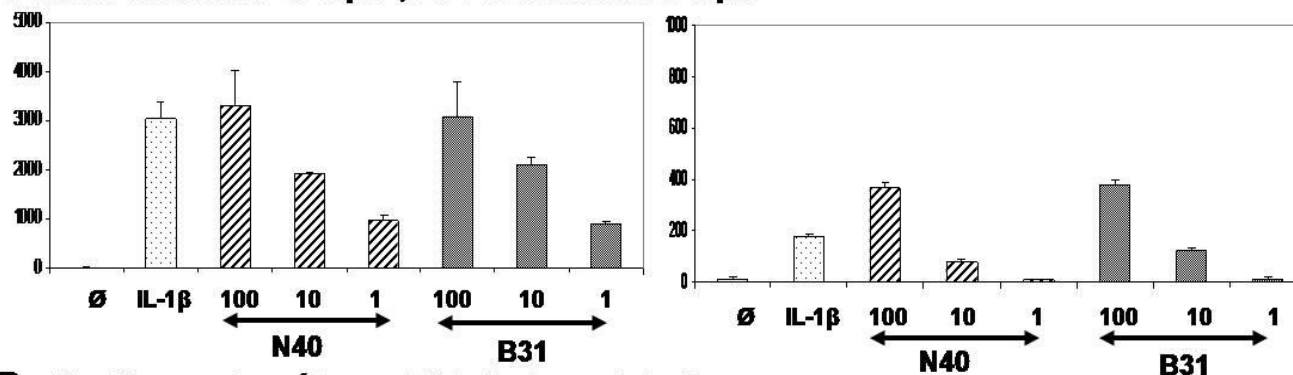
### A : PBre : érythème migrant ; c297/4 : neuroborréliose



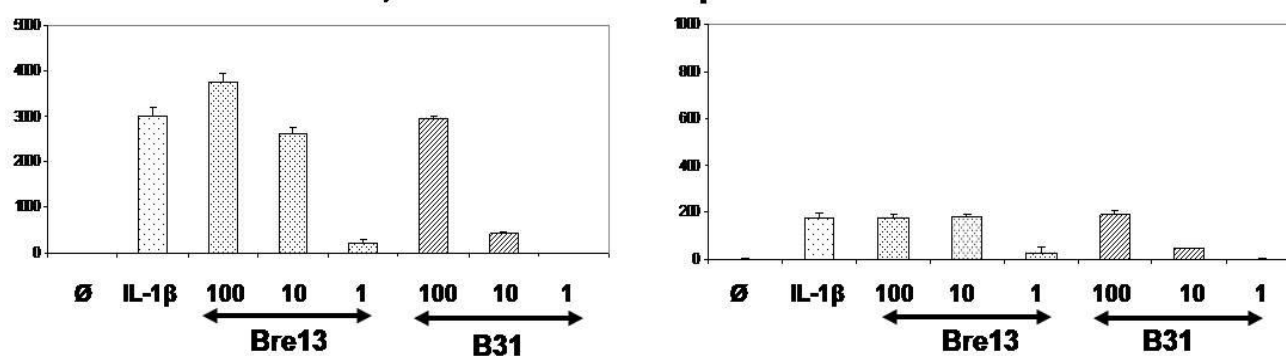
### B : MR726 : érythème migrant multiple



### C : N40: isolement de tique ; B31 : isolement de tique



### D : Bre13: neuroborréliose ; B31 : isolement de tique



**Figure 49 : Étude par Elisa de la sécrétion de l'IL-8 et d'HBD-2 par les KCs humains primaires activés par différentes souches de *B. burgdorferi* ss.**

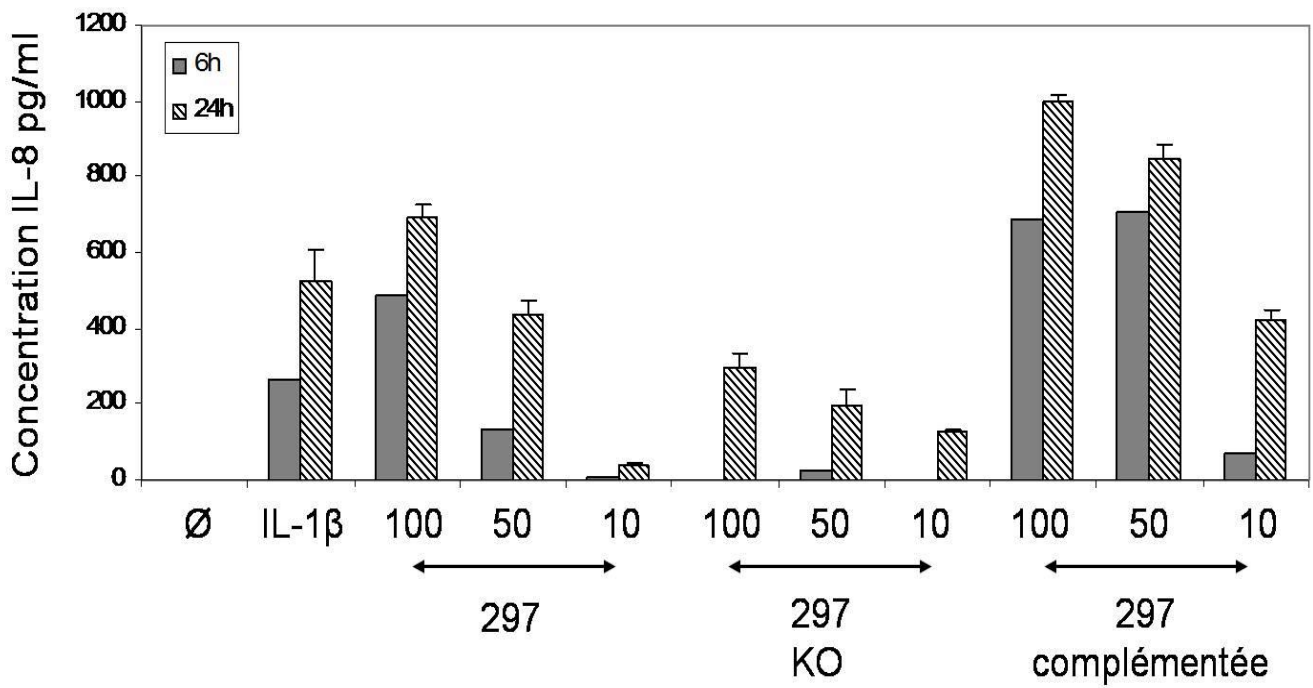
A : Titration de la sécrétion d'IL-8 et d'HBD-2 par les KCs stimulés par *B. burgdorferi* ss N40, Pbre et 297

B : Titration de la sécrétion d'IL-8 et d'HBD-2 par les KCs stimulés par *B. burgdorferi* ss N40 et MR726

C : Titration de la sécrétion d'IL-8 et d'HBD-2 par les KCs stimulés par *B. burgdorferi* ss N40 et B31

D : Titration de la sécrétion d'IL-8 et d'HBD-2 par les KCs stimulés par *B. burgdorferi* ss B31 et Bre13

100, 10, 1 : 100, 10 et 1 *Borrelia* pour une cellule



**Figure 50 : Mesure par ELISA de la cinétique de sécrétion d'IL-8 par les KCs humains primaires stimulés par *B. burgdorferi* ss 297, 297 OspC -/- (OspC KO) et 297 complémentée.**

que sur les coupes de biopsies de patients ayant un érythème migrant, on n'observe pas d'expression d'hBD-2 ni de LL-37 (Figure 51).

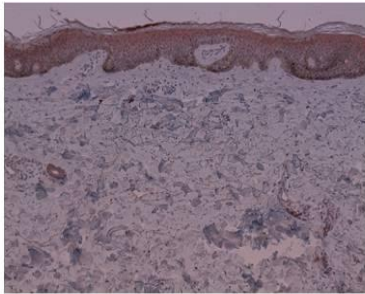
#### 4. Discussion

Les espèces du complexe *B. burgdorferi* sensu lato sont responsables de la borréliose de Lyme (Le Fleche et coll., 1997 ; Richter et coll., 2004). Ce complexe comprend plus de 13 espèces de *Borrelia*. Trois d'entre elles sont clairement pathogènes pour l'homme : *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* et *B. garinii* (Baranton et coll., 1992 ; Baranton et De Martino, 2009). Elles peuvent générer un érythème migrant, lésion cutanée initiale, et peuvent ensuite se propager chez l'hôte pour infecter des tissus distants comme par exemple le système nerveux, les articulations ou la peau (Stanek et Strle, 2003). Les manifestations cliniques sont associées préférentiellement à l'une ou l'autre espèce de *Borrelia*. Ainsi il est admis que les *B. burgdorferi* ss entraînent plus fréquemment des arthrites (Steere et coll., 1986 ; Steere et coll., 1991), *B. garinii* des manifestations neurologiques (Wilske et coll., 1994) et *B. afzelii* des manifestations cutanées (Bush et coll., 1996). Cependant l'association *B. burgdorferi* ss – arthrites en Europe n'est pas exclusive et d'autres manifestations ont pu être observées et causées par différentes souches de *B. burgdorferi* ss.

De cette observation, nous nous sommes intéressés à la réponse inflammatoire des KCs vis-à-vis de ces différentes souches de *Borrelia*. Une réponse inflammatoire spécifique au niveau cutané pourrait en effet être impliquée dans l'organotropisme observé chez les patients à la phase disséminée. Quelle que soit la souche de *B. burgdorferi* ss étudiée, nous n'observons pas de différence significative entre la réponse inflammatoire des KCs induite par *Borrelia* pour les deux gènes inflammatoires testés. Ce constat est aussi fait pour les deux autres espèces de *Borrelia* testées : *B. garinii* et *B. afzelii*. Quant aux pathotypes dus à différentes souches de *B. burgdorferi* ss, nous n'avons pour l'instant observé aucune différence significative. Seulement dans deux gènes inflammatoires, hBD-2 et IL-8 ont été étudiés. Nous envisageons d'augmenter le panel de molécules inflammatoires étudiées et notamment avoir recours aux micro-arrays et protéo-arrays pour avoir une analyse précise de la réponse inflammatoire pour chaque espèce et chaque pathotype.

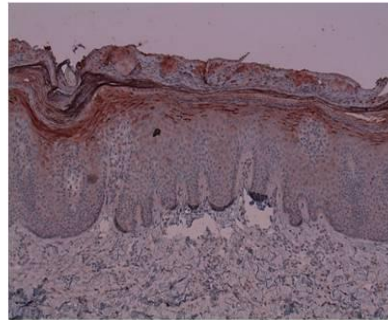
**A**

Peau normale



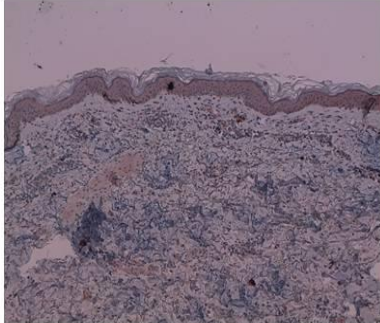
**B**

Psoriasis



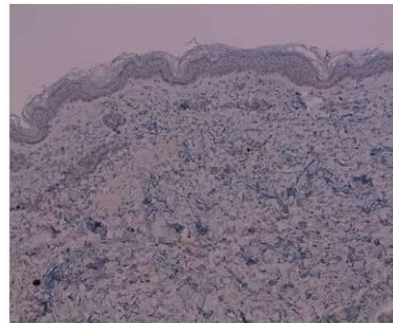
**C**

Érythème migrant



**D**

Érythème migrant



**Figure 51 : Coupes d'immunohistochimie provenant de biopsies cutanées de patients atteint par :**

A : aucune pathologie (sujet sain)

B : un psoriasis avec marquage par HBD-2

C : un érythème migrant avec marquage par HBD-2

D : un érythème migrant avec marquage par LL-37

L'étude avec la souche déficiente en OspC confirme le rôle d'OspC dans l'inflammation cutanée. OspC est un élément clé de l'inflammation des KCs comme le montre nos résultats sur le rôle de la lipoprotéine OspC dans l'inflammation (Marchal et coll., 2009). Son absence induit une plus faible expression d'IL-8 de pratiquement de 50%. Ceci indique qu'OspC n'est pas le seul antigène de *Borrelia* impliqué dans la réponse inflammatoire cutanée.

Enfin, les résultats préliminaires d'immunohistochimie sur des biopsies cutanées humaines de patients présentant un érythème migrant montrent une absence totale des PAMs testés, ce qui est en faveur de l'effet immunosuppresseur local potentiellement associé à la tique. Nous souhaitons développer cette approche sur un nombre plus important de biopsies afin de voir si l'absence de sécrétion des PAMs est un phénomène récurrent chez ces patients.

## Bibliographie

- Asbrink, E., B. Hederstedt, et coll. (1984). "The spirochetal etiology of erythema chronicum migrans Afzelius." Acta Derm Venereol **64**(4): 291-5.
- Asbrink, E., A. Hovmark, et coll. (1986). "Clinical manifestations of acrodermatitis chronica atrophicans in 50 Swedish patients." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A **263**(1-2): 253-61.
- Assous, M. V., D. Postic, et coll. (1993). "Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **12**(4): 261-8.
- Baranton, G., M. Assous, et coll. (1992). "[Three bacterial species associated with Lyme borreliosis. CLinical and diagnostic implications]." Bull Acad Natl Med **176**(7): 1075-85; discussion 1085-6.
- Baranton, G., S. J. De Martino. (2009). "*Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in humans". Curr Probl Dermatol **37** : 1-17.
- Busch, U., C. Hizo-Teufel, et coll. (1996). "Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR." J Clin Microbiol **34**(5): 1072-8.
- Fukunaga, M., K. Okada, et coll. (1996). "Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae." Int J Syst Bacteriol **46**(4): 898-905.
- Gern, L. (2009). "Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans." Curr. Probl. Dermatol **37**: 18-30.
- Hardin, J. A., A. C. Steere, et coll. (1984). "The pathogenesis of arthritis in Lyme disease: humoral immune responses and the role of intra-articular immune complexes." Yale J Biol Med **57**(4): 589-93.
- Jaulhac, B., R. Heller, et coll. (2000). "Direct molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in synovial samples from patients with lyme arthritis." J Clin Microbiol **38**(5): 1895-900.

- Le Fleche, A., D. Postic, et coll. (1997). "Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis." Int J Syst Bacteriol **47**(4): 921-5.
- Liu, A. Y., D. Destoumieux, et coll. (2002). "Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation." J Invest Dermatol **118**(2): 275-81.
- Pachner, A. R. (1989). "Neurologic manifestations of Lyme disease, the new "great imitator"." Rev Infect Dis **11 Suppl 6**: S1482-6.
- Richter, D., D. B. Schlee, et coll. (2004). "Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe." Appl Environ Microbiol **70**(11): 6414-9.
- Stanek, G., G. Wewalka, et coll. (1985). "Differences between Lyme disease and European arthropod-borne *Borrelia* infections." Lancet **1**(8425): 401.
- Stanek, G. and F. Strle (2003). "Lyme borreliosis." Lancet **362**(9396): 1639-47.
- Steere, A. C., W. P. Batsford, et coll. (1980). "Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease." Ann Intern Med **93**(1): 8-16.
- Steere, A. C., N. H. Bartenhagen, et coll. (1986). "Clinical manifestations of Lyme disease." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A **263**(1-2): 201-5.
- Steere, A. C. (1989). "Lyme disease." N Engl J Med **321**(9): 586-96.
- Steere, A. C. (1991). "Clinical definitions and differential diagnosis of Lyme arthritis." Scand J Infect Dis Suppl **77**: 51-4.
- Strle, F., E. Ruzic-Sabljić, et coll. (2006). "Comparison of findings for patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* isolated from cerebrospinal fluid." Clin Infect Dis **43**(6): 704-10.
- Wilske, B., V. Fingerle, et coll. (1994). "Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato." Med Microbiol Immunol **183**(1): 43-59.



# Chapitre 4

# Discussion

## L'importance des maladies à transmission vectorielle en santé humaine

Les entomologistes estiment à environ 14600 les espèces d'arthropodes hématophages, effectuant, plus ou moins régulièrement des repas sanguins sur des vertébrés, y compris sur l'homme. Seulement 2 à 3 % de ces arthropodes seraient des vecteurs de maladies humaines ou animales, mais ces affections figurent souvent parmi les plus redoutables auxquelles l'homme se trouve exposé. Les maladies à transmission vectorielle (bactériennes, parasitaires et virales) sont de nos jours une grande cause de mortalité dans le monde, notamment dans les pays du sud. Le paludisme demeure la maladie la plus répandue et la plus meurtrière. Entre 300 et 500 millions de personnes sont infectées et chaque année plus de 1,5 millions de personnes en décèdent, principalement des enfants résidant en Afrique subsaharienne (Breman et coll., 2004).

Les arthropodes hématophages acquièrent les agents infectieux (bactéries, parasites et virus) au cours d'un repas sanguin sur un hôte vertébré infecté. Les pathogènes se retrouvent alors au niveau du tube digestif de l'arthropode. Puis ils se dispersent, généralement via l'hémolymphe et vont migrer dans différents tissus de l'arthropode suivant un tropisme propre à chacun, le plus souvent dans les glandes salivaires. La durée du repas sanguin est variable selon les espèces, il ne dure que quelques minutes chez les insectes comme les moustiques à plusieurs jours chez les acariens comme les tiques. De nombreux micro-organismes ont adopté ce mode de dissémination par le jeu de l'évolution. On estime à environ 110 le nombre d'arbovirus (de l'anglais "arthropod-borne virus") pathogènes pour l'homme, présents généralement en milieu tropical et transmis par des moustiques et des tiques. Chaque année, la dengue, la fièvre jaune et l'encéphalite à tique touchent des dizaines de millions de personnes de par le monde. Une quarantaine d'agents infectieux sont à l'origine de maladies animales identifiées, susceptibles de poser de graves problèmes économiques. Parmi les bactéries à transmission vectorielle, un premier ensemble est constitué par les Rickettsies qui sont généralement transmises par les poux, les puces et les tiques. Un second ensemble comprend les spirochètes du genre *Borrelia* dont la plus répandue est *B. burgdorferi* responsable de la maladie de Lyme, transmise par les tiques. Des protozoaires parasites sont également transmis par des diptères hématophages. Les plus répandus sont les espèces de *Plasmodium*, dont 5 sont responsables du paludisme humain. Ils sont transmis par les anophèles femelles. Les autres protozoaires sont les leishmanies et les trypanosomes responsables des trypanosomiasés africaines et sud américaines (Levy et coll., 2006). Des helminthes sont également transmis par des arthropodes, comme les filaires.

## **Interface cutanée dans les maladies à transmission vectorielle: les cellules résidentes de la peau et l'immunité innée**

L'interface cutanée joue un rôle important pour ces maladies à transmission vectorielle (Frischknecht, 2007). La peau de l'hôte constitue le premier point de contact pour l'arthropode infecté. Les pièces piqueuses de l'arthropode ont la capacité de percer les tissus permettant ainsi aux pathogènes d'être inoculés directement dans la peau. Là, différents types cellulaires vont assurer un rôle essentiel dans l'immunité dont les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques dermiques (Randolf et coll., 2005 ; Sharp et coll., 2005 ; Kissenpfennig et Malissen, 2006). L'infection au point de piqûre entraîne également le recrutement de cellules circulantes comme les neutrophiles et les macrophages (Urban et coll. 2006).

Durant la transmission de la borréliose de Lyme chez l'homme, les spirochètes sont inoculés dans la peau 2 à 3 jours après le début de la piqûre et induisent une réponse inflammatoire locale (Crippa et coll., 2002; Hojgaard et coll., 2008). Les spirochètes disséminent ensuite par le sang et la lymphe vers les sites secondaires d'infections (Steere et coll., 1987). *B. burgdorferi* exprime à sa surface de nombreuses lipoprotéines. Elles sont principalement produites lors de l'infection chez le mammifère. Plusieurs de ces lipoprotéines activent directement les cellules effectrices de l'immunité. On observe le recrutement et l'activation de neutrophiles, de macrophages, de lymphocytes T et B, de cellules dendritiques, et de mastocytes (Yssel et coll., 1990 ; Montgomery et Malawista, 1996 ; Kang et coll., 1997 ; Wooten et Weis, 2001 ; Munson et coll., 2004 ; Amlong et coll., 2006). Une telle réponse inclut l'induction des médiateurs inflammatoires par les macrophages (Wooten et coll., 1998), l'expression des molécules d'adhésion et la production d'ions superoxide par les neutrophiles (Seifert et coll., 1990), l'induction de la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et l'augmentation des événements inflammatoires qui ont lieu en aval dans les cellules endothéliales (Burns et coll., 1997 ; Ebnet et coll., 1997), l'activation des mastocytes, la mitogénèse et la production d'immunoglobulines par les cellules B (Tai et coll., 1994 ; Wooten et coll., 1998). Les événements inflammatoires induits par ces lipoprotéines suggèrent la persistance de *B. burgdorferi* dans les tissus et pourraient contribuer à la pathologie tissulaire de la maladie de Lyme (Girschick et coll., 1996 ; 1999 ; Singh et coll., 2004).

Les connaissances sur la réponse immunitaire innée ont fortement progressé ces dernières années et soulignent son rôle essentiel dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Initialement, l'immunité innée était principalement associée à la voie alterne du complément,

aux cellules NK et aux cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) sécrétées par les cellules présentant l'antigène. On sait maintenant que le rôle de l'immunité innée s'étend à la reconnaissance spécifique des micro-organismes pathogènes via des protéines particulières, les PAMPs. Cette reconnaissance s'effectue via des récepteurs spécifiques : les TLRs (Janeway et Medzhitov, 2002). Par ailleurs, les PAMs, petites molécules cationiques à large spectre antimicrobien, sont également étudiés comme composants majeurs de la réponse immunitaire innée au niveau des épithélia et dans les polynucléaires neutrophiles chez les vertébrés (Urban et coll., 2006). Parmi les PAMs trouvés au niveau cutané, les cathélicidines et les défensines sécrétées par les KCs jouent un rôle majeur dans l'inflammation de la peau. Les cathélicidines et les défensines sont les PAMs les mieux caractérisés mais plus de 20 autres protéines ayant une activité antimicrobienne ont été identifiées au niveau cutané. Ils ne sont pas seulement bactéricides. Ainsi, ils peuvent avoir aussi des activités chimio-attractantes, induire la dégranulation des mastocytes, l'angiogenèse et la ré-épithélialisation lors d'une blessure (Gallo et Nizet, 2003 ; Ganz, 2003 ; Niyonsaba et coll., 2003). C'est de cette observation et de l'absence d'études sur le rôle des PAMs dans les maladies à transmission vectorielle que nous avons décidé de nous intéresser au rôle des PAMs de la peau lors de la borréliose de Lyme.

Les **KCs** sont les principales cellules de l'épiderme. Ils reconnaissent les pathogènes grâce aux récepteurs TLRs (Kawai et coll, 2002 ; Manukyan et coll, 2005 ; Lebre et coll, 2007). Une fois stimulés, ils libèrent des médiateurs inflammatoires comme les cytokines (l'IFN- $\alpha$ , le TNF- $\alpha$  (Zanetti, 2004)), les chimiokines (IL-8, CXCL16) via la voie NF- $\kappa$ B et des PAMs. Peu d'études ont été faites sur le rôle des KCs lors de la borréliose de Lyme. L'étude d'Ebnnet en 1997 a montré que les *Borrelia* induisent l'expression des chimiokines IL-8 et MCP-1. Dans ce travail, nous mettons en évidence que *B. burgdorferi*, mais aussi les lipoprotéines OspC et OspA, sont reconnus par les KCs, ce qui entraîne la production de molécules inflammatoires telles que les chimiokines IL-8 et MCP-1. Ces molécules ont aussi un puissant rôle chimio-attractant sur les cellules dendritiques et les neutrophiles. Les KCs induisent de manière précoce l'expression des PAMs : hBD-2, hBD-3, la RNase7, la psoriasine et la cathélicidine. Ils ne sont cependant pas bactéricides sur les spirochètes ce qui confirme des études récentes (Sambri et coll., 2002 ; Sarkar et coll., 2009). Les KCs possèdent ainsi, non seulement un rôle de barrière physique mais aussi un rôle immunitaire dans le contrôle de la borréliose de Lyme.

Les **FBs** ont un rôle dans la formation de la MEC. Les interactions FBs – KCs permettent une coopération qui facilite le processus de cicatrisation (Werner et coll., 2007). Cette coopération est également mise en évidence dans la borréliose de Lyme. Ainsi nos études de co-culture ou transfert de surnageants de culture ont montré que les FBs et les KCs interagissent ensemble pour permettre une meilleure réponse à *Borrelia*. Les FBs en présence de surnageant de KCs induisent plus fortement l'expression de MMPs, importantes pour *Borrelia* qui n'en exprime pas. *Borrelia* ou le dommage tissulaire induit par la tique lors de la piqûre induit l'expression de protéines inflammatoires par les KCs qui restent à déterminer. Des études ont montré que la communication FBs - KCs est régulée principalement par la libération de facteurs : les activines (Werner et Grose, 2003), le TGF- $\beta$  et le KCM (keratinocyte-conditioned medium) sécrétés par les KCs. Ils agissent sur l'expression de gènes de la MEC produits dans les FBs dermiques (Ralston et coll., 1997 ; Nowinski et coll., 2004 ; Harrison et coll., 2005 ; Ghaffari et coll., 2006). L'équipe de Ghaffari a identifié la stratifine comme un puissant médiateur de l'expression des MMPs dans les FBs dermiques (Ghaffari et coll., 2006). La stratifine induit l'expression des MMPs en se fixant à un récepteur encore inconnu qui stimule les voies d'activations des MAPK qui induit à son tour la transcription des gènes AP-1, c-Jun et c-fos. Ces facteurs induisent l'expression des MMPs. Des études sur des systèmes de co-culture FBs/KCs ont aussi identifié le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  comme régulateurs de la sécrétion des MMPs par les FBs, confirmant le rôle potentiel des KCs dans la régulation de la dégradation de la MEC et dans le remodelage tissulaire (Mackay et coll., 1992 ; Moon et coll., 2002 ; Kilani et coll., 2007). Nous avons mis en évidence que *Borrelia* induit l'expression des MMPs par les FBs et utilise aussi probablement ce système pour sa dissémination tissulaire en augmentant l'expression des MMP-3, MMP-9, MMP-14 et MMP-19 et en diminuant l'expression du collagène. Des chimiokines comme MCP-1 sont aussi sur-exprimées par *Borrelia*. Les FBs réagissent à la présence du pathogène et leur réponse est exacerbée par celles des KCs comme le montre nos études de transfert de surnageant. Il reste à étudier comment ces facteurs vont être régulés en présence de salive de tique.

Nous avons étudié deux cellules résidentes de la peau, les KCs et les FBs mais d'autres cellules sont présentes au niveau cutané. Les mastocytes sont des cellules qui peuvent être retrouvées dans l'ensemble du corps mais sont particulièrement concentrées à la surface des epithelia dont la peau. Ils libèrent divers médiateurs (histamine, leucotriènes, prostaglandines) en réponse à un stimulus extérieur et peuvent aussi produire de l'IL-4, de l'IL-8 et du TNF- $\alpha$  (Bradding et coll., 1993 ; Moller et coll., 1993). Peu d'études ont été faites sur l'interaction mastocytes - *Borrelia*.

Celle de Talkington en 1999 a montré que les mastocytes incubés avec des bactéries vivantes subissent une faible dégranulation et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-  $\alpha$ .

Quant aux cellules dendritiques (CDs), ce sont des cellules sentinelles du système immunitaire exprimant un large éventail de molécules à leur surface permettant de détecter la présence de pathogènes. Elles font partie des cellules présentatrices d'antigène et peuvent déclencher une réponse immunitaire adaptative en induisant la prolifération des lymphocytes T et B. Plusieurs études ont montré que les cellules dendritiques reconnaissent *Borrelia* et les internalisent (Filgueira et coll., 1996 ; Montgomery et Malawista, 1996 ; Moore et coll., 2007). Les CDs sont alors activées et induisent l'activation des lymphocytes T. Les lipoprotéines de *Borrelia* sont reconnues par le récepteur TLR-2 qui induit la maturation des CDs (Blander et Medzhitov, 2006). L'activation des CDs via TLR2 est importante dans la polarisation de la réponse Th1 des cellules T (Beermann et coll., 2000 ; Sieling et coll., 2003). L'induction par *Borrelia* des CDs stimule la production de l'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes mais aussi la sécrétion d'IL-8 (Suhonen et coll., 2003).

### ***Borrelia burgdorferi* sensu lato et organotropisme: rôle de l'interface cutanée?**

Parmi les spirochètes, le complexe *B. burgdorferi* sensu lato est responsable de la borréliose de Lyme (Le Fleche et coll., 1997 ; Richter et coll., 2004). Ce complexe comprend plus de 13 espèces de *Borrelia*. Trois d'entre elles sont clairement pathogènes pour l'homme : *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* et *B. garinii* (Baranton et coll., 1992 ; Baranton et De Martino, 2009). Elles peuvent générer un érythème migrant, lésion cutanée initiale, et peuvent ensuite se propager chez l'hôte pour infecter les tissus distants comme par exemple le système nerveux, les articulations ou la peau (Strle et Stanek, 2009). Les manifestations cliniques sont associées préférentiellement à l'une ou l'autre espèce de *Borrelia*. Ainsi il est admis que les *B. burgdorferi* ss entraînent plus fréquemment des arthrites (Steere et coll., 1986 ; Steere et coll., 1991), *B. garinii* des manifestations neurologiques (Wilske et coll., 1994) et *B. afzelii* des manifestations cutanées tardives (Bush et coll., 1996). Cependant l'association *B. burgdorferi* ss – arthrites en Europe n'est pas stricte. Chacune de ces espèces induit un pathotype préférentiel même s'il n'est pas exclusif. Il sera intéressant d'étudier plus en détail la réponse inflammatoire cutanée induite par les différentes espèces, afin de définir un rôle potentiel de la peau dans l'organotropisme observé. Les études préliminaires présentées dans ce travail n'ont pas montré

de différences significatives dans les réponses immunitaires en fonction des espèces de *Borrelia* et en fonction des souches pour les deux paramètres étudiés : l'IL-8 et hBD-2. Des études plus approfondies sont nécessaires par microarrays et proteinarrays notamment pour analyser le processus inflammatoire cutané dans sa globalité.

### **Pouvoir immunomodulateur de la salive des arthropodes dont la tique**

La salive des arthropodes est indispensable à la prise du repas sanguin. Pour Ribeiro (1995), les insectes hématophages ont développé au cours de leur évolution des constituants salivaires nécessaires pour lutter en permanence contre la réponse immunitaire de l'hôte vertébré à la piqûre. Les protéines salivaires présentent des propriétés variées : anti-hémostatiques, anti-inflammatoires et immunosuppressives. Certaines des protéines salivaires présentent des propriétés immunogéniques et sont capables de moduler la réponse immunitaire de l'hôte (Wikel, 1999 ; Ribeiro et coll., 2001 ; Ribeiro et Francischetti, 2003; Ribeiro et Valenzuela, 2003 ; Champagne, 2004 ; Schneider et coll., 2004 ; Wasserman et coll., 2004 ; Billingsley et coll., 2006 ; Calvo et coll., 2006 ; Calvo et Ribeiro, 2006 ; Ribeiro et coll., 2007). Elles créent un micro-environnement permissif à la transmission des pathogènes (Ribeiro, 1989 ; Kamhawi, 2000). Les interactions hôte/vecteur sont bien décrites pour certaines maladies dont la leishmaniose et la maladie de Lyme. L'étude de la réponse immunitaire spécifique aux protéines de la salive a montré l'importance de l'arthropode dans la pathogénicité des maladies à transmission vectorielle (Titus et coll., 2006; Hovius et coll., 2008). De nombreuses études ont montré l'influence de la piqûre du phlébotome, vecteur de la leishmaniose, sur l'immunomodulation cutanée locale (Mbow et coll., 1998 ; Gillespie et coll., 2000 ; Kamhawi, 2000). Les extraits salivaires totaux de phlébotomes inhibent une réponse protectrice de type Th1 par une inactivation des lymphocytes T (LT) et une baisse dans la production d'IL-12 et d'interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Titus et coll., 1994 ; Hall et Titus, 1995). De nombreux travaux sur l'influence immunomodulatrice de la salive ont mis en évidence le rôle d'un peptide, le Maxadilan (MAX), principal vasodilatateur de *Lutzomyia longipalpalis*, vecteur de la Leishmaniose dans le Nouveau Monde. Le MAX diminue ainsi la réponse Th1 et favorise une réponse Th2, ce qui permet la survie des leishmanies (Brodie et coll., 2007).

Les moustiques, autre vecteur important de pathologies humaines, secrètent aussi des protéines salivaires immunomodulatrices bien que le temps de prise du repas sanguin du moustique ne soit que de quelques minutes. L'inhibition de la réponse inflammatoire est caractérisée par une baisse de production de l'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  par les splénocytes activés (Cross et coll., 1994). Chez *Aedes* et *Culex*, le vasodilatateur sialokinine régulerait positivement la production d'IL-4 et d'IL-10 produit par les lymphocytes T, ce qui modifierait l'activation des macrophages et la présentation des antigènes (Zeidner et coll., 1999). D'autres études ont également décrit un rôle immunomodulateur de la salive d'*Anopheles* (Cross et coll., 1994 ; Schneider et coll., 2004 ; Billingsley et coll., 2006 ; Depinay et coll., 2006) dont un facteur chimio-attractant pour les neutrophiles expliquant leur présence importante au niveau de la piqûre (Owhashi et coll., 2001).

Chez les tiques, le rôle de la salive lors de la borréliose de Lyme est étudié depuis plusieurs années (Wikel, 1999). En 2001, l'équipe de Gillespie a caractérisé un ensemble de protéines de salive de tique. Un certain nombre de ces protéines n'a pas encore aujourd'hui de propriétés clairement identifiées. Parmi ces protéines, certaines possèdent des propriétés anti complément, d'autres jouent plus sur les cellules T ou B (Valenzuela et coll., 2000 ; Nunn et coll., 2005 ; Yu et coll., 2006 ; Schroder et coll., 2007). Des protéines d'*I. ricinus* et d'*I. scapularis* dont Salp15 montrent que *Borrelia* utilise cette protéine à ses propres fins (Ramamoorthi et coll., 2005). En effet *Borrelia* augmente spécifiquement l'expression de Salp15 dans les glandes salivaires. Un autre pathogène, *Anaplasma phagocytophilum* qui est aussi transmis par les tiques, n'induit pas l'expression de Salp15. Cette étude a aussi montré que cette protéine se fixe sur la lipoprotéine de surface OspC qui est nécessaire à la dissémination de la bactérie chez l'hôte (Ramamoorthi et coll., 2005). Ainsi *Borrelia* est protégée des anticorps de l'hôte et peut disséminer dans l'organisme. Salp15 agit également sur l'immunité adaptative de l'hôte en se fixant au co-récepteur CD4+ des cellules T ce qui entraîne une inhibition de la différenciation des cellules T en empêchant la synthèse d'IL-2 (Gillespie et coll., 2001 ; Anguita et coll., 2002 ; Lebouille et coll., 2002 ; Garg et coll., 2006). Cette protéine inhibe aussi la maturation des cellules dendritiques en se fixant spécifiquement sur les récepteurs DC-SIGN de ces cellules. Enfin au cours de l'immunité innée elle inhibe la voie alterne du complément (Hovius et coll., 2008). Dans notre travail, nous mettons en évidence un autre rôle de Salp15 dans l'immunité innée des KCs. Les extraits de glandes salivaires et Salp15 inhibent la réponse immunitaire innée en diminuant l'expression des PAMs normalement induits par *Borrelia* ou par la protéine de surface OspC. Des résultats préliminaires (Résultats publications I et IV) montrent un autre récepteur potentiel pour Salp15, le récepteur de l'IL-1 (l'IL-1R). D'autres protéines, autre que Salp15, ont probablement aussi un rôle dans



l'immunosuppression. Nous avons montré que un extrait de glandes salivaires de tique induit une forte immunosuppression qui ne se retrouve pas entièrement avec Salp15. La littérature a montré que *Borrelia* exprime un grand nombre de protéines ayant des propriétés immunosuppressives. Il serait étonnant que la tique n'ait développé qu'une seule protéine, Salp15, qui posséderait ce rôle. Des études par fractionnement HPLC de la salive sont en cours dans notre laboratoire pour tenter d'identifier d'autres protéines de tique à activités anti-inflammatoires et immunomodulatrices. Nous montrons également que l'interaction entre Salp15 et OspC est spécifique au récepteur TLR2. Un autre agoniste de TLR2, MALP2, ne modifie pas l'expression des PAMs, suggérant qu'OspC se fixe spécifiquement à Salp15 inhibant l'activation de la voie TLR2. La voie des TLRs est indispensable à la reconnaissance des *Borrelia*, mais celle des intégrines n'est pas à négliger comme le montrent des publications récentes (Behera et coll., 2006 ; 2008).

### **Effet "anti-alarmines" de la salive de tique**

Les PAMs ont un rôle chimio-attractant qui est inhibé par des extraits de glandes salivaires et par Salp15 (Résultats publication II, figure 6). Comme nous avons montré que les PAMs ne possèdent pas d'effets bactéricides sur *Borrelia*, nous proposons alors un effet anti-alarmine de la salive de tique ce qui permet une neutralisation des signaux de danger au niveau de la peau (Gallucci et Matzinger, 2001 ; Oppenheim et Yang, 2005 ; Oppenheim et coll., 2007 ; Gallo, 2008 ; Yang et coll., 2009). Le terme « alarmine » a été proposé en 2001 par Galucci et Matzinger pour définir des molécules ayant des capacités chimio-attractantes suite à une infection ou à un dommage tissulaire. Les alarmines regroupent un certain nombre de protéines ou peptides n'ayant pas de structures communes entre elles mais qui ont des propriétés similaires. A la différence des cytokines, elles peuvent être rapidement libérées par des leucocytes ou des cellules épithéliales et ont la capacité à attirer les CPAs. Elles peuvent faire le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Gallo, 2008 ; Haraldsen et coll., 2009 ; Yang et coll., 2009). De plus en plus de molécules sont caractérisées comme ayant des propriétés « alarmines ». Nous montrons ici que la salive de tique inhibe localement la signalisation et la migration cellulaire au cours des premiers jours de la piqûre. La tique peut ensuite inoculer la bactérie vers le deuxième ou le troisième jour du repas sanguin selon les espèces de *Borrelia* (Piesman et coll., 2003 ; Hojgaard et coll., 2008). La bactérie peut alors se multiplier localement dans la peau, disséminer par voie sanguine et atteindre les organes cibles.

## Vaccination et Borréliose de Lyme

La mise au point d'un vaccin contre les maladies à transmission vectorielle est délicate car ces maladies font intervenir 3 protagonistes : l'hôte vertébré, le vecteur et le pathogène. Cela est particulièrement vrai pour les maladies parasitaires pour lesquelles un seul vaccin est actuellement disponible. Un vaccin anti-*Babesia* a été développé chez le chien (Schetters et coll., 2006 ; 2007), qui est dirigé contre des antigènes parasitaires solubles de *B. canis* et *B. rossi*. Une approche intéressante concerne les vaccins bloquant la transmission des pathogènes. Cette approche vise à stimuler la réponse immunitaire 1) contre le stade parasitaire qui infecte le vecteur ou 2) contre le vecteur lui-même. L'immunité anti-vecteur a été en premier démontrée en 1939 contre *Dermacentor variabilis* par immunisation d'animaux avec des extraits de tiques (Trager, 1939). En médecine vétérinaire, des vaccins contre les diptères hématophages ont été considérés dans les années 1970 quand il a été montré que l'inoculation d'extraits de moustiques et de mouches chez des modèles animaux pouvait inhiber la prise du repas de sang. Ces vaccins diminuent la durée du repas sanguin, la fécondité des femelles et peuvent induire la mortalité du vecteur (Léal et coll., 2006). Un vaccin le « Lymerix » a été développé contre la maladie de Lyme. Ce vaccin était dirigé contre la lipoprotéine OspA mais fut retiré du marché à la suite de nombreux effets secondaires (Nigrovic et Thompson, 2007).

Un vaccin combinant des protéines de salive d'arthropodes et des protéines du pathogène semble actuellement constituer une approche rationnelle pour la mise au point de vaccin dans les maladies à transmission vectorielle, dont la borréliose de Lyme.

# Chapitre 5

## Bibliographie

## Liste des publications

- Aarabi, S., M. T. Longaker, et coll. (2007). "Hypertrophic scar formation following burns and trauma: new approaches to treatment." PLoS Med **4**: e234.
- Aarbiou, J., R. M. Verhoosel, et coll. (2004). "Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression *in vitro*." Am J Respir Cell Mol Biol **30**: 193-201.
- Abiko, Y., M. Nishimura, et coll. (2003). "Upregulated expression of human beta defensin-1 and -3 mRNA during differentiation of keratinocyte immortalized cell lines, HaCaT and PHK16-0b." J Dermatol Sci **31**: 225-8.
- Agerberth, B., J. Charo, et coll. (2000). "The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations." Blood **96**: 3086-93.
- Ai, C. X., W. F. Zhang, et coll. (1994). "Sero-epidemiology of Lyme disease in an endemic area in China." Microbiol Immunol **38**: 505-9.
- Alexopoulou, L., V. Thomas, et coll. (2002). "Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice." Nat Med **8**: 878-84.
- Ali, M. F., A. Soto, et coll. (2001). "Antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the diploid frog, *Xenopus tropicalis* (Pipidae)." Biochim Biophys Acta **1550**: 81-9.
- Alverson, J., S. F. Bundle, et coll. (2003). "Transcriptional regulation of the ospAB and ospC promoters from *Borrelia burgdorferi*." Mol Microbiol **48**: 1665-77.
- Amlong, C. A., D. T. Nardelli, et coll. (2006). "Anti-interleukin-15 prevents arthritis in *Borrelia*-vaccinated and -infected mice." Clin Vaccine Immunol **13**: 289-96.
- Andrei, G., J. van den Oord, et coll. (2005). "Organotypic epithelial raft cultures as a model for evaluating compounds against alphaherpesviruses." Antimicrob Agents Chemother **49**: 4671-80.
- Anguita, J., N. Ramamoorthi, et coll. (2002). "Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation." Immunity **16**: 849-59.
- Arend, W.P., C.J. Guthridge. (2000). "Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms." Ann Rheum Dis **59** Suppl 1:i60-4.
- Asahina, A., K. Tamaki. (2006). "Role of Langerhans cells in cutaneous protective immunity: is the reappraisal necessary?" J Dermatol Sci **44**:1-9.
- Asbrink, E., B. Hederstedt, et coll. (1984). "The spirochetal etiology of erythema chronicum migrans Afzelius." Acta Derm Venereol **64**: 291-5.
- Asbrink, E., A. Hovmark, et coll. (1986). "Clinical manifestations of acrodermatitis chronica atrophicans in 50 Swedish patients." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A **263**: 253-61.
- Assous, M. V., D. Postic, et coll. (1993). "Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **12**: 261-8.
- Attie, O., J. F. Bruno, et coll. (2007). "Co-evolution of the outer surface protein C gene (ospC) and intraspecific lineages of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in the northeastern United States." Infect Genet Evol **7**(1): 1-12.
- Bals, R., M. J. Goldman, et coll. (1998). "Mouse beta-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract." Infect Immun **66**: 1225-32.

- Baranton, G., M. Assous, et coll. (1992). "Three bacterial species associated with Lyme borreliosis. CLinical and diagnostic implications." Bull Acad Natl Med **176**: 1075-85; discussion 1085-6.
- Baranton, G., S. J. De Martino. (2009). "*Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in humans". Curr Probl Dermatol **37** : 1-17.
- Barbour, A. G., S. L. Tessier, et coll. (1983). "Lyme disease spirochetes and ixodid tick spirochetes share a common surface antigenic determinant defined by a monoclonal antibody." Infect Immun **41**(2): 795-804.
- Barbour, A. G. (1988). "Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent." J Clin Microbiol **26**: 475-8.
- Barrientos, S., O. Stojadinovic, et coll. (2008). "Growth factors and cytokines in wound healing." Wound Repair Regen **16**: 585-601.
- Batsford, S., J. Dunn et coll. (2004). "Outer surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* vary in their ability to induce experimental joint injury." Arthritis Rheum **50**:2360-9.
- Baumgarth, N. and C. L. Bevins (2007). "Autoimmune disease: skin deep but complex." Nature **449**: 551-3.
- Beaufays, J., B. Adam, et coll. (2008). "*Ixodes ricinus* tick lipocalins: identification, cloning, phylogenetic analysis and biochemical characterization." PLoS ONE **3**: e3941.
- Beaufays, J., B. Adam, et coll. (2008). "Ir-LBP, an *ixodes ricinus* tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function." PLoS ONE **3**: e3987.
- Becker, M., J. Bunikis, et coll. (2005). "Structural investigation of *Borrelia burgdorferi* OspB, a bactericidal Fab target." J Biol Chem **280**: 17363-70.
- Beermann, C., H. Wunderli-Allenspach, et coll. (2000). "Lipoproteins from *Borrelia burgdorferi* applied in liposomes and presented by dendritic cells induce CD8(+) T-lymphocytes *in vitro*." Cell Immunol **201**: 124-31.
- Behera, A. K., E. Hildebrand, et coll. (2005). "Induction of host matrix metalloproteinases by *Borrelia burgdorferi* differs in human and murine lyme arthritis." Infect Immun **73**: 126-34.
- Behera, A. K., E. Hildebrand, et coll. (2006). "Identification of a TLR-independent pathway for *Borrelia burgdorferi*-induced expression of matrix metalloproteinases and inflammatory mediators through binding to integrin alpha 3 beta 1." J Immunol **177**: 657-64.
- Behera, A. K., E. Durand, et coll. (2008). "*Borrelia burgdorferi* BBB07 interaction with integrin alpha3beta1 stimulates production of pro-inflammatory mediators in primary human chondrocytes." Cell Microbiol **10**: 320-31.
- Belisle, J. T., M. E. Brandt, et coll. (1994). "Fatty acids of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins." J Bacteriol **176**: 2151-7.
- Berglund, J., R. Eitrem, et coll. (1995). "An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden." N Engl J Med **333**: 1319-27.
- Bergstrom, S., V. G. Bundoc, et coll. (1989). "Molecular analysis of linear plasmid-encoded major surface proteins, OspA and OspB, of the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*." Mol Microbiol **3**: 479-86.
- Benach, J. L., E. M. Bosler, et coll. (1983). "Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease." N Engl J Med **308**: 740-2.
- Bevins, C. L., D. E. Jones, et coll. (1996). "Human enteric defensin genes: chromosomal map position and a model for possible evolutionary relationships." Genomics **31**: 95-106.
- Beytout J, D'Incan M. (1999). "Maladie de Lyme: y penser pour la traiter !." Rev Prat Med Gen **13** : 71-74.

- Bianchi, ME. (2007). "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger". J. Leukoc. Biol. **81**: 1-5.
- Billingsley, P. F., J. Baird, et coll. (2006). "Immune interactions between mosquitoes and their hosts." Parasite Immunol **28**: 143-53.
- Biragyn, A., M. Surenhu, et coll. (2001). "Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens." J Immunol **167**: 6644-53.
- Birchler, T., R. Seibl, et coll. (2001). "Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein." Eur J Immunol **31**: 3131-7.
- Black, A. P., L. Jones, et coll. (2009). "Immune evasion during *varicella* zoster virus infection of keratinocytes." Clin Exp Dermatol.
- Blander, J. M. and R. Medzhitov (2006). "Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells." Nature **440**: 808-12.
- Blankenvoorde, M. F., W. van't Hof, et coll. (1998). "Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen *Porphyromonas gingivalis*." Biol Chem **379**: 1371-5.
- Bockenstedt, L. K., N. Liu, et coll. (2006). "MyD88 deficiency enhances acquisition and transmission of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes scapularis* ticks." Infect Immun **74**(4): 2154-60.
- Bollinger Bollag, W. and R. J. Bollag (2001). "1,25-Dihydroxyvitamin D(3), phospholipase D and protein kinase C in keratinocyte differentiation." Mol Cell Endocrinol **177**: 173-82.
- Bolz, D. D., R. S. Sundsbak, et coll. (2004). "MyD88 plays a unique role in host defense but not arthritis development in Lyme disease." J Immunol **173**: 2003-10.
- Boniotto, M., W. J. Jordan, et coll. (2006). "Human beta-defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells." Antimicrob Agents Chemother **50**: 1433-41.
- Borradori, L. and A. Sonnenberg (1999). "Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes." J Invest Dermatol **112**: 411-8.
- Boughan, P. K., R. H. Argent, et coll. (2006). "Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection." J Biol Chem **281**: 11637-48.
- Bowman, A. S., C. L. Gengler, et coll. (1997). "A novel phospholipase A2 activity in saliva of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.)." Exp Parasitol **87**: 121-32.
- Bradding, P., I. H. Feather, et coll. (1993). "Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation." J Immunol **151**: 3853-65.
- Braff, M. H., A. Di Nardo, et coll. (2005). "Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies." J Invest Dermatol **124**: 394-400.
- Braff, M.H., R.L. Gallo. (2006). "Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier." Curr Top Microbiol Immunol **306**:91-110.
- Braff, M. H., A. L. Jones, et coll. (2007). "*Staphylococcus aureus* exploits cathelicidin antimicrobial peptides produced during early pneumonia to promote staphylokinase-dependent fibrinolysis." J Infect Dis **195**: 1365-72.
- Brandt, M. E., B. S. Riley, et coll. (1990). "Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins." Infect Immun **58**: 983-91.
- Braun, V. (1975). "Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta **415**: 335-77.

- Breman, J. G., M. S. Alilio, et coll. (2004). "Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary." Am J Trop Med Hyg **71**: 1-15.
- Brehmer-Andersson, E., A. Hovmark, et coll. (1998). "Acrodermatitis chronica atrophicans: histopathologic findings and clinical correlations in 111 cases." Acta Derm Venereol **78**: 207-13.
- Brissette, C.A., S.A. Lukehart (2007). "Mechanisms of decreased susceptibility to beta- defensins by *Treponema denticola*." Infect Immun **75**:2307-15.
- Brodie, T. M., M. C. Smith, et coll. (2007). "Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages." Infect Immun **75**: 2359-65.
- Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" Nat Rev Microbiol **3**: 238-50.
- Brossard, M. and S. K. Wikel (2004). "Tick immunobiology." Parasitology **129 Suppl**: S161-76.
- Brown, E. L., B. P. Guo, et coll. (1999). "Adherence of *Borrelia burgdorferi*. Identification of critical lysine residues in DbpA required for decorin binding." J Biol Chem **274**: 26272-8.
- Buchau, A. S., M. Hassan, et coll. (2007). "S100A15, an antimicrobial protein of the skin: regulation by *E. coli* through Toll-like receptor 4." J Invest Dermatol **127**: 2596-604.
- Burgdorfer, W., A. G. Barbour, et coll. (1982). "Lyme disease-a tick-borne spirochetosis?" Science **216**: 1317-9.
- Burns, E. H., Jr., A. M. Marciel, et coll. (1997). "Structure-function and pathogenesis studies of *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease." Adv Exp Med Biol **418**: 589-92.
- Busch, U., C. Hizo-Teufel, et coll. (1996). "Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR." J Clin Microbiol **34**: 1072-8.
- Byram, R., P. E. Stewart, et coll. (2004). "The essential nature of the ubiquitous 26-kilobase circular replicon of *Borrelia burgdorferi*." J Bacteriol **186**: 3561-9.
- Caccavo, D., N. M. Pellegrino, et coll. (2002). "Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application." J Endotoxin Res **8**: 403-17.
- Caimano, M. J., C. H. Eggers, et coll. (2005). "Alternate sigma factor RpoS is required for the in vivo-specific repression of *Borrelia burgdorferi* plasmid lp54-borne ospA and lp6.6 genes." J Bacteriol **187**: 7845-52.
- Calvo, E. and J. M. Ribeiro (2006). "A novel secreted endonuclease from *Culex quinquefasciatus* salivary glands." J Exp Biol **209**(Pt 14): 2651-9.
- Calvo, E., V. M. Pham, et coll. (2006). "The sialotranscriptome of adult male *Anopheles gambiae* mosquitoes." Insect Biochem Mol Biol **36**: 570-5.
- Candi, E., R. Schmidt, et coll. (2005). "The cornified envelope: a model of cell death in the skin." Nat Rev Mol Cell Biol **6**: 328-40.
- Carroll, M. C. (1998). "The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity." Annu Rev Immunol **16**: 545-68.
- Casjens, S., N. Palmer, et coll. (2000). "A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*." Mol Microbiol **35**: 490-516.

- Chadebech, P., D. Goidin, et coll. (2003). "Use of human reconstructed epidermis to analyze the regulation of beta-defensin hBD-1, hBD-2, and hBD-3 expression in response to LPS." Cell Biol Toxicol **19**: 313-24.
- Chambaud, I., H. Wroblewski, et coll. (1999). "Interactions between *mycoplasma* lipoproteins and the host immune system." Trends Microbiol **7**: 493-9.
- Champagne, D. E. (2004). "Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods." Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord **4**: 375-96.
- Chen, V. L., D. S. France, et coll. (1986). "De novo synthesis of lysozyme by human epidermal cells." J Invest Dermatol **87**: 585-7.
- Chen, X., F. Niyonsaba, et coll. (2005). "Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*." J Dermatol Sci **40**: 123-32.
- Chen, X., F. Niyonsaba, et coll. (2007). "Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability." Eur J Immunol **37**: 434-44.
- Chmielowiec, J., M. Borowiak, et coll. (2007). "c-Met is essential for wound healing in the skin." J Cell Biol **177**: 151-62.
- Chong, K.T., L. Xiang et coll. (2006). "High level expression of human epithelial beta- defensins (hBD-1, 2 and 3) in papillomavirus induced lesions." Virology **3**:75-80.
- Chung, W. O., S. R. Hansen, et coll. (2004). "Protease-activated receptor signaling increases epithelial antimicrobial peptide expression." J Immunol **173**: 5165-70.
- Ciprandi, A., S. K. de Oliveira, et coll. (2006). "*Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor." Exp Parasitol **114**: 40-6.
- Coburn, J., J. M. Leong, et coll. (1993). "Integrin alpha IIb beta 3 mediates binding of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* to human platelets." Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 7059-63.
- Coburn, J., S. W. Barthold, et coll. (1994). "Diverse Lyme disease spirochetes bind integrin alpha IIb beta 3 on human platelets." Infect Immun **62**: 5559-67.
- Coburn, J., L. Magoun, et coll. (1998). "Integrins alpha(v)beta3 and alpha5beta1 mediate attachment of lyme disease spirochetes to human cells." Infect Immun **66**: 1946-52.
- Coburn, J. (2001). "Adhesion mechanisms of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*." Curr Drug Targets Infect Disord **1**: 171-9.
- Coburn, J. and C. Cugini (2003). "Targeted mutation of the outer membrane protein P66 disrupts attachment of the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*, to integrin alphavbeta3." Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 7301-6.
- Coburn, J., J. R. Fischer, et coll. (2005). "Solving a sticky problem: new genetic approaches to host cell adhesion by the Lyme disease spirochete." Mol Microbiol **57**: 1182-95.
- Cole, A. M., J. Shi, et coll. (2001). "Inhibition of neutrophil elastase prevents cathelicidin activation and impairs clearance of bacteria from wounds." Blood **97**(1): 297-304.
- Coleman, J. L., J. A. Gebbia, et coll. (1997). "Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice." Cell **89**: 1111-9.
- Coleman, J. L., E. J. Roemer, et coll. (1999). "Plasmin-coated *borrelia Burgdorferi* degrades soluble and insoluble components of the mammalian extracellular matrix." Infect Immun **67**: 3929-36.
- Coleman, J. L. and J. L. Benach (2000). "The generation of enzymatically active plasmin on the surface of spirochetes." Methods **21**: 133-41.



- Collier, I. E., S. M. Wilhelm, et coll. (1988). "H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen." J Biol Chem **263**: 6579-87.
- Cowland, J. B., A. H. Johnsen, et coll. (1995). "hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules." FEBS Lett **368**(1): 173-6.
- Cowland, J. B. and N. Borregaard (1999). "The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules." J Leukoc Biol **66**: 989-95.
- Crandall, H., D. M. Dunn, et coll. (2006). "Gene expression profiling reveals unique pathways associated with differential severity of lyme arthritis." J Immunol **177**: 7930-42.
- Crippa, M., O. Rais, et coll. (2002). "Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks." Vector Borne Zoonotic Dis **2**(1): 3-9.
- Cross, M. L., E. W. Cupp, et coll. (1994). "Modulation of murine cellular immune responses and cytokines by salivary gland extract of the black fly *Simulium vittatum*." Trop Med Parasitol **45**: 119-24.
- Crother, T. R., C. I. Champion, et coll. (2004). "Temporal analysis of the antigenic composition of *Borrelia burgdorferi* during infection in rabbit skin." Infect Immun **72**: 5063-72.
- Crowley, H. and B. T. Huber (2003). "Host-adapted *Borrelia burgdorferi* in mice expresses OspA during inflammation." Infect Immun **71**: 4003-10.
- Cumberbatch, M., R. J. Dearman, et coll. (2000). "Regulation of epidermal Langerhans cell migration by lactoferrin." Immunology **100**: 21-8.
- Das, S., G. Banerjee, et coll. (2001). "Salp25D, an *Ixodes scapularis* antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands." J Infect Dis **184**: 1056-64.
- Davidson, D. J., A. J. Currie, et coll. (2004). "The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization." J Immunol **172**: 1146-56.
- Dennis, V. A., S. Dixit, et coll. (2009). "Live *Borrelia burgdorferi* spirochetes elicit inflammatory mediators from human monocytes via the Toll-like receptor signaling pathway." Infect Immun **77**: 1238-45.
- Depinay, N., F. Hacini, et coll. (2006). "Mast cell-dependent down-regulation of antigen-specific immune responses by mosquito bites." J Immunol **176**(7): 4141-6.
- Deruaz, M., A. Frauenschuh, et coll. (2008). "Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity." J Exp Med **205**: 2019-31.
- de Silva, A. M., S. R. Telford, 3rd, et coll. (1996). "*Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine." J Exp Med **183**: 271-5.
- de Silva, A. M., D. Fish, et coll. (1997). "OspA antibodies inhibit the acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes* ticks." Infect Immun **65**: 3146-50.
- de Silva, A. M., N. S. Zeidner, et coll. (1999). "Influence of outer surface protein A antibody on *Borrelia burgdorferi* within feeding ticks." Infect Immun **67**: 30-5.
- Di Nardo, A., A. Vitiello, et coll. (2003). "Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide." J Immunol **170**: 2274-8.
- Domachowske, J. B., K. D. Dyer, et coll. (1998). "Recombinant human eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus." J Infect Dis **177**: 1458-64.

- Dorschner, R. A., V. K. Pestonjamas, et coll. (2001). "Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*." J Invest Dermatol **117**: 91-7.
- Dumitriu, I. E., P. Baruah, et coll. (2005). "HMGB1: guiding immunity from within." Trends Immunol **26**: 381-7.
- Dunsche, A., Y. Acil, et coll. (2002). "The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues." Eur J Oral Sci **110**: 121-4.
- Durr, U. H., U. S. Sudheendra, et coll. (2006). "LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides." Biochim Biophys Acta **1758**: 1408-25.
- Ebnet, K., K. D. Brown, et coll. (1997). "*Borrelia burgdorferi* activates nuclear factor-kappa B and is a potent inducer of chemokine and adhesion molecule gene expression in endothelial cells and fibroblasts." J Immunol **158**: 3285-92.
- Eicken, C., V. Sharma, et coll. (2001). "Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein C from *Borrelia burgdorferi*." J Biol Chem **276**: 10010-5.
- Egawa, N., N. Koshikawa, et coll. (2006). "Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) cleaves and releases a 22-kDa extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) fragment from tumor cells." J Biol Chem **281**(49): 37576-85.
- Fang, X. M., Q. Shu, et coll. (2003). "Differential expression of alpha- and beta-defensins in human peripheral blood." Eur J Clin Invest **33**: 82-7.
- Feng, Z., B. Jiang, et coll. (2005). "Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by *Candida albicans*." J Dent Res **84**: 445-50.
- Ferguson, J. J. and M. Zaqq (1999). "Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists: current concepts and future directions." Drugs **58**: 965-82.
- Fikrig, E., W. Feng, et coll. (2000). "Arthropod- and host-specific *Borrelia burgdorferi* bbk32 expression and the inhibition of spirochete transmission." J Immunol **164**: 5344-51.
- Fikrig, E., S. Narasimhan (2006). "*Borrelia burgdorferi*- travelling incognito?" Microbes and infection **8**:1390-9.
- Filgueira, L., F. O. Nestle, et coll. (1996). "Human dendritic cells phagocytose and process *Borrelia burgdorferi*." J Immunol **157**(7): 2998-3005.
- Fini, M. E., J. R. Cook, et coll. (1998). "Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair." Arch Dermatol Res **290 Suppl**: S12-23.
- Fischer, J. R., N. Parveen, et coll. (2003). "Decorin-binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type-specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete." Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 7307-12.
- Fleischmajer, R., A. Utani, et coll. (1998). "Initiation of skin basement membrane formation at the epidermo-dermal interface involves assembly of laminins through binding to cell membrane receptors." J Cell Sci **111**: 1929-40.
- Flower, D. R., A. C. North, et coll. (1993). "Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins." Protein Sci **2**: 753-61.
- Flower, D. R. (1996). "The lipocalin protein family: structure and function." Biochem J **318**: 1-14.
- Francischetti, I. M., J. G. Valenzuela, et coll. (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**: 3602-12.
- Francischetti, I. M., T. N. Mather, et coll. (2003). "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 **305**: 869-75.

- Francischetti, I. M., T. N. Mather, et coll. (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**: 886-98.
- Fraser, C. M., S. Casjens, et coll. (1997). "Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*." Nature **390**: 580-6.
- Frauenschuh, A., C. A. Power, et coll. (2007). "Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*." J Biol Chem **282**: 27250-8.
- Frischknecht, F. (2007). "The skin as interface in the transmission of arthropod-borne pathogens." Cell Microbiol **9**: 1630-40.
- Frohm, M., H. Gunne, et coll. (1996). "Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid." Eur J Biochem **237**: 86-92.
- Frohm, M., B. Agerberth, et coll. (1997). "The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders." J Biol Chem **272**: 15258-63.
- Froy, O. (2005). "Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways." Cell Microbiol **7**: 1387-97.
- Fujisawa, H., S. Kondo, et coll. (1997). "The expression and modulation of IFN-alpha and IFN-beta in human keratinocytes." J Interferon Cytokine Res **17**: 721-5.
- Fukunaga, M., K. Okada, et coll. (1996). "Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae." Int J Syst Bacteriol **46**: 898-905.
- Gaggar, A., P. L. Jackson, et coll. (2008). "A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation." J Immunol **180**: 5662-9.
- Gallo, R. L., M. Ono, et coll. (1994). "Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds." Proc Natl Acad Sci U S A **91**: 11035-9.
- Gallo, R. L. and V. Nizet (2003). "Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease." Curr Allergy Asthma Rep **3**: 402-9.
- Gallo, R. L. (2008). "Sounding the alarm: multiple functions of host defense peptides." J Invest Dermatol **128**: 5-6.
- Gallucci, S. and P. Matzinger (2001). "Danger signals: SOS to the immune system." Curr Opin Immunol **13**: 114-9.
- Ganz, T. and R. I. Lehrer (1998). "Antimicrobial peptides of vertebrates." Curr Opin Immunol **10**: 41-4.
- Ganz, T. (2003). "Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity." Nat Rev Immunol **3**: 710-20.
- Garg, R., I. J. Juncadella, et coll. (2006). "Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15." J Immunol **177**: 6579-83.
- Garcia, J. R., F. Jaumann, et coll. (2001). "Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction." Cell Tissue Res **306**: 257-64.
- Garin (1922). "Paralysie par les tiques." J. Méd. Lyon **3**: 765-767
- Gartner, L. P. e. H., J. L. (1992). Atlas d'histologie, 2e ed. Bruxelles: De Boeck-Wesmael.
- Gay, N. J. and M. Gangloff (2007). "Structure and function of Toll receptors and their ligands." Annu Rev Biochem **76**: 141-65.

- Ge, Y., C. Li, et coll. (1998). "Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*." J Bacteriol **180**: 2418-25.
- Gebbia, J. A., J. L. Coleman, et coll. (2001). "*Borrelia* spirochetes upregulate release and activation of matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) and collagenase 1 (MMP-1) in human cells." Infect Immun **69**: 456-62.
- Geissmann, F., C. Prost, et coll. (1998). "Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells." J Exp Med **187**: 961-6.
- Gennaro, R., B. Skerlavaj, et coll. (1989). "Purification, composition, and activity of two bactenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils." Infect Immun **57**: 3142-6.
- Geras, A. J., *Dermatology, a medical artist's interpretation*. Basle: Sandoz Medical Publications. 1990, 139 pages.
- Gern, L. (2009). "Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans." Curr. Probl. Dermatol **37**: 18-30.
- Ghaffari, A., Y. Li, et coll. (2006). "Fibroblast extracellular matrix gene expression in response to keratinocyte-releasable stratifin." J Cell Biochem **98**: 383-93.
- Giambartolomei, G. H., V. A. Dennis, et coll. (1999). "Induction of pro- and anti-inflammatory cytokines by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins in monocytes is mediated by CD14." Infect Immun **67**: 140-7.
- Gilfillan, A. M. and C. Tkaczyk (2006). "Integrated signalling pathways for mast-cell activation." Nat Rev Immunol **6**: 218-30.
- Gillespie, R. D., M. L. Mbow, et coll. (2000). "The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva." Parasite Immunol **22**: 319-31.
- Gillespie, R. D., M. C. Dolan, et coll. (2001). "Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*." J Immunol **166**: 4319-26.
- Girschick, H. J., H. I. Huppertz, et coll. (1996). "Intracellular persistence of *Borrelia burgdorferi* in human synovial cells." Rheumatol Int **16**: 125-32.
- Girschick, H. J., S. Meister, et coll. (1999). "*Borrelia burgdorferi* downregulates ICAM-1 on human synovial cells in vitro." Cell Adhes Commun **7**: 73-83.
- Glaser, R., J. Harder, et coll. (2005). "Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection." Nat Immunol **6**: 57-64.
- Goldman, M. J., G. M. Anderson, et coll. (1997). "Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis." Cell **88**: 553-60.
- Golec, M. (2007). "Cathelicidin LL-37: LPS-neutralizing, pleiotropic peptide." Ann Agric Environ Med **14**: 1-4.
- Grimm, D., A. F. Elias, et coll. (2003). "Plasmid stability during *in vitro* propagation of *Borrelia burgdorferi* assessed at a clonal level." Infect Immun **71**: 3138-45.
- Grimm, D., K. Tilly, et coll. (2004). "Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 3142-7.
- Grutkoski, P. S., C. T. Graeber, et coll. (2003). "Alpha-defensin 1 (human neutrophil protein 1) as an antichemotactic agent for human polymorphonuclear leukocytes." Antimicrob Agents Chemother **47**(8): 2666-8.
- Gudmundsson, G. H., K. P. Magnusson, et coll. (1995). "Structure of the gene for porcine peptide antibiotic PR-39, a cathelin gene family member: comparative mapping of the locus for the human peptide antibiotic FALL-39." Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 7085-9.

- Gudmundsson, G. H., B. Agerberth, et coll. (1996). "The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes." Eur J Biochem **238**: 325-32.
- Gudmundsson, G. H. and B. Agerberth (1999). "Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system." J Immunol Methods **232**: 45-54.
- Guerau-de-Arellano, M., T.B., Huber (2005). "Chemokines and Toll-like receptors in Lyme disease pathogenesis." Trends Mol Med **11**:114-20.
- Guo, B. P., E. L. Brown, et coll. (1998). "Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*." Mol Microbiol **30**: 711-23.
- Haile, W. B., J. L. Coleman, et coll. (2006). "Reciprocal upregulation of urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-2, by *Borrelia burgdorferi* affects bacterial penetration and host-inflammatory response." Cell Microbiol **8**: 1349-60.
- Hajnicka, V., P. Kocakova, et coll. (2001). "Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts." Parasite Immunol **23**: 483-9.
- Hajnicka, V., I. Vancova, et coll. (2005). "Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission." Parasitology **130**: 333-42.
- Hall, L. R. and R. G. Titus (1995). "Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production." J Immunol **155**: 3501-6.
- Hannier, S., J. Liversidge, et coll. (2004). "Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission." Immunology **113**: 401-8.
- Hantke, K. and V. Braun (1973). "Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane." Eur J Biochem **34**: 284-96.
- Haraldsen, G., J. Balogh, et coll. (2009). "Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin?" Trends Immunol **30**(5): 227-33.
- Harder, J., J. Bartels, et coll. (1997). "A peptide antibiotic from human skin." Nature **387**: 861.
- Harder, J., R. Siebert, et coll. (1997). "Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1." Genomics **46**: 472-5.
- Harder, J., U. Meyer-Hoffert, et coll. (2000). "Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia." Am J Respir Cell Mol Biol **22**: 714-21.
- Harder, J., J. Bartels, et coll. (2001). "Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic." J Biol Chem **276**: 5707-13.
- Harder, J. and J. M. Schroder (2002). "RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin." J Biol Chem **277**: 46779-84.
- Harder, J., U. Meyer-Hoffert, et coll. (2004). "Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid." J Invest Dermatol **123**: 522-9.
- Harder, J. and J. M. Schroder (2005). "Antimicrobial peptides in human skin." Chem Immunol Allergy **86**: 22-41.
- Hardin, J. A., A. C. Steere, et coll. (1984). "The pathogenesis of arthritis in Lyme disease: humoral immune responses and the role of intra-articular immune complexes." Yale J Biol Med **57**: 589-93.

- Harrison, C. A., A. J. Dalley, et coll. (2005). "A simple *in vitro* model for investigating epithelial/mesenchymal interactions: keratinocyte inhibition of fibroblast proliferation and fibronectin synthesis." Wound Repair Regen **13**: 543-50.
- Hart BL. Role of Grooming in Biological Control of Ticks. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 916 : 565-569.
- Harwig, S. S., N. P. Chen, et coll. (1993). "Purification of cysteine-rich bioactive peptides from leukocytes by continuous acid-urea-polyacrylamide gel electrophoresis." Anal Biochem **208**: 382-6.
- Hase, K., L. Eckmann, et coll. (2002). "Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium." Infect Immun **70**: 953-63.
- Haupt, K., P. Kraiczy, et coll. (2007). "Binding of human factor H-related protein 1 to serum-resistant *Borrelia burgdorferi* is mediated by borrelial complement regulator-acquiring surface proteins." J Infect Dis **196**(1): 124-33.
- Hawlish, H. and J. Kohl (2006). "Complement and Toll-like receptors: key regulators of adaptive immune responses." Mol Immunol **43**: 13-21.
- Heilborn, J. D., M. F. Nilsson, et coll. (2003). "The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium." J Invest Dermatol **120**: 379-89.
- Heilpern, A. J., W. Wertheim, et coll. (2009). "Matrix metalloproteinase 9 plays a key role in lyme arthritis but not in dissemination of *Borrelia burgdorferi*." Infect Immun **77**: 2643-9.
- Henderson, H. E., F. Hassan, et coll. (1996). "A new mutation destroying disulphide bridging in the C-terminal domain of lipoprotein lipase." Biochem Biophys Res Commun **227**: 189-94.
- Henzler Wildman, K. A., D. K. Lee, et coll. (2003). "Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37." Biochemistry **42**: 6545-58.
- Hepburn, N. J., A. S. Williams, et coll. (2007). "*In vivo* characterization and therapeutic efficacy of a C5-specific inhibitor from the soft tick *Ornithodoros moubata*." J Biol Chem **282**: 8292-9.
- Hieta, N., U. Impola, et coll. (2003). "Matrix metalloproteinase-19 expression in dermal wounds and by fibroblasts in culture." J Invest Dermatol **121**: 997-1004.
- Hiratsuka, T., M. Nakazato, et coll. (1998). "Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia." Biochem Biophys Res Commun **249**: 943-7.
- Hirschfeld, M., C. J. Kirschning, et coll. (1999). "Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2." J Immunol **163**: 2382-6.
- Hodzic, E., S. Feng, et coll. (2003). "*Borrelia burgdorferi* population dynamics and prototype gene expression during infection of immunocompetent and immunodeficient mice." Infect Immun **71**: 5042-55.
- Hojgaard, A., R.J. Eisen et coll. (2008). "Transmission dynamics of *Borrelia burgdorferi* s.s. during the key third day of feeding by nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae)." J Med Entomol **45**:732-6.
- Hoodless A, Kurtenbach K, Ogden N, Peacey M, Randolph SE. (2002).Transmission dynamics of Lyme disease spirochaetes. Oikos **96** : 245 - 50.
- Hoover, D. M., O. Chertov, et coll. (2001). "The structure of human beta-defensin-1: new insights into structural properties of beta-defensins." J Biol Chem **276**: 39021-6.
- Horikoshi, T., K. Ezo, et coll. (1995). "Up-regulation of ICAM-1 expression on human dermal fibroblasts by IFN-beta in the presence of TNF-alpha." FEBS Lett **363**: 141-4.

- Horn, F., P. C. dos Santos, et coll. (2000). "*Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva." Arch Biochem Biophys **384**: 68-73.
- Houghton, A. M., P. A. Quintero, et coll. (2006). "Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema." J Clin Invest **116**: 753-9.
- Hovius, J.W., A.P. van Dam et coll. (2007) "Tick host-pathogen interactions in Lyme borreliosis." Trends Parasitol **23**:434-8.
- Hovius, J. W., M. A. de Jong, et coll. (2008). "Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization." PLoS Pathog **4**: e31.
- Hovius, J. W., M. Levi, et coll. (2008). "Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva." PLoS Med **5**: e43.
- Hovius, J. W., T. J. Schuijt, et coll. (2008). "Preferential protection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by a Salp15 homologue in *Ixodes ricinus* saliva." J Infect Dis **198**: 1189-97.
- Hovius, J. W. (2009). "Spitting image: tick saliva assists the causative agent of lyme disease in evading host skin's innate immune response." J Invest Dermatol **129**(10): 2337-9.
- Howe, T. R., L. W. Mayer, et coll. (1985). "A single recombinant plasmid expressing two major outer surface proteins of the Lyme disease spirochete." Science **227**: 645-6.
- Howell, M. D., N. Novak, et coll. (2005). "Interleukin-10 downregulates anti-microbial peptide expression in atopic dermatitis." J Invest Dermatol **125**: 738-45.
- Hristova, K., M. E. Selsted, et coll. (1996). "Interactions of monomeric rabbit neutrophil defensins with bilayers: comparison with dimeric human defensin HNP-2." Biochemistry **35**: 11888-94.
- Hu, L. T., M. A. Eskildsen, et coll. (2001). "Host metalloproteinases in Lyme arthritis." Arthritis Rheum **44**: 1401-10.
- Huang, C., K. Jacobson, et coll. (2004). "MAP kinases and cell migration." J Cell Sci **117**: 4619-28.
- Hubbard, M. J., A. S. Baker, et coll. (1998). "Distribution of *Borrelia burgdorferi* s.l. spirochaete DNA in British ticks (Argasidae and Ixodidae) since the 19th century,
- Hubner, A., X. Yang, et coll. (2001). "Expression of *Borrelia burgdorferi* OspC and DbpA is controlled by a RpoN-RpoS regulatory pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 12724-9.
- Hugli, T. E. and H. J. Muller-Eberhard (1978). "Anaphylatoxins: C3a and C5a." Adv Immunol **26**: 1-53.
- Huttner, K. M. and C. L. Bevins (1999). "Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense." Pediatr Res **45**: 785-94.
- Imamura, S., I. da Silva Vaz Junior, et coll. (2005). "A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine." Vaccine **23**: 1301-11.
- Islam, D., L. Bandholtz, et coll. (2001). "Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator." Nat Med **7**: 180-5.
- Itoh, Y. (2006). "MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue." IUBMB Life **58**: 589-96.
- Iwaki, D., C. Nishitani, et coll. (2005). "The CD14 region spanning amino acids 57-64 is critical for interaction with the extracellular Toll-like receptor 2 domain." Biochem Biophys Res Commun **328**: 173-6.
- Iwanaga, S., M. Okada, et coll. (2003). "Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*." Eur J Biochem **270**: 1926-34.
- Izadpanah, A. and R. L. Gallo (2005). "Antimicrobial peptides." J Am Acad Dermatol **52**: 381-90.

- Jahoda, C. A. and A. J. Reynolds (1996). "Dermal-epidermal interactions. Adult follicle-derived cell populations and hair growth." Dermatol Clin **14**: 573-83.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Jang, B. C., K. J. Lim, *et coll.* (2004). "Up-regulation of human beta-defensin 2 by interleukin-1beta in A549 cells: involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK, and NF-kappaB." Biochem Biophys Res Commun **320**: 1026-33.
- Jarnagin, K., D. Grunberger, *et coll.* (1999). "Identification of surface residues of the monocyte chemotactic protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2." Biochemistry **38**: 16167-77.
- Jauris-Heipke, S., G. Liegl, *et coll.* (1995). "Molecular analysis of genes encoding outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: relationship to ospA genotype and evidence of lateral gene exchange of ospC." J Clin Microbiol **33**: 1860-6.
- Jaulhac, B., R. Heller, *et coll.* (2000). "Direct molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in synovial samples from patients with lyme arthritis." J Clin Microbiol **38**: 1895-900.
- Jaworski, J. (2005). "Ticks, the *Ixodida*". In *Biology of disease vectors* 2<sup>nd</sup> edition chapter 43, Marquart. ED. Elsevier Academic Press.
- Jin, T., M. Bokarewa, *et coll.* (2004). "*Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism." J Immunol **172**: 1169-76.
- Jin, M. S., S. E. Kim, *et coll.* (2007). "Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide." Cell **130**: 1071-82.
- Johansson, J., G. H. Gudmundsson, *et coll.* (1998). "Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37." J Biol Chem **273**: 3718-24.
- Johnson, R. C., F. W. Hyde, *et coll.* (1984). "Taxonomy of the Lyme disease spirochetes." Yale J Biol Med **57**: 529-37.
- Joiner, K. A. (1988). "Complement evasion by bacteria and parasites." Annu Rev Microbiol **42**: 201-30.
- Jones, N. C., A. Germain, *et coll.* (1994). "*Borrelia burgdorferi* decreases hyaluronan synthesis but increases IL-6 production by fibroblasts." Microb Pathog **16**: 261-7.
- Juncadella, I. J., R. Garg, *et coll.* (2007). "T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15." FEMS Immunol Med Microbiol **49**: 433-8.
- Jutel, M., T. Watanabe, *et coll.* (2001). "Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors." Nature **413**: 420-5.
- Kagan, B. L., M. E. Selsted, *et coll.* (1990). "Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 210-4.
- Kamhawi, S. (2000). "The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections." Microbes Infect **2**: 1765-73.
- Kandler, K., R. Shaykhiev, *et coll.* (2006). "The anti-microbial peptide LL-37 inhibits the activation of dendritic cells by TLR ligands." Int Immunol **18**: 1729-36.
- Kane, C. J., P. A. Hebda, *et coll.* (1991). "Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta 1 expression during cutaneous wound healing." J Cell Physiol **148**: 157-73.
- Kang, I., S. W. Barthold, *et coll.* (1997). "T-helper-cell cytokines in the early evolution of murine Lyme arthritis." Infect Immun **65**: 3107-11.



- Kanitakis, J. (2002). "Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin." Eur J Dermatol **12**: 390-9; quiz 400-1.
- Kao, J. J. (2006). "The NF-kappaB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate blocks IL-1beta induced hyaluronan synthase 1 (HAS1) mRNA transcription, pointing at NF-kappaB dependence of the gene HAS1." Exp Gerontol **41**: 641-7.
- Kaufmann, S. H. (2007). "The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines." Nat Rev Microbiol **5**: 491-504.
- Kawai, K., H. Shimura, et coll. (2002). "Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes." J Dermatol Sci **30**: 185-94.
- Kawabata, M., S. Baba, et coll. (1987). "Lyme disease in Japan and its possible incriminated tick vector, *Ixodes persulcatus*." J Infect Dis **156**: 854.
- Kazimirova, M., V. Jancinova, et coll. (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.
- Keller, P. M., L. Waxman, et coll. (1993). "Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation." J Biol Chem **268**: 5450-6.
- Kilani, R. T., L. Guilbert, et coll. (2007). "Keratinocyte conditioned medium abrogates the modulatory effects of IGF-1 and TGF-beta1 on collagenase expression in dermal fibroblasts." Wound Repair Regen **15**: 236-44.
- Kim, S. T., H. E. Cha, et coll. (2003). "Antimicrobial peptide LL-37 is upregulated in chronic nasal inflammatory disease." Acta Otolaryngol **123**: 81-5.
- Kim, C., Z. Slavinskaya, et coll. (2006). "Human alpha-defensins neutralize toxins of the mono-ADP-ribosyltransferase family." Biochem J **399**: 225-9.
- Kissenpennig, A. and B. Malissen (2006). "Langerhans cells--revisiting the paradigm using genetically engineered mice." Trends Immunol **27**: 132-9.
- Klempner, M. S., R. Noring, et coll. (1995). "Binding of human plasminogen and urokinase-type plasminogen activator to the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*." J Infect Dis **171**: 1258-65.
- Klopmen, H. (2005). "Ticks, the *Ixodida*". In Biology of disease vectors 2<sup>nd</sup> edition Chapter 4, Marquart. ED. Elsevier Academic Press.
- Klotman, M. E. and T. L. Chang (2006). "Defensins in innate antiviral immunity." Nat Rev Immunol **6**: 447-56.
- Koczulla, R., G. von Degenfeld, et coll. (2003). "An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18." J Clin Invest **111**: 1665-72.
- Kraiczy, P., C. Skerka, et coll. (2001). "Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H." Eur J Immunol **31**(6): 1674-84.
- Kraiczy, P., J. Hellwege, et coll. (2003). "Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: mapping of a complement-inhibitor factor H-binding site of BbCRASP-3, a novel member of the Erp protein family." Eur J Immunol **33**: 697-707.
- Krisanaprakornkit, S., J. R. Kimball, et coll. (2000). "Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier." Infect Immun **68**: 2907-15.
- Krisanaprakornkit, S., J. R. Kimball, et coll. (2002). "Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family." J Immunol **168**: 316-24.

- Krisanaprakornkit, S., P. Chotjumlong, et coll. (2008). "Involvement of phospholipase D in regulating expression of antimicrobial peptide human beta-defensin-2." Int Immunol **20**: 21-9.
- Kumaran, D., S. Eswaramoorthy, et coll. (2001). "Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*." Embo J **20**: 971-8.
- Labandeira-Rey, M. and J. T. Skare (2001). "Decreased infectivity in *Borrelia burgdorferi* strain B31 is associated with loss of linear plasmid 25 or 28-1." Infect Immun **69**: 446-55.
- Labandeira-Rey, M., J. Seshu, et coll. (2003). "The absence of linear plasmid 25 or 28-1 of *Borrelia burgdorferi* dramatically alters the kinetics of experimental infection via distinct mechanisms." Infect Immun **71**: 4608-13.
- Lai, Y. P., Y. F. Peng, et coll. (2005). "Functional and structural characterization of recombinant dermcidin-1L, a human antimicrobial peptide." Biochem Biophys Res Commun **328**: 243-50.
- Lande, R., J. Gregorio, et coll. (2007). "Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide." Nature **449**: 564-9.
- Larregina, A. T., A. E. Morelli, et coll. (2001). "Dermal-resident CD14+ cells differentiate into Langerhans cells." Nat Immunol **2**: 1151-8.
- Larrick, J. W., M. Hirata, et coll. (1995). "Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein." Infect Immun **63**: 1291-7.
- Lawrenz, M. B., R. M. Wooten, et coll. (2004). "Effects of vlsE complementation on the infectivity of *Borrelia burgdorferi* lacking the linear plasmid lp28-1." Infect Immun **72**: 6577-85.
- Leal, A. T., A. Seixas, et coll. (2006). "Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin." Vet Immunol Immunopathol **114**: 341-5.
- Leask, A., A. Holmes, et coll. (2002). "Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis." Curr Rheumatol Rep **4**: 136-42.
- Lebre, M. C., A. M. van der Aar, et coll. (2007). "Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9." J Invest Dermatol **127**: 331-41.
- Leboulle, G., M. Crippa, et coll. (2002). "Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks." J Biol Chem **277**: 10083-9.
- Lee, P. H., T. Ohtake, et coll. (2005). "Expression of an additional cathelicidin antimicrobial peptide protects against bacterial skin infection." Proc Natl Acad Sci U S A **102**: 3750-5.
- Le Fleche, A., D. Postic, et coll. (1997). "Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis." Int J Syst Bacteriol **47**: 921-5.
- Lehrer, R. I., A. Barton, et coll. (1989). "Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity." J Clin Invest **84**: 553-61.
- Lehrer, R. I., A. K. Lichtenstein, et coll. (1993). "Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells." Annu Rev Immunol **11**: 105-28.
- Lehrer, R. I. and T. Ganz (2002). "Defensins of vertebrate animals." Curr Opin Immunol **14**: 96-102.
- Leulier, F. and B. Lemaitre (2008). "Toll-like receptors--taking an evolutionary approach." Nat Rev Genet **9**: 165-78.
- Levy, M. Z., N. M. Bowman, et coll. (2006). "Periurban *Trypanosoma cruzi*-infected *Triatoma infestans*, Arequipa, Peru." Emerg Infect Dis **12**: 1345-52.
- Li, H., J. J. Dunn, et coll. (1997). "Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein A complexed with an Fab." Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 3584-9.

- Li, D. Q., B. L. Lokeshwar, et coll. (2001). "Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells." Exp Eye Res **73**: 449-59.
- Li, X., X. Liu, et coll. (2006). "*Borrelia burgdorferi* lacking BBK32, a fibronectin-binding protein, retains full pathogenicity." Infect Immun **74**: 3305-13.
- Li, X., G. Neelakanta, et coll. (2007). "Role of outer surface protein D in the *Borrelia burgdorferi* life cycle." Infect Immun **75**: 4237-44.
- Liang, F. T., J. Yan, et coll. (2004). "*Borrelia burgdorferi* changes its surface antigenic expression in response to host immune responses." Infect Immun **72**: 5759-67.
- Lien, E., T. J. Sellati, et coll. (1999). "Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products." J Biol Chem **274**: 33419-25.
- Lindgren, E. and T.G.T. Jaenson. (2006). "Lyme borreliosis in Europe: Influences of Climate and Climate Change, Epidemiology, Ecology and Adaptation Measures." [World Health Organization Report EUR/04/5046250.] WHO Regional Office for Europe, Rome.
- Lippens, S., E. Hoste, et coll. (2009). "Cell death in the skin." Apoptosis.
- Lipsker, D. (2007). "[Dermatological aspects of Lyme borreliosis]." Med Mal Infect **37**(7-8): 540-7.
- Liu, A. Y., D. Destoumieux, et coll. (2002). "Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation." J Invest Dermatol **118**: 275-81.
- Liu, L., A. A. Roberts, et coll. (2003). "By IL-1 signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide." J Immunol **170**: 575-80.
- Lorenz, E., J. P. Mira, et coll. (2000). "A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection." Infect Immun **68**: 6398-401.
- Lotric-Furlan, S., M. Petrovec, et coll. (2005). "Concomitant tickborne encephalitis and human granulocytic *ehrlichiosis*." Emerg Infect Dis **11**: 485-8.
- Lusitani, D., S.E., Malawista et coll. (2002). "*Borrelia burgdorferi* are susceptible to killing by a variety of human polymorphonuclear leukocyte components." J Infect Dis **185**:797-804.
- Lysenko, E. S., J. Gould, et coll. (2000). "Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract." Infect Immun **68**: 1664-71.
- Mackay, A. R., J. L. Hartzler, et coll. (1990). "Studies on the ability of 65-kDa and 92-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen." J Biol Chem **265**: 21929-34.
- Mackay, A. R., M. Ballin, et coll. (1992). "Effect of phorbol ester and cytokines on matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in tumor and normal cell lines." Invasion Metastasis **12**: 168-84.
- Magnarelli, L. A. and J. F. Anderson (1988). "Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*." J Clin Microbiol **26**: 1482-6.
- Manukyan, M., K. Triantafilou, et coll. (2005). "Binding of lipopeptide to CD14 induces physical proximity of CD14, TLR2 and TLR1." Eur J Immunol **35**: 911-21.
- Mans, B. J., A. I. Louw, et coll. (2002). "Amino acid sequence and structure modeling of savignin, a thrombin inhibitor from the tick, *Ornithodoros savignyi*." Insect Biochem Mol Biol **32**: 821-8.
- Mans, B. J., A. I. Louw, et coll. (2003). "The major tick salivary gland proteins and toxins from the soft tick, *Ornithodoros savignyi*, are part of the tick Lipocalin family: implications for the origins of tick toxicoses." Mol Biol Evol **20**: 1158-67.

- Mans, B. J. and J. M. Ribeiro (2008). "Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins." Insect Biochem Mol Biol **38**: 841-52.
- Marchal, C., B. Luft B et coll. (2009). "Defensin is suppressed by tick salivary gland extract during the *in vitro* interaction of resident skin cells with *Borrelia burgdorferi*." J Invest Derm **129**: 2515-7.
- Marchal, C., F. Schramm et coll. (2009). "Salp15, a tick, has an immunosuppressive effect on innate immunity of human primary keratinocytes infected with *Borrelia burgdorferi*." J. Invest Dermatol. submitted.
- Marchini, G., S. Lindow, et coll. (2002). "The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa." Br J Dermatol **147**: 1127-34.
- Marconi, R. T., M. E. Konkel, et coll. (1993). "Variability of osp genes and gene products among species of Lyme disease spirochetes." Infect Immun **61**: 2611-7.
- Maritz-Olivier, C., C. Stutzer, et coll. (2007). "Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics." Trends Parasitol **23**: 397-407.
- Martin, P. (1997). "Wound healing--aiming for perfect skin regeneration." Science **276**: 75-81.
- Mathews, M., H. P. Jia, et coll. (1999). "Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands." Infect Immun **67**: 2740-5.
- Matuschka, F. R., A. Ohlenbusch, et coll. (1996). "Characteristics of Lyme disease spirochetes in archived European ticks." J Infect Dis **174**: 424-6.
- Matsushima, H., N. Yamada, et coll. (2004). "TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells." J Immunol **173**: 531-41.
- Maurer, M., S. Lopez Kostka, et coll. (2006). "Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections." Faseb J **20**: 2460-7.
- Mbow, M. L., J. A. Bleyenbergh, et coll. (1998). "*Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*." J Immunol **161**: 5571-7.
- McCray, P. B., Jr. and L. Bentley (1997). "Human airway epithelia express a beta-defensin." Am J Respir Cell Mol Biol **16**: 343-9.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1999). "Innate immune induction of the adaptive immune response." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **64**: 429-35.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**: 135-45.
- Megyri, K., L. Orosz, et coll. (2009). "The herpes simplex virus-induced demise of keratinocytes is associated with a dysregulated pattern of p63 expression." Microbes Infect **11**(8-9): 785-94.
- Mehlhorn, H. (2001). *Parasitology in Focus : Facts and Trends*, 2<sup>nd</sup> edition, Springer.
- Menzies, B. E. and A. Kenoyer (2006). "Signal transduction and nuclear responses in *Staphylococcus aureus*-induced expression of human beta-defensin 3 in skin keratinocytes." Infect Immun **74**: 6847-54.
- Metz, M., V. Lammel, et coll. (2006). "Inflammatory murine skin responses to UV-B light are partially dependent on endothelin-1 and mast cells." Am J Pathol **169**: 815-22.
- Metz, M., A. M. Piliponsky, et coll. (2006). "Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms." Science **313**: 526-30.
- Metz, M., M. A. Grimbaldston, et coll. (2007). "Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation." Immunol Rev **217**: 304-28.

- Meyer-Hoffert, U., N. Wichmann, et coll. (2003). "Supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* induce the *Pseudomonas*-specific antibiotic elafin in human keratinocytes." Exp Dermatol **12**: 418-25.
- Midorikawa, K., K. Ouhara, et coll. (2003). "*Staphylococcus aureus* susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes." Infect Immun **71**: 3730-9.
- Mizuno, T. (1979). "A novel peptidoglycan-associated lipoprotein found in the cell envelope of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*." J Biochem **86**: 991-1000.
- Moller, A., U. Lippert, et coll. (1993). "Human mast cells produce IL-8." J Immunol **151**: 3261-6.
- Montgomery, R. R., S. E. Malawista, et coll. (1996). "Direct demonstration of antigenic substitution of *Borrelia burgdorferi* *ex vivo*: exploration of the paradox of the early immune response to outer surface proteins A and C in Lyme disease." J Exp Med **183**: 261-9.
- Montgomery, R. R., D. Lusitani, et coll. (2004). "Tick saliva reduces adherence and area of human neutrophils." Infect Immun **72**: 2989-94.
- Moon, S. E., N. Bhagavathula, et coll. (2002). "Keratinocyte stimulation of matrix metalloproteinase-1 production and proliferation in fibroblasts: regulation through mitogen-activated protein kinase signalling events." Br J Cancer **87**: 457-64.
- Moore, M. W., A. R. Cruz, et coll. (2007). "Phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum* potentiates innate immune activation and induces gamma interferon production." Infect Immun **75**: 2046-62.
- Muhradt, P. F., M. Kiess, et coll. (1997). "Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration." J Exp Med **185**: 1951-8.
- Mulenga, A., A. Tsuda, et coll. (2003). "Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, *Rhiphicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization." Insect Biochem Mol Biol **33**: 267-76.
- Mullegger, R. R. (2004). "Dermatological manifestations of Lyme borreliosis." Eur J Dermatol **14**(5): 296-309.
- Muller, K. M., M. Bickel, et coll. (2000). "Natural killer cells activate human dermal fibroblasts." Cytokine **12**: 1755-62.
- Munderloh, U. G. and T. J. Kurtti (2005). "The ABCs of Lyme disease spirochaetes in ticks." Lancet **366**: 962-4.
- Munson, E. L., D. J. DeCoster, et coll. (2004). "Neutralization of gamma interferon augments borreliacidal antibody production and severe destructive Lyme arthritis in C3H/HeJ mice." Clin Diagn Lab Immunol **11**: 35-41.
- Murakami, M., T. Ohtake, et coll. (2002). "Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin." J Invest Dermatol **119**: 1090-5.
- Mydel, P., J. M. Shipley, et coll. (2008). "Neutrophil elastase cleaves laminin-332 (laminin-5) generating peptides that are chemotactic for neutrophils." J Biol Chem **283**: 9513-22.
- Nadelman, R. B., and Wormser, G. P. (1998). "Lyme borreliosis." Lancet **352** : 557-65.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem **274**: 21491-4.
- Nagy, I., A. Pivarsci, et coll. (2005). "Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors." J Invest Dermatol **124**: 931-8.
- Nakata, T., M. Yasuda, et coll. (2006). "CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex." Cell Microbiol **8**: 1899-909.

- Narasimhan, S., R. A. Koski, et coll. (2002). "A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*." Insect Mol Biol **11**: 641-50.
- Narasimhan, S., K. Deponte, et coll. (2007). "Immunity against *Ixodes scapularis* salivary proteins expressed within 24 hours of attachment thwarts tick feeding and impairs *Borrelia* transmission." PLoS ONE **2**: e451.
- Nassar, T., S. Akkawi, et coll. (2002). "Human alpha-defensin regulates smooth muscle cell contraction: a role for low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor." Blood **100**: 4026-32.
- Neelakanta, G., X. Li, et coll. (2007). "Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within *Ixodes* ticks." PLoS Pathog **3**: e33.
- Nigrovic, L. E. and K. M. Thompson (2007). "The Lyme vaccine: a cautionary tale." Epidemiol Infect **135**: 1-8.
- Niyonsaba, F., K. Iwabuchi, et coll. (2002). "Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway." Int Immunol **14**: 421-6.
- Niyonsaba, F., M. Hirata, et coll. (2003). "Epithelial cell-derived antibacterial peptides human beta-defensins and cathelicidin: multifunctional activities on mast cells." Curr Drug Targets Inflamm Allergy **2**: 224-31.
- Niyonsaba, F., H. Ogawa, et coll. (2004). "Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils." Immunology **111**: 273-81.
- Niyonsaba, F., H. Ushio, et coll. (2005). "The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes." J Immunol **175**: 1776-84.
- Niyonsaba, F., H. Ushio, et coll. (2007). "Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines." J Invest Dermatol **127**: 594-604.
- Nizet, V., T. Ohtake et coll. (2001). "Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection." Nature **414**:454-7.
- Nizet, V. and R. L. Gallo (2002). "Surviving innate immunity." Trends Microbiol **10**: 358-9.
- Nizet, V. and R. L. Gallo (2003). "Cathelicidins and innate defense against invasive bacterial infection." Scand J Infect Dis **35**: 670-6.
- Nomura, I., E. Goleva, et coll. (2003). "Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes." J Immunol **171**: 3262-9.
- Norris, S. J., C. J. Carter, et coll. (1992). "Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein." Infect Immun **60**: 4662-72.
- Nowinski, D., A. S. Lysheden, et coll. (2004). "Analysis of gene expression in fibroblasts in response to keratinocyte-derived factors *in vitro*: potential implications for the wound healing process." J Invest Dermatol **122**: 216-21.
- Nunn, M. A., A. Sharma, et coll. (2005). "Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*." J Immunol **174**: 2084-91.
- O'Neil, D. A., E. M. Porter, et coll. (1999). "Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium." J Immunol **163**: 6718-24.
- O'Neill, L. A. (2002). "Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily." Curr Top Microbiol Immunol **270**: 47-61.
- O'Neill, L.A. (2008). "The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress." Immunol Rev **226**:10-8.

- Ogus, A. C., B. Yoldas, et coll. (2004). "The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease." Eur Respir J **23**: 219-23.
- Ogushi, K., A. Wada, et coll. (2001). "*Salmonella enteritidis* FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells." J Biol Chem **276**: 30521-6.
- Ohgami, K., I. B. Ilieva, et coll. (2003). "Effect of human cationic antimicrobial protein 18 Peptide on endotoxin-induced uveitis in rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**: 4412-8.
- Ohnishi, J., J. Piesman, et coll. (2001). "Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks." Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 670-5.
- Ojaimi, C., C. Brooks, et coll. (2003). "Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome arrays." Infect Immun **71**: 1689-705.
- Oliveira, C. J., K. A. Cavassani, et coll. (2008). "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 **38**: 705-16.
- Ong, P. Y., T. Ohtake, et coll. (2002). "Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis." N Engl J Med **347**: 1151-60.
- Oppenheim, J. J., A. Biragyn, et coll. (2003). "Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity." Ann Rheum Dis **62 Suppl 2**: ii17-21.
- Oppenheim, J. J. and D. Yang (2005). "Alarmins: chemotactic activators of immune responses." Curr Opin Immunol **17**: 359-65.
- Oppenheim, J.J., P. Tewary, et coll. (2007). "Alarmins initiate host defense". Adv. Exp. Med. Biol **601**: 185-194
- Oren, Z. and Y. Shai (1998). "Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides." Biopolymers **47**: 451-63.
- Oren, Z., J. C. Lerman, et coll. (1999). "Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity." Biochem J **341**: 501-13.
- Ouhara, K., H. Komatsuzawa, et coll. (2006). "Actinobacillus actinomycetemcomitans outer membrane protein 100 triggers innate immunity and production of beta-defensin and the 18-kilodalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells." Infect Immun **74**: 5211-20.
- Owhashi, M., M. Harada, et coll. (2001). "The role of saliva of *Anopheles stephensi* in inflammatory response: identification of a high molecular weight neutrophil chemotactic factor." Parasitol Res **87**: 376-82.
- Pachner, A. R. (1989). "Neurologic manifestations of Lyme disease, the new "great imitator". " Rev Infect Dis **11 Suppl 6**: S1482-6.
- Paesen, G. C., P. L. Adams, et coll. (1999). "Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure." Mol Cell **3**: 661-71.
- Pal, U., X. Li, et coll. (2004). "TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*." Cell **119**: 457-68.
- Pal, U., X. Yang, et coll. (2004). "OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands." J Clin Invest **113**(2): 220-30.
- Panyutich, A. V., E. A. Panyutich, et coll. (1993). "Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis." J Lab Clin Med **122**: 202-7.
- Parks, W. C., C. L. Wilson, et coll. (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." Nat Rev Immunol **4**: 617-29.

- Parveen, N., D. Robbins, et coll. (1999). "Strain variation in glycosaminoglycan recognition influences cell-type-specific binding by Lyme disease spirochetes." Infect Immun **67**: 1743-9.
- Parveen, N., M. Caimano, et coll. (2003). "Adaptation of the Lyme disease spirochaete to the mammalian host environment results in enhanced glycosaminoglycan and host cell binding." Mol Microbiol **47**: 1433-44.
- Patel, G. K., C. H. Wilson, et coll. (2006). "Numerous keratinocyte subtypes involved in wound re-epithelialization." J Invest Dermatol **126**: 497-502.
- Paveglione, S. A., J. Allard, et coll. (2007). "The tick salivary protein, Salp15, inhibits the development of experimental asthma." J Immunol **178**: 7064-71.
- Pazgier, M., D. M. Hoover, et coll. (2006). "Human beta-defensins." Cell Mol Life Sci **63**: 1294-313.
- Perfetto, B., G. Donnarumma, et coll. (2003). "Bacterial components induce cytokine and intercellular adhesion molecules-1 and activate transcription factors in dermal fibroblasts." Res Microbiol **154**: 337-44.
- Pernet, I., C. Reymondier, et coll. (2003). "Calcium triggers beta-defensin (hBD-2 and hBD-3) and chemokine macrophage inflammatory protein-3 alpha (MIP-3alpha/CCL20) expression in monolayers of activated human keratinocytes." Exp Dermatol **12**: 755-60.
- Peric, M., S. Koglin, et coll. (2009). "Vitamin D analogs differentially control antimicrobial peptide/"alarmin" expression in psoriasis." PLoS One **4**(7): e6340.
- Perret, J. L., E. Guigoz, et coll. (2000). "Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland)." Parasitol Res **86**(7): 554-7.
- Piesman, J., N. S. Zeidner, et coll. (2003). "Dynamic changes in *Borrelia burgdorferi* populations in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) during transmission: studies at the mRNA level." Vector Borne Zoonotic Dis **3**: 125-32.
- Piesman, J., L., Gern. (2004). "Lyme borreliosis in Europe and North America." Parasitology **129**(Suppl):S191-220
- Piesman, J. and L. Eisen (2008). "Prevention of tick-borne diseases." Annu Rev Entomol **53**: 323-43.
- Pillai, S., D. D. Bikle, et coll. (1990). "Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium." J Cell Physiol **143**(2): 294-302.
- Pioli, P. A., L. K. Weaver, et coll. (2006). "Lipopolysaccharide-induced IL-1 beta production by human uterine macrophages up-regulates uterine epithelial cell expression of human beta-defensin 2." J Immunol **176**: 6647-55.
- Pivarcsi, A., L., Kemeny et coll. (2004). "Innate immune functions of the keratinocytes." Acta Microbiol Immunol Hung **51**:303-10.
- Pivarcsi, A., I. Nagy, et coll. (2005). "Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells." Microbes Infect **7**: 1117-27.
- Postic D, Ferquel E. (2003). Rapport annuel d'activité. Centre National de Référence des *Borrelia*.
- Prevot, P. P., B. Adam, et coll. (2006). "Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*." J Biol Chem **281**: 26361-9.
- Prevot, P. P., B. Couvreur, et coll. (2007). "Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin." Vaccine **25**: 3284-92.
- Probert, W. S. and B. J. Johnson (1998). "Identification of a 47 kDa fibronectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolate B31." Mol Microbiol **30**: 1003-15.



- Purser, J. E. and S. J. Norris (2000). "Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 13865-70.
- Purser, J. E., M. B. Lawrenz, et coll. (2003). "A plasmid-encoded nicotinamidase (PncA) is essential for infectivity of *Borrelia burgdorferi* in a mammalian host." Mol Microbiol **48**: 753-64.
- Ralston, D. R., C. Layton, et coll. (1997). "Keratinocytes contract human dermal extracellular matrix and reduce soluble fibronectin production by fibroblasts in a skin composite model." Br J Plast Surg **50**: 408-15.
- Ramamoorthi, N., S. Narasimhan, et coll. (2005). "The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host." Nature **436**: 573-7.
- Randolph, S. E. and K. Storey (1999). "Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: *Ixodidae*): implications for parasite transmission." J Med Entomol **36**(6): 741-8.
- Randolph, G. J., V. Angeli, et coll. (2005). "Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels." Nat Rev Immunol **5**: 617-28.
- Ribeiro, J. M., G. T. Makoul, et coll. (1985). "Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*." J Exp Med **161**: 332-44.
- Ribeiro, J. M. (1987). "Role of saliva in blood-feeding by arthropods." Annu Rev Entomol **32**: 463-78.
- Ribeiro, J. M. (1989). "Role of saliva in tick/host interactions." Exp Appl Acarol **7**: 15-20.
- Ribeiro, J. M., T. M. Endris, et coll. (1991). "Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities." Comp Biochem Physiol A Comp Physiol **100**: 109-12.
- Ribeiro, J. M. (1995). "Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?" Infect Agents Dis **4**: 143-52.
- Ribeiro, J. M. and T. N. Mather (1998). "*Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase." Exp Parasitol **89**: 213-21.
- Ribeiro, J. M., R. Charlab, et coll. (2001). "The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*." J Exp Biol **204**: 2001-10.
- Ribeiro, J. M. and I. M. Francischetti (2003). "Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives." Annu Rev Entomol **48**: 73-88.
- Ribeiro, J. M. and J. G. Valenzuela (2003). "The salivary purine nucleosidase of the mosquito, *Aedes aegypti*." Insect Biochem Mol Biol **33**: 13-22.
- Ribeiro, J. M., F. Alarcon-Chaidez, et coll. (2006). "An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks." Insect Biochem Mol Biol **36**: 111-29.
- Ribeiro, J. M., B. Arca, et coll. (2007). "An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*." BMC Genomics **8**: 6.
- Richter, D., D. B. Schlee, et coll. (2004). "Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe." Appl Environ Microbiol **70**: 6414-9.
- Rodriguez-Jimenez, F. J., A. Krause, et coll. (2003). "Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis." Genomics **81**: 175-83.
- Rodriguez de la Vega, R. C. and L. D. Possani (2005). "On the evolution of invertebrate defensins." Trends Genet **21**: 330-2.

- Romani, N., A. Lenz, et coll. (1989). "Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function." J Invest Dermatol **93**: 600-9.
- Romeo, D., B. Skerlavaj, et coll. (1988). "Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils." J Biol Chem **263**: 9573-5.
- Rosa, P. A., K. Tilly, et coll. (2005). "The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete." Nat Rev Microbiol **3**: 129-43.
- Rose, F. R., K. Bailey, et coll. (1998). "Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract." Infect Immun **66**: 3255-63.
- Roversi, P., O. Lissina, et coll. (2007). "The structure of OMCI, a novel lipocalin inhibitor of the complement system." J Mol Biol **369**: 784-93.
- Rupprecht, T. A., U. Koedel, et coll. (2006). "Adhesion of *Borrelia garinii* to neuronal cells is mediated by the interaction of OspA with proteoglycans." J Neuroimmunol **175**: 5-11.
- Saalbach, A., C. Klein, et coll. (2007). "Dermal fibroblasts induce maturation of dendritic cells." J Immunol **178**: 4966-74.
- Sahl, H. G., U. Pag, et coll. (2005). "Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity." J Leukoc Biol **77**: 466-75.
- Sambri, V., A. Marangoni, et coll. (2002). "Comparative in vitro activity of five cathelicidin-derived synthetic peptides against *Leptospira*, *Borrelia* and *Treponema pallidum*." J Antimicrob Chemother **50**: 895-902.
- Sangamnatdej, S., G. C. Paesen, et coll. (2002). "A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva." Insect Mol Biol **11**: 79-86.
- Sarkar, A., K. Tilly, et coll. (2009). "*Borrelia burgdorferi* resistance to a major skin antimicrobial peptide is independent of outer surface lipoprotein content." Antimicrob Agents Chemother.
- Sayama, K., Y. Hanakawa, et coll. (2001). "Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation." J Biol Chem **276**: 999-1004.
- Sayama, K., H. Komatsuzawa, et coll. (2005). "New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of beta-defensins, LL37, and TLR2." Eur J Immunol **35**: 1886-95.
- Schaller-Bals, S., A. Schulze, et coll. (2002). "Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection." Am J Respir Crit Care Med **165**: 992-5.
- Schauber, J., C. Svanholm, et coll. (2003). "Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways." Gut **52**: 735-41.
- Schauber, J., R. A. Dorschner, et coll. (2007). "Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism." J Clin Invest **117**: 803-11.
- Schauber, J. and R. L. Gallo (2008). "Antimicrobial peptides and the skin immune defense system." J Allergy Clin Immunol **122**: 261-6.
- Schauber, J., Y. Oda, et coll. (2008). "Histone acetylation in keratinocytes enables control of the expression of cathelicidin and CD14 by 1,25-dihydroxyvitamin D3." J Invest Dermatol **128**: 816-24.
- Schetters, T. P., J. A. Kleuskens, et coll. (2006). "Onset and duration of immunity against *Babesia canis* infection in dogs vaccinated with antigens from culture supernatants." Vet Parasitol **138**: 140-6.
- Schetters, T. P., T. Strydom, et coll. (2007). "Immunity against *Babesia rossi* infection in dogs vaccinated with antigens from culture supernatants." Vet Parasitol **144**: 10-9.

- Schibli, D. J., H. N. Hunter, et coll. (2002). "The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*." J Biol Chem **277**: 8279-89.
- Schittek, B., R. Hipfel, et coll. (2001). "Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands." Nat Immunol **2**: 1133-7.
- Schneider, B. S., L. Soong, et coll. (2004). "*Aedes aegypti* salivary gland extracts modulate anti-viral and TH1/TH2 cytokine responses to sindbis virus infection." Viral Immunol **17**: 565-73.
- Schonwetter, B. S., E. D. Stolzenberg, et coll. (1995). "Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation." Science **267**: 1645-8.
- Schroder, N. W., I. Diterich, et coll. (2005). "Heterozygous Arg753Gln polymorphism of human TLR-2 impairs immune activation by *Borrelia burgdorferi* and protects from late stage Lyme disease." J Immunol **175**: 2534-40.
- Schroder, J. M. and J. Harder (2006). "Antimicrobial skin peptides and proteins." Cell Mol Life Sci **63**(4): 469-86.
- Schroder, H., V. Daix, et coll. (2007). "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 **9**: 247-50.
- Schuijt, T. J., J. W. Hovius, et coll. (2008). "The tick salivary protein Salp15 inhibits the killing of serum-sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates." Infect Immun **76**: 2888-94.
- Schultz, H. and J. P. Weiss (2007). "The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease." Clin Chim Acta **384**: 12-23.
- Schwan, T. G., J. Piesman, et coll. (1995). "Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding." Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 2909-13.
- Schwan, T. G. and J. Piesman (2000). "Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice." J Clin Microbiol **38**: 382-8.
- Schwan, T. G. (2003). "Temporal regulation of outer surface proteins of the Lyme-disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*." Biochem Soc Trans **31**: 108-12.
- Schwentker, A., Y. Vodovotz, et coll. (2002). "Nitric oxide and wound repair: role of cytokines?" Nitric Oxide **7**: 1-10.
- Seifert, R., G. Schultz, et coll. (1990). "Activation of superoxide formation and lysozyme release in human neutrophils by the synthetic lipopeptide Pam3Cys-Ser-(Lys)4. Involvement of guanine-nucleotide-binding proteins and synergism with chemotactic peptides." Biochem J **267**: 795-802.
- Seiki, M. (2002). "The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration." Curr Opin Cell Biol **14**: 624-32.
- Seinost, G., D. E. Dykhuizen, et coll. (1999). "Four clones of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto cause invasive infection in humans." Infect Immun **67**: 3518-24.
- Sellati, T. J., D. A. Bouis, et coll. (1998). "*Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytic cells via a CD14-dependent pathway distinct from that used by lipopolysaccharide." J Immunol **160**: 5455-64.
- Selsted, M. E. (2004). "Theta-defensins: cyclic antimicrobial peptides produced by binary ligation of truncated alpha-defensins." Curr Protein Pept Sci **5**: 365-71.
- Selsted, M. E. and A. J. Ouellette (2005). "Mammalian defensins in the antimicrobial immune response." Nat Immunol **6**: 551-7.

- Senior, R. M., G. L. Griffin, et coll. (1991). "Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases." J Biol Chem **266**: 7870-5.
- Seo, S.J., S.W. Ahn et coll. (2001). "Expression of Beta defensins in human keratinocyte cell lines." J Dermatol Sc **27**:183-191.
- Sharp, L. L., J. M. Jameson, et coll. (2005). "Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1." Nat Immunol **6**: 73-9.
- Shi, Y., Q. Xu, et coll. (2008). "Both decorin-binding proteins A and B are critical for the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*." Infect Immun **76**: 1239-46.
- Shi, Y., Q. Xu, et coll. (2008). "Common and unique contributions of decorin-binding proteins A and B to the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*." PLoS One **3**: e3340.
- Shibata, K., A. Hasebe, et coll. (2000). "The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts." J Immunol **165**: 6538-44.
- Shin, O. S., R. R. Isberg, et coll. (2008). "Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptors 2, 5, and 9 in phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* and cytokine induction." Infect Immun **76**: 2341-51.
- Sieling, P. A., W. Chung, et coll. (2003). "Toll-like receptor 2 ligands as adjuvants for human Th1 responses." J Immunol **170**: 194-200.
- Silzle, T., M. Kreutz, et coll. (2003). "Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue." Eur J Immunol **33**: 1311-20.
- Simpson, A. J., A. I. Maxwell, et coll. (1999). "Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens." FEBS Lett **452**: 309-13.
- Singer, A. J. and R. A. Clark (1999). "Cutaneous wound healing." N Engl J Med **341**: 738-46.
- Singh, P. K., H. P. Jia, et coll. (1998). "Production of beta-defensins by human airway epithelia." Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 14961-6.
- Singh, S. K. and H. J. Girschick (2004). "Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*." Lancet Infect Dis **4**(9): 575-83.
- Singh, S.K., H.J. Girschick. (2006). "Toll-like receptors in *Borrelia burgdorferi*-induced inflammation." Clin Microbiol Infect **12**:705-17.
- Sirum, K. L. and C. E. Brinckerhoff (1989). "Cloning of the genes for human stromelysin and stromelysin 2: differential expression in rheumatoid synovial fibroblasts." Biochemistry **28**(22): 8691-8.
- Skelton, N. J., F. Aspiras, et coll. (1995). "Proton NMR assignments and solution conformation of RANTES, a chemokine of the C-C type." Biochemistry **34**: 5329-42.
- Smith, R. S., T. J. Smith, et coll. (1997). "Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation." Am J Pathol **151**: 317-22.
- Sorensen, O., K. Arnljots, et coll. (1997). "The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils." Blood **90**: 2796-803.
- Sorensen, O., J. B. Cowland, et coll. (1997). "An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma." J Immunol Methods **206**: 53-9.

- Sorensen, O. E., J. B. Cowland, et coll. (2003). "Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors." J Immunol **170**: 5583-9.
- Sorensen, O. E., D. R. Thapa, et coll. (2005). "Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli." J Immunol **174**: 4870-9.
- Sorrell, J. M. and A. I. Caplan (2004). "Fibroblast heterogeneity: more than skin deep." J Cell Sci **117**: 667-75.
- Soruri, A., Z. Kiafard, et coll. (2003). "IL-4 down-regulates anaphylatoxin receptors in monocytes and dendritic cells and impairs anaphylatoxin-induced migration *in vivo*." J Immunol **170**: 3306-14.
- Soruri, A., J. Grigat, et coll. (2007). "beta-Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved." Eur J Immunol **37**: 2474-86.
- Spohn, R., U. Buwitt-Beckmann, et coll. (2004). "Synthetic lipopeptide adjuvants and Toll-like receptor 2--structure-activity relationships." Vaccine **22**: 2494-9.
- Stanek, G., G. Wewalka, et coll. (1985). "Differences between Lyme disease and European arthropod-borne *Borrelia* infections." Lancet **1**: 401.
- Stanek, G. and F. Strle (2003). "Lyme borreliosis." Lancet **362**: 1639-47.
- Stanley, M. A. (2005). "Establishing HPV-containing keratinocyte cell lines from tissue biopsies." Methods Mol Med **119**: 129-39.
- Steen, N. A., S. C. Barker, et coll. (2006). "Proteins in the saliva of the *Ixodida* (ticks): pharmacological features and biological significance." Toxicon **47**: 1-20.
- Stenger, S., D. A. Hanson, et coll. (1998). "An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin." Science **282**: 121-5.
- Steere, A. C., S. E. Malawista, et coll. (1977). "Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities." Arthritis Rheum **20**: 7-17.
- Steere, A. C., T. F. Broderick, et coll. (1978). "Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector." Am J Epidemiol **108**: 312-21.
- Steere, A. C., W. P. Batsford, et coll. (1980). "Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease." Ann Intern Med **93**: 8-16.
- Steere, A. C., N. H. Bartenhagen, et coll. (1983). "The early clinical manifestations of Lyme disease." Ann Intern Med **99**: 76-82.
- Steere, A. C., N. H. Bartenhagen, et coll. (1986). "Clinical manifestations of Lyme disease." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A **263**: 201-5.
- Steere, A. C. (1987). "Lyme disease--a tick-transmitted spirochete infection." Ter Arkh **59**: 32-4.
- Steere, A. C. (1989). "Lyme disease." N.Eng. J. Med. **321** : 1639-47.
- Steere, A. C. (1991). "Clinical definitions and differential diagnosis of Lyme arthritis." Scand J Infect Dis Suppl **77**: 51-4.
- Steere, A. C., V. K. Sikand, et coll. (1998). "Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group." N Engl J Med **339**: 209-15.
- Steere, A.C. (2001). "Medical Progress: Lyme Disease". N Engl J Med.; **345**: 115- 125.
- Steere A.C., L. Glickstein. (2004) "Elucidation of Lyme arthritis." Nat Rev Immunol **4**:143– 52.

- Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463-516.
- Stevenson, B. (2002). "*Borrelia burgdorferi* erp (ospE-related) gene sequences remain stable during mammalian infection." Infect Immun **70**: 5307-11.
- Stewart, P. E., R. Byram, et coll. (2005). "The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen." Plasmid **53**(1): 1-13.
- Stewart, P. E., X. Wang, et coll. (2006). "Delineating the requirement for the *Borrelia burgdorferi* virulence factor OspC in the mammalian host." Infect Immun **74**: 3547-53.
- Strle F, Videcnik J et coll. (2002). "Clinical and epidemiological findings for patients with erythema migrans. Comparison of cohorts from the years 1993 and 2000". Wien Klin Wochenschr. **114**:493 - 497.
- Strle, F., E. Ruzic-Sabljić, et coll. (2006). "Comparison of findings for patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* isolated from cerebrospinal fluid." Clin Infect Dis **43**: 704-10.
- Strle, F., G. Stanek. (2009). "Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis." Curr. Probl. Dermatol. **37**: 51-110.
- Strother, K. O., A. Broadwater, et coll. (2005). "Plasmid requirements for infection of ticks by *Borrelia burgdorferi*." Vector Borne Zoonotic Dis **5**: 237-45.
- Sugino, M., S. Imamura, et coll. (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**: 2844-51.
- Suhonen, J., J. Komi, et coll. (2003). "Interaction between *Borrelia burgdorferi* and immature human dendritic cells." Scand J Immunol **58**: 67-75.
- Sun, L., C. M. Finnegan, et coll. (2005). "Human beta-defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection." J Virol **79**: 14318-29.
- Suresh, A. and C. Verma (2006). "Modelling study of dimerization in mammalian defensins." BMC Bioinformatics **7 Suppl 5**: S17.
- Tai, K. F., Y. Ma, et coll. (1994). "Normal human B lymphocytes and mononuclear cells respond to the mitogenic and cytokine-stimulatory activities of *Borrelia burgdorferi* and its lipoprotein OspA." Infect Immun **62**: 520-8.
- Takahashi, M., Y. Horiuchi, et coll. (2004). "Presence of bactericidal/permeability-increasing protein in human and rat skin." Exp Dermatol **13**: 55-60.
- Takeuchi, O., T. Kawai, et coll. (2001). "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6." Int Immunol **13**: 933-40.
- Takeuchi, O., S. Sato, et coll. (2002). "Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins." J Immunol **169**: 10-4.
- Takino, T., H. Miyamori, et coll. (2004). "Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration." Cancer Res **64**: 1044-9.
- Talkington, J. and S. P. Nickell (1999). "*Borrelia burgdorferi* spirochetes induce mast cell activation and cytokine release." Infect Immun **67**: 1107-15.
- Tam, J. P., Y. A. Lu, et coll. (1999). "An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides." Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 8913-8.

- Tanaka, D., K. T. Miyasaki, et coll. (2000). "Sensitivity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Capnocytophaga* spp. to the bactericidal action of LL-37: a cathelicidin found in human leukocytes and epithelium." Oral Microbiol Immunol **15**: 226-31.
- Tang, Y. Q., M. R. Yeaman, et coll. (2002). "Antimicrobial peptides from human platelets." Infect Immun **70**: 6524-33.
- Tani, K., W. J. Murphy, et coll. (2000). "Defensins act as potent adjuvants that promote cellular and humoral immune responses in mice to a lymphoma idiotype and carrier antigens." Int Immunol **12**: 691-700.
- Theisen, M., B. Frederiksen, et coll. (1993). "Polymorphism in ospC gene of *Borrelia burgdorferi* and immunoreactivity of OspC protein: implications for taxonomy and for use of OspC protein as a diagnostic antigen." J Clin Microbiol **31**: 2570-6.
- Theisen, M., M. Borre, et coll. (1995). "Evolution of the *Borrelia burgdorferi* outer surface protein OspC." J Bacteriol **177**: 3036-44.
- Tilly, K., J. G. Krum, et coll. (2006). "*Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection." Infect Immun **74**: 3554-64.
- Tilly, K., A. Bestor, et coll. (2007). "Rapid clearance of Lyme disease spirochetes lacking OspC from skin." Infect Immun **75**: 1517-9.
- Titus, R. G., C. M. Theodos, et coll. (1994). "Interactions between *Leishmania major* and macrophages." Immunol Ser **60**: 437-59.
- Titus, R. G., J. V. Bishop, et coll. (2006). "The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission." Parasite Immunol **28**: 131-41.
- Tjabringa, G. S., J. Aarbiou, et coll. (2003). "The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor." J Immunol **171**: 6690-6.
- Tohyama, M., K. Sayama, et coll. (2007). "CXCL16 is a novel mediator of the innate immunity of epidermal keratinocytes." Int Immunol **19**: 1095-102.
- Tonn, J. C., S. Kerkau, et coll. (1999). "Effect of synthetic matrix-metalloproteinase inhibitors on invasive capacity and proliferation of human malignant gliomas in vitro." Int J Cancer **80**: 764-72.
- Toriseva, M. and V. M. Kahari (2009). "Proteinases in cutaneous wound healing." Cell Mol Life Sci **66**: 203-24.
- Tortora, G. J., Grabowski, S. R. et Parent, J. (1994). Principes d'anatomie et de physiologie., Anjou: Centre Éducatif et Culturel inc.
- Tossi, A., L. Sandri, et coll. (2000). "Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides." Biopolymers **55**: 4-30.
- Trager. (1939). "Acquired immunity in ticks". J. Parasitol **25**: 137-139.
- Tsutsumi-Ishii, Y. and I. Nagaoka (2002). "NF-kappa B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation." J Leukoc Biol **71**: 154-62.
- Turner, J., Y. Cho, et coll. (1998). "Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils." Antimicrob Agents Chemother **42**: 2206-14.
- Tyson, K., C. Elkins, et coll. (2007). "Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway." Insect Mol Biol **16**: 469-79.
- Urban, C. F., U. Reichard, et coll. (2006). "Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms." Cell Microbiol **8**: 668-76.

- Usui, M. L., R. A. Underwood, et coll. (2005). "Morphological evidence for the role of suprabasal keratinocytes in wound reepithelialization." Wound Repair Regen **13**: 468-79.
- Valdes E. Infectious Disease: Zoonoses Not Covered Elsewhere. University of Iowa. In : *Family Practice Handbook*, 3rd Edition, Chapter 18.
- Valenzuela, J. G., R. Charlab, et coll. (2000). "Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*." J Biol Chem **275**: 18717-23.
- Valenzuela, J. G., I. M. Francischetti, et coll. (2002). "Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*." J Exp Biol **205**: 2843-64.
- Valenzuela, J.G. (2005). "Ticks, the *Ixodida*". In *Biology of disease vectors* 2<sup>nd</sup> edition Chapter 28, Marquart. ED. Elsevier Academic Press.
- Valladeau, J., O. Ravel, et coll. (2000). "Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules." Immunity **12**: 71-81.
- Valladeau, J. and S. Saeland (2005). "Cutaneous dendritic cells." Semin Immunol **17**: 273-83.
- Valore, E. V. and T. Ganz (1992). "Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells." Blood **79**: 1538-44.
- Valore, E. V. and T. Ganz (1997). "Laboratory production of antimicrobial peptides in native conformation." Methods Mol Biol **78**: 115-31.
- Valore, E. V., C. H. Park, et coll. (1998). "Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues." J Clin Invest **101**: 1633-42.
- van de Locht, A., M. T. Stubbs, et coll. (1996). "The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma?" Embo J **15**: 6011-7.
- Van Lint, P. and C. Libert (2007). "Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation." J Leukoc Biol **82**: 1375-81.
- Varoga, D., T. Pufe, et coll. (2005). "Human beta-defensin 3 mediates tissue remodeling processes in articular cartilage by increasing levels of metalloproteinases and reducing levels of their endogenous inhibitors." Arthritis Rheum **52**: 1736-45.
- Velinov, N., D. Aebersold, et coll. (2007). "Matrix metalloproteinase-19 is a predictive marker for tumor invasiveness in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma." Int J Biol Markers **22**: 265-73.
- Vu, T. H. and Z. Werb (2000). "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology." Genes Dev **14**: 2123-33.
- Wada, A., K. Ogushi, et coll. (2001). "*Helicobacter pylori*-mediated transcriptional regulation of the human beta-defensin 2 gene requires NF-kappaB." Cell Microbiol **3**: 115-23.
- Wang, I. N., D. E. Dykhuizen, et coll. (1999). "Genetic diversity of ospC in a local population of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto." Genetics **151**: 15-30.
- Wang, T. T., F. P. Nestel, et coll. (2004). "Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression." J Immunol **173**: 2909-12.
- Wasserman, H. A., S. Singh, et coll. (2004). "Saliva of the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti*, modulates murine lymphocyte function." Parasite Immunol **26**: 295-306.



- Waxman, L., D. E. Smith, et coll. (1990). "Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa." Science **248**: 593-6.
- Weber, G., J. D. Heilborn, et coll. (2005). "Vitamin D induces the antimicrobial protein hCAP18 in human skin." J Invest Dermatol **124**: 1080-2.
- Wehkamp, J., J. Harder, et coll. (2004). "NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium." Infect Immun **72**: 5750-8.
- Weller, K., K. Foitzik, et coll. (2006). "Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice." Faseb J **20**: 2366-8.
- Werner, S., H. Smola, et coll. (1994). "The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds." Science **266**: 819-22.
- Werner, S. and R. Grose (2003). "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines." Physiol Rev **83**: 835-70.
- Werner, S. and C. Alzheimer (2006). "Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease." Cytokine Growth Factor Rev **17**: 157-71.
- Werner, S., T. Krieg, et coll. (2007). "Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing." J Invest Dermatol **127**: 998-1008.
- White, B., J. H. Korn, et coll. (1994). "Preferential adherence of human gamma delta, CD8+, and memory T cells to fibroblasts." J Immunol **152**: 4912-8.
- Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis (1996). "Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways." J Mol Med **74**: 589-607.
- Wikel, S. K. (1996). "Host immunity to ticks." Annu Rev Entomol **41**: 1-22.
- Wikel, S. K. (1999). "Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission." Int J Parasitol **29**: 851-9.
- Wills, M. C. and R. D. Barry (1991). "Detecting the cause of Lyme disease in Australia." Med J Aust **155**: 275.
- Wilske, B., V. Preac-Mursic, et coll. (1993). "Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*." Infect Immun **61**: 2182-91.
- Wilske, B., V. Fingerle, et coll. (1994). "Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato." Med Microbiol Immunol **183**: 43-59.
- Wingens, M., B. H. van Bergen, et coll. (1998). "Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes." J Invest Dermatol **111**: 996-1002.
- Wittenbrink, M. M., D. Thiele, et coll. (1994). "Comparison of dark-field microscopy, culture, and polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Borrelia burgdorferi* in field-collected *Ixodes ricinus* ticks." Zentralbl Bakteriol **281**: 183-91.
- Wooten, R. M., T. B. Morrison, et coll. (1998). "The role of CD14 in signaling mediated by outer membrane lipoproteins of *Borrelia burgdorferi*." J Immunol **160**: 5485-92.
- Wooten, R. M. and J. J. Weis (2001). "Host-pathogen interactions promoting inflammatory Lyme arthritis: use of mouse models for dissection of disease processes." Curr Opin Microbiol **4**: 274-9.
- Wright, S. D., R. A. Ramos, et coll. (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." Science **249**: 1431-3.

- Wu, Z., D. M. Hoover, et coll. (2003). "Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3." Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 8880-5.
- Xie, C., A. Prah, et coll. (2005). "Reconstruction of the conserved beta-bulge in mammalian defensins using D-amino acids." J Biol Chem **280**: 32921-9.
- Xu, Q., S.V. Seemanapalli et coll. (2007). Increasing the recruitment of neutrophils to the site of infection dramatically attenuates *Borrelia burgdorferi* infectivity. J Immunol **178**:5109-5115.
- Yanagi, S., J. Ashitani, et coll. (2005). "Isolation of human beta-defensin-4 in lung tissue and its increase in lower respiratory tract infection." Respir Res **6**: 130.
- Yang, D., O. Chertov, et coll. (1999). "Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6." Science **286**: 525-8.
- Yang, D., A. Biragyn, et coll. (2002). "Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal." Trends Immunol **23**: 291-6.
- Yang, Y. H., G. G. Zheng, et coll. (2003). "Expression of LL-37/hCAP-18 gene in human leukemia cells." Leuk Res **27**: 947-50.
- Yang, D., A. Biragyn, et coll. (2004). "Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense." Annu Rev Immunol **22**: 181-215.
- Yang, D., G. de la Rosa, et coll. (2009). "Alarmins link neutrophils and dendritic cells." Trends Immunol.
- Yeh, J. I., H. P. Biemann, et coll. (1996). "High-resolution structures of the ligand binding domain of the wild-type bacterial aspartate receptor." J Mol Biol **262**(2): 186-201.
- Yount, N. Y., J. Yuan, et coll. (1999). "Cloning and expression of bovine neutrophil beta-defensins. Biosynthetic profile during neutrophilic maturation and localization of mature peptide to novel cytoplasmic dense granules." J Biol Chem **274**: 26249-58.
- Yssel, H., T. Nakamoto, et coll. (1990). "Analysis of T lymphocytes cloned from the synovial fluid and blood of a patient with Lyme arthritis." Int Immunol **2**: 1081-9.
- Yu, D., J. Liang, et coll. (2006). "A tick B-cell inhibitory protein from salivary glands of the hard tick, *Hyalomma asiaticum* asiaticum." Biochem Biophys Res Commun **343**: 585-90.
- Zaiou, M., V. Nizet, et coll. (2003). "Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence." J Invest Dermatol **120**: 810-6.
- Zanetti, M. (2004). "Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity." J Leukoc Biol **75**: 39-48.
- Zanetti, M. (2005). "The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals." Curr Issues Mol Biol **7**: 179-96.
- Zeidner, N. S., S. Higgs, et coll. (1999). "Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice." Parasite Immunol **21**: 35-44.
- Zhang, J. R., J. M. Hardham, et coll. (1997). "Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes." Cell **89**: 275-85.
- Zhang, J. R. and S. J. Norris (1998). "Kinetics and in vivo induction of genetic variation of vlsE in *Borrelia burgdorferi*." Infect Immun **66**: 3689-97.

- Zhao, Z., H. Chang, et coll. (2003). "Selective up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression in human erythema migrans skin lesions of acute lyme disease." J Infect Dis **188**: 1098-104.
- Zhao, Z., R. Fleming, et coll. (2007). "CD14 mediates cross talk between mononuclear cells and fibroblasts for upregulation of matrix metalloproteinase 9 by *Borrelia burgdorferi*." Infect Immun **75**: 3062-9.
- Zhao, Z., B. McCloud, et coll. (2007). "*Borrelia burgdorferi*-induced monocyte chemoattractant protein-1 production *in vivo* and *in vitro*." Biochem Biophys Res Commun **358**: 528-33.
- Zhu, K., J. R. Sauer, et coll. (1997). "Identification and characterization of anticoagulant activities in the saliva of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.)." J Parasitol **83**: 38-43.
- Zilbauer, M., N. Dorrell, et coll. (2005). "Intestinal innate immunity to *Campylobacter jejuni* results in induction of bactericidal human beta-defensins 2 and 3." Infect Immun **73**: 7281-9.
- Zlotnick, G. W., V. T. Sanfilippo, et coll. (1988). "Purification and characterization of a peptidoglycan-associated lipoprotein from *Haemophilus influenzae*." J Biol Chem **263**: 9790-4.
- Zuckert, W. R., T. A. Kerentseva, et coll. (2001). "Structural conservation of neurotropism-associated VspA within the variable *Borrelia* Vsp-OspC lipoprotein family." J Biol Chem **276**: 457-63.

## Liste des sites Internet consultés

Réprésentation géographique de la maladie de Lyme

[www.maladies-a-tiques.com](http://www.maladies-a-tiques.com)

Classification des spirochètes

[www.bioforma.net](http://www.bioforma.net)

Photo d'une tique *Ixodes ricinus*

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Tique>

Photo d'une tique Argas

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Argasidae>

Photo d'une femelle d'*Ixodes ricinus* gorgée de sang

<http://www.lesnymphes.org/tiques.htm>

Photo représentant les différentes stases de développement de la tique

<http://www.expasy.ch/prolune/dossiers/025/>

Photo d'une femelle d'*Ixodes ricinus* en train de pondre

<http://www.ag.auburn.edu>

Cycle de développement de la tique

[www.tiques.fr](http://www.tiques.fr)

Structure 3D d'OspA

<http://rutchem.rutgers.edu>

Structure du dimère d'OspC

<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1f1m/quaternary.html>

Régulation de l'activité de la plasmine

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Plasmine>

Structure de la matrice extracellulaire

[www.kentsimmons.iwinnipeg.ca](http://www.kentsimmons.iwinnipeg.ca)

Structure d'un protéoglycane

[www.steve.gb.com](http://www.steve.gb.com)

Structure de la fibronectine

[bio.winona.msus.edu](http://bio.winona.msus.edu)

## Résumé

La maladie de Lyme est une infection causée par un spirochète *Borrelia burgdorferi* et transmise à l'homme par piqûre de tique du genre *Ixodes* spp. La borréliose de Lyme est une zoonose qui transite entre l'arthropode et l'hôte vertébré. Elle sévit principalement dans l'hémisphère Nord où elle se manifeste par des désordres multisystémiques : atteintes articulaires, cutanées et cardiaques. La tique *Ixodes* est un arthropode hématophage qui se nourrit pendant 4 à 8 jours sur un hôte vertébré. Pour assurer son attachement et faciliter le repas sanguin, le vecteur injecte sa salive qui possède des propriétés pharmacologiques et immunosuppressives. Une protéine de salive de tique, Salp15, a été montrée comme essentielle pour la transmission *B. burgdorferi*. Cette protéine inhibe l'activation des lymphocytes et la maturation des cellules dendritiques et se fixe à une protéine de surface majeure de *B. burgdorferi*, OspC (Outer surface protein C), pour faciliter la transmission bactérienne et protéger les bactéries contre les anticorps de l'hôte.

Dans les maladies à transmission vectorielle, l'interface cutanée possède un rôle très important. Nous avons donc analysé le rôle des cellules résidentes de la peau : les kératinocytes (KCs) et les fibroblastes (FBs) dans l'inflammation. L'immunité innée cutanée induit des peptides antimicrobiens (PAMs) qui tuent un large panel de pathogènes et qui ont des activités chimiotactiques et angiogéniques. Nous avons démontré que les KCs incubés *in vitro* avec *B. burgdorferi* induisent une réponse inflammatoire (chimiokines et PAMs). Nous avons ensuite étudié l'effet immunosuppresseur potentiel des extraits de glandes salivaires et de la protéine de tique, Salp15 d'*I. ricinus*. Nous avons trouvé que ceux-ci inhibent la réponse inflammatoire avec un effet antialarmines. Cet effet immunosuppresseur pourrait faciliter la transmission et la multiplication de *Borrelia*. Puis, nous avons étudié le rôle des FBs, cellules dermiques, dans la borréliose de Lyme. Nous avons montré que *Borrelia* induit l'expression de certaines métalloprotéases (MMPs) notamment lors de la coopération entre KCs et FBs. La bactérie pourrait ainsi migrer à travers la MEC de la peau et disséminer. Enfin nous avons étudié l'interaction des KCs avec différentes espèces de *B. burgdorferi* : *B. garinii*, *B. burgdorferi* ss et *B. afzelii* ou différentes souches pour étudier le rôle éventuel de la peau dans l'organotropisme de *Borrelia*.

Mots clés : immunité innée cutanée, KCs, FBs, *Ixodes ricinus*, Salp15, alarmines, peptides antimicrobiens, *Borrelia burgdorferi sensu lato*.